

НЕЙРОХИМИЯ ՆԵՅՐՈՔԻՄԻԱ

ТОМ. 2. № 3. 1983

ISSN 0203-493X



АКАДЕМИЯ НАУК СССР
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

НЕЙРОХИМИЯ ՆԵՅՐՈՔԻՄԻԱ

ТОМ 2, ВЫП. 3
Июль—сентябрь

Журнал основан в 1982 году
Выходит 4 раза в год

ИЗДАТЕЛЬСТВО АН АРМЯНСКОЙ ССР
ЕРЕВАН 1983

Редакционная коллегия

А. А. ГАЛОЯН—главный редактор

Г. В. Априкян, А. В. Арутюнян (зам. главного редактора), Л. С. Арутюнян (отв. секретарь), Я. В. Белик, Н. Н. Демин (зам. главного редактора), К. Г. Карагезян, П. А. 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

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

Сдано в набор 13.05.1983 г. Подписано к печати 3.08 1983 г. ВФ 04466.
Бумага № 1, 70×108¹/₁₆. Высокая печать. Печ. лист. 6,75. Усл. печ. лист. 9,45.
Учет.-изд. 7,49, Тираж 745. Заказ 507. Издат. 5969.
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.

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

1. В журнале публикуются статьи, содержащие ранее не опубликованные результаты экспериментальных исследований по биохимии нервной системы, обзоры по важнейшим вопросам современной нейробиологии, рецензии на новые издания и актуальная научная хроника. Объем рукописи (включая резюме, список литературы и иллюстраций) не должен превышать 15 с., напечатанных на машинке через 2 интервала. Объем обзоров не более 20 с., кратких сообщений, рецензий и хроники 4 с., а писем в редакцию—2 с. Рукопись статьи должна подписываться всеми авторами (2 экз.) и сопровождаться актом экспертизы (2 экз.) и направлением от учреждения.

2. Перед каждой статьей, кроме кратких сообщений, должно быть напечатано краткое резюме (через 1,5 интервала) объемом не более 0,5 с., которое должно отражать цель и основные результаты работы. Ко всем статьям без исключения на отдельном листе прилагается тот же текст на английском языке.

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

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

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

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

Рисунки, отчетливо выполненные тушью на плотной белой бумаге или кальке, представляются в конверте в двух экземплярах. На обороте каждого рисунка карандашом следует указать фамилии авторов, сокращенное название статьи и порядковый номер, для фотографии (на глянцевой бумаге) обозначить ее верх и низ. Подписи к рисункам и фотографиям представляются на отдельном листе.

5. В приложении к правилам для авторов, которое публикуется в каждом первом номере нашего журнала, приводится список наиболее часто употребляемых сокращенных обозначений, разрешаемых применять без специальной расшифровки. Используемые авторами другие сокращенные слова при первом упоминании даются полностью и в скобках в сокращенном виде. Фамилии иностранных авторов даются на языке оригинала.

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

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

8. Корректуру авторам редакция не высылает.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Journal "Neirokhimia" will primarily publish papers that present the results of original research on biochemistry of nervous system, short communications, reviews on actual problems of neurochemistry, chronicles, reviews of new books and letters to Editor.

The Journal will accept papers from any country. Manuscripts should be type-written in English, no longer than 15 pages in toto (typed with double spacing), reviews—20 pages, short communications and chronicles—4 pages, letters to Editor—2 pages. Authors should submit 2 copies of their contribution together with tables and figures. Manuscripts should conform to the "Instructions" and should be submitted to

The Editorial Office
Journal "Neirokhimia"
P. Sevak str. 5/1, Yerevan 375044, USSR

Arrangement of the manuscript

1. The first page should bear:

- a) the title, concise but informative
- b) the complete names of the author(s)
- c) the name of the lab where the work was carried out
- d) the address to which correspondence should be sent

2. Each paper should be preceded by a Summary giving a brief account of the most relevant contributions of the paper (100–200 words, 1.5 spacing). It's important to indicate the goal, the methods, the results and conclusions.

3. Experimental papers should be divided into the following sections: Materials and Methods, Results and Discussion, Reference List. It may be often advantageous to have only 2 sections: Results and Discussion. There's no need to split short communication.

4. Bibliographic citations should be made in numerical order (1.5 spacing), in square brackets and in order of their citation in the text. The form of listed references is as follows: surname and initials of authors, Journal name, volume and issue number, inclusive page numbers and year. For book titles the style is similar but contains book title—"In" followed by initials, surname of editor, the name and location of the publishing company.

5. Tables should be typed on separate pages and numbered in the order they appear in the text. They must have heading and contain only usually adopted abbreviations. Figures and graphs should be drawn separately on good quality drawing or tracing paper and put into envelope. Photographs should be glossy and as rich in contrast as possible. The back of each figure and Photo should be labelled lightly in soft pencil to show the top of it, the author's name and the figure and photo number. Legends to figures and photos should be typed on separate pages.

6. The Editorial Board has got the right to shorten and improve the text not altering the main meaning.

7. Proofs are not sent to authors. For each article 15 reprints are supplied free of charge.

УДК 577.153.4

ВЛИЯНИЕ ИНТЕНСИВНОЙ ДВИГАТЕЛЬНОЙ НАГРУЗКИ НА СОДЕРЖАНИЕ АЦЕТИЛХОЛИНА И ХОЛИНЭСТЕРАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ В РАЗЛИЧНЫХ ОТДЕЛАХ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ КРЫС

КОРНЕЕВА Н. В., УШАКОВ А. С., ШИШКИНА С. К.

Установлено, что 30-минутная интенсивная двигательная нагрузка (до изнеможения) у крыс сопровождалась резким падением содержания как свободного, так и связанного ацетилхолина в гипоталамической области, продолговатом мозгу и особенно в крестцовом отделе спинного мозга, а также уменьшением активности ацетилхолинэстеразы в продолговатом и спинном мозгу; в продолговатом мозгу снижалась и активность неспецифической холинэстеразы.

Уровень физической работоспособности определяется деятельностью ЦНС, состоянием и особенностями синаптической активности, деятельностью эндокринных желез, а также изменениями химизма мышечной ткани [1—4]. В деятельности ЦНС, в частности в ее отделах, связанных с осуществлением моторной функции, важная роль принадлежит холинергическим структурам [5—8]. Данных же о влиянии интенсивной (вплоть до истощения) двигательной произвольной активности на состояние метаболизма ацетилхолина (АХ) относительно мало. Отдельные исследования по изучению влияния моторных нагрузок на состояние холинергических систем ЦНС дали неоднозначные результаты, касались в основном изменений в крови и мышечной ткани [9—15] и лишь в меньшей степени нервной [16].

В настоящей работе изучали влияние интенсивной двигательной нагрузки на содержание различных фракций АХ и активность холинэстераз в некоторых отделах головного и спинного мозга крыс.

Материалы и методы

В опытах были использованы крысы-самцы линии Вистар массой 250—300 г. Животных помещали на бегущую дорожку, двигавшуюся со скоростью 18 см/с и подвергали воздействию интенсивной двигательной нагрузки до изнеможения в течение 30 мин. Сразу же после окончания опыта животных декапитировали; контролем служили интактные крысы. Были исследованы гипоталамическая область, продолговатый мозг и крестцовый отдел спинного мозга (на уровне 12-го грудного и 1—4-го поясничных позвонков), в которых определяли содержание свободного

и связанного АХ, а также активность АХЭ и неспецифической холинэстеразы (НХЭ). Определение АХ проводили с помощью биологического тестирования с использованием в качестве тест-объекта спинной мышцы пиявки по Fühner-Minz [17]. Обработку тканевых экстрактов при определении общего содержания АХ осуществляли нагреванием (без внесения в пробы каких-либо других веществ, кроме ингибиторов холинэстераз), свободный АХ определяли в тех же пробах на холоду.

Холинэстеразную активность определяли спектрофотометрическим методом Ellman [18] в модификации Масловой и Резника [19] с использованием субстратов: ацетилхолинйодида (при определении общей холинэстеразной активности) и бутирилтиохолинйодида (при определении НХЭ); активность АХЭ находили по разности между величинами общей холинэстеразной активности и активности НХЭ. Полученные данные были обработаны методом вариационной статистики [20].

Результаты и обсуждение

У контрольных животных исследуемые показатели находились в пределах физиологической нормы (таблица).

Таблица

Показатели холинергической системы некоторых отделов головного и спинного мозга контрольных животных

	Гипоталамическая область				Продолговатый мозг				Спинной мозг			
	АХ своб.	АХ связ.	АХЭ	НХЭ	АХ своб.	АХ связ.	АХЭ	НХЭ	АХ своб.	АХ связ.	АХЭ	НХЭ
	мкг %		мкмоль суб- страта/г/ч		мкг %		мкмоль суб- страта/г/ч		мкг %		мкмоль суб- страта/г/ч	
$M \pm m$	35,35	157,98	390,7	24,8	47,50	139,04	401,4	22,7	56,72	141,64	340,6	14,5
$\pm m$	6,00	12,04	20,7	1,7	6,56	17,19	23,3	2,3	16,92	21,88	18,3	1,2
n	15	15	23	23	14	14	23	23	14	14	23	23

Содержание свободного и связанного АХ составляло соответственно (мкг %): в гипоталамической области— $35,35 \pm 6,00$ и $157,98 \pm 12,04$; в продолговатом мозгу— $47,50 \pm 6,56$ и $139,04 \pm 17,19$; в спинном мозгу— $56,72 \pm 16,92$ и $141,64 \pm 21,88$. При этом по абсолютному содержанию той и другой фракции количество АХ в изучаемых структурах ЦНС было приблизительно одного порядка. В отдельности же количество связанного АХ как в гипоталамической области, так и в продолговатом и спинном мозгу было в несколько раз выше содержания свободного.

По активности АХЭ исследуемые структуры располагались в следующем порядке: продолговатый мозг > гипоталамическая область > спинной мозг; по активности НХЭ: гипоталамическая область > продолговатый мозг > спинной мозг. При этом величины активности АХЭ значительно превышали величины активности НХЭ и были равны соответ-

ственно (мкмоль субстрата/г/ч): в гипоталамической области — $390,7 \pm 20,7$ и $24,8 \pm 1,7$; продолговатом мозгу — $401,4 \pm 23,3$ и $22,7 \pm 2,3$; спинном мозгу — $340,6 \pm 18,3$ и $14,5 \pm 1,2$.

По сравнению с величинами, характерными для контрольных животных, показатели метаболизма АХ в исследуемых отделах ЦНС в результате истощающей двигательной нагрузки претерпевали значительные изменения (рисунок).

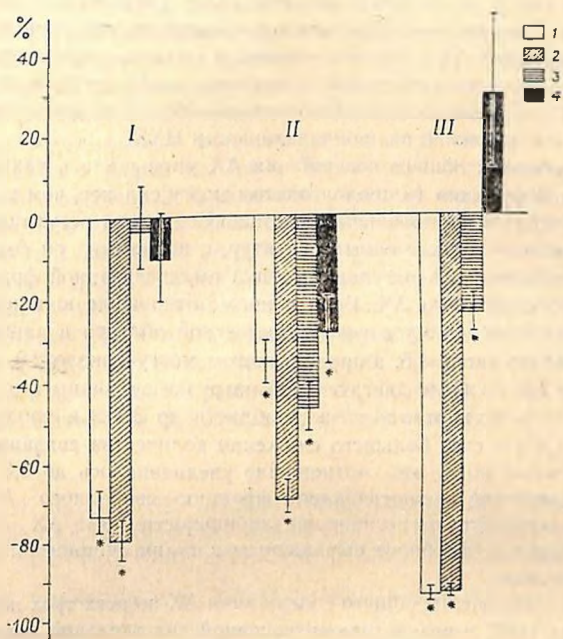


Рис. Содержание свободного (1) и связанного (2) АХ, а также активность АХЭ (3) и НХЭ (4) при воздействии интенсивной двигательной нагрузки в гипоталамической области (I), продолговатом (II) и спинном (III) мозгу крыс (в % от контроля). * $p < 0,05$ по отношению к интактным животным

Во всех исследуемых структурах головного и спинного мозга у подопытных животных было обнаружено снижение содержания свободного и связанного АХ: в гипоталамической области соответственно на 72 и 79%, в продолговатом мозгу — на 36 и 70%, в спинном — на 95 и 94%. При этом активность АХЭ и НХЭ в гипоталамической области оставалась неизменной, тогда как в продолговатом мозгу имело место снижение активности АХЭ на 47 и НХЭ на 28%; в спинном мозгу при снижении активности АХЭ на 25% изменения активности НХЭ были направлены в сторону увеличения, однако не выходили за пределы средней ошибки опыта и оказались статистически недостоверными.

Таким образом, интенсивная двигательная активность вызывала однонаправленные изменения—падение содержания обеих исследуемых фракций АХ во всех изучаемых структурах ЦНС, которые по степени выраженности этих сдвигов можно расположить в следующем порядке: спинной мозг > гипоталамическая область > продолговатый мозг. Что касается активности ферментов катаболизма АХ, то заметные отклонения—снижение активности как АХЭ, так и НХЭ наблюдали лишь в продолговатом мозгу, тогда как в спинном мозгу уменьшалась активность одной АХЭ. Следует отметить, что при значительном уменьшении содержания фракций АХ в гипоталамической области сдвигов холинэстеразной активности не наблюдали. В спинном мозгу почти полное исчезновение АХ имело место при относительно небольшом снижении активности АХЭ и стабильной величине активности НХЭ.

При снижении общего содержания АХ уменьшалась также и доля его связанной фракции (в продолговатом мозгу сильнее, чем количество свободного АХ), выполняющей существенную роль в регуляции биохимических свойств тех клеточных структур, с которыми он соединяется [21, 22]. Связанный АХ регулирует и пул рыхлосвязанной фракции так называемого свободного АХ. Если в норме отношение количества связанного АХ к свободному в гипоталамической области в наших условиях составляло около 4,5, в продолговатом мозгу—около 2,9, а в спинном—около 2,5, то после двигательной нагрузки величины этих отношений снижались в гипоталамической области до 3,4 и в продолговатом мозгу—до 1,4 (за счет большего снижения количества связанной фракции), в спинном мозгу это соотношение увеличивалось до 3,3 (за счет большего снижения рыхлосвязанной фракции—свободного АХ). Эти данные свидетельствуют о снижении лабильности связи АХ с другими компонентами клетки, более выраженном в ткани спинного мозга в подобных условиях.

Резкое уменьшение общего содержания АХ во всех трех исследованных отделах ЦНС в результате интенсивной двигательной нагрузки может указывать на глубокое подавление холинергических систем в этих структурах в результате двигательного истощения (возможно, это является и одной из важнейших причин последнего). В продолговатом и спинном мозгу снижение количества АХ протекало и на фоне существенного торможения АХЭ (в продолговатом мозгу и НХЭ); такое видимое снижение активности механизма распада АХ может быть отражением известного адаптационно-компенсаторного процесса в них в подобных стрессорных условиях, препятствуя еще большему уменьшению количества АХ.

В функциональной деятельности холинергических структур ЦНС важное значение имеет отношение в них между содержанием АХ и активностью АХЭ. При резком повышении или понижении этого показателя ухудшается межнейронная передача импульсов, возрастает порог возбудимости, значительно удлиняется латентный период рефлексов и угасает ряд двигательных реакций. Анализ результатов исследований

выявил значительные изменения данного коэффициента у подопытных животных по отношению к контрольным. Так, для ткани спинного мозга после нагрузки соотношение общего АХ к активности АХЭ было равно 0,05, свободного АХ к АХЭ—0,01 и связанного АХ к АХЭ—0,03, а в контроле эти же величины составляли 0,58; 0,17 и 0,42, то есть отмечалось соответственно снижение указанного соотношения в 11,6; 17 и 14 раз. В гипоталамической области наблюдалось менее выраженное снижение этих показателей: соответственно в 4,2; 3 и 4,4 раза. В продолговатом мозгу эти соотношения оставались без изменения.

Согласно литературным данным [23—27], при действии на организм различных экстремальных факторов изменения, происходящие в функционировании холинергических систем, чаще обратимы, что свидетельствует об их высокой функциональной возможности и способности адаптироваться к новым условиям. Торможение активности АХЭ в головном мозгу от 20 до 35% вызывало развитие тормозных состояний, следствием чего являлось выпадение двигательных реакций. Подавление активности АХЭ от 40 до 60% в нервной ткани приводило к нарушениям условнорефлекторной деятельности и работоспособности организма; более глубокое подавление активности данного фермента (до 80%) вызывало уже и более сильное нарушение функций системы АХ. Величина и направленность этих изменений зависят не только от природы, силы и длительности раздражителя, но, по-видимому, и от физиологической значимости функций исследуемой структуры и ее исходного состояния [25—27].

EFFECT OF INTENSIVE LOCOMOTORY LOAD ON THE AMOUNT OF ACETYLCHOLINE (ACh) AND THE ACTIVITY OF ACETYLCHOLINESTERASE (AChE) IN RAT CNS

KORNEEVA N. V., USIAKOV A. S., SHISHKINA S. K.

Institute of Medical and Biological Problems, USSR Health Ministry, Moscow

30-minute long intensive locomotory load (till exhaustion) produces a drastic fall in the amount of both free and bound ACh in rat hypothalamus, medulla oblongata and especially in the sacral segment of the spinal cord. The activity of the specific AChE diminished in medulla oblongata and spinal cord, that of the non-specific AChE—only in medulla oblongata.

ЛИТЕРАТУРА

1. Даныко Ю. И. Очерки физиологии физических упражнений, М., Медицина, с. 157—166, 201, 1974.
2. Слоним А. Д.—В кн.: Физиология мышечной деятельности труда и спорта, Л., Наука, с. 220, 1969.
3. Перегудова Е. С., Гинецинский А. Г., Галицкая Н. А., Шамарина Н. А., Громяковская М. М.—В кн.: Нейрогуморальные механизмы регуляции мышечной деятельности, М., с. 47, 1965.

4. Волкова И. Н., Никольский Е. Е., Полетаев Г. Н., Хамитов Х. С.—В кн.: Некоторые механизмы регуляции процесса освобождения ацетилхолина из двигательных нервов, Казань, с. 31—32, 1976.
5. Friede R. L. Topographie brain chemistry, N. Y.—London, Academic Press Ch. X., p. 237, 1966.
6. Михельсон М. Я., Зеймаль Э. В. Ацетилхолин (о молекулярном механизме действия), Л., Наука, 1970.
7. Mc Geer P. L., Eccles J. C., Mc Geer E. G. Molecular neurobiology of the Mammalian brain. N. Y.—London, Plenum Press, Ch. 13, p. 413, 1978.
8. Тучек С. Синтез ацетилхолина в нейронах, М., Мир, 1981.
9. Донская Л. В., Ушкова И. Н.—В кн.: Физиологическая роль медиаторов, Казань, с. 90—92, 1972.
10. Эрез В. П., Винницкая К. Б. Физиол. ж. СССР, 58, 545—549, 1972.
11. Костюнин И. Д. Теория и практика физкультуры 2, 37, 1966.
12. Чинкин А. С.—В кн.: Физиологическая роль медиаторов, Казань, с. 251—252, 1972.
13. Чинкин А. С., Курмаев О. Д.—В кн.: Физиологическая роль медиаторов, Казань, с. 252—253, 1972.
14. Гудзь П. З.—В кн.: Тез. докл. Система восстановления средств в спорте. М., с. 7—9, 1973.
15. Аганянц Е. С., Кальницкая В. Е.—В кн.: XII Всесоюз. научн. конф. по физиологии, морфологии, биохимии мышечной деятельности, Львов с. 1—2, 1972.
16. Певзнер Л. Э., Венков Л., Черешаров Л. Укр. биохим. ж., 50, 20—24, 1978.
17. Кассиль Г. Н., Семавин И. Е., Соколинская Р. А., Шпильрейн М. И., Лаб. дело, 2, 105—110, 1971.
18. Ellman G. L., Cortneu K. D. et al. Biochem. Pharmacol., 4, 85—95, 1961.
19. Маслова М. Н., Резник Л. В. Биохимия, 46, 450—454, 1976.
20. Рокитский П. Ф. Биологическая статистика, Минск, 1964.
21. Демин Н. Н.—В кн.: Проблемы нейрхимии, М.—Л., Наука, с. 197—208, 1966.
22. Демин Н. Н.—В кн.: V Всесоюз. конф. по нейрхимии, Тбилиси, Медицина, с. 365—381, 1970.
23. Тонкоглас В. П.—В кн.: Стресс и адаптация, Кишинев, Штиинца, с. 143, 1978.
24. Хайдарлиу С. Х.—В кн.: Стресс и адаптация, Кишинев, Штиинца, с. 147—148, 1978.
25. Тонкоглас В. П.—В кн.: Нервные и эндокринные механизмы стресса, Кишинев, Штиинца, с. 185—195, 1980.
26. Хайдарлиу С. Х.—В кн.: Нервные и эндокринные механизмы стресса, Кишинев, Штиинца, с. 221—235, 1980.
27. Фурдуй Ф. И., Бабарэ Г. М., Гурагата Е. Н. и др.—В кн.: Актуальные проблемы стресса, Кишинев, с. 243—259, 1976.

Институт медико-биологических
проблем МЗ СССР, Москва

Поступила 28.XI 1982

ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИКИ ТЕРМОИНАКТИВАЦИИ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ МОЗГА КРЫС И БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЛОШАДИ

СЭПП А. В., КРАУЗБЕРК Т. Х., ЯРВ Я. Л.

Изучена кинетика термоинактивации водорастворимой бутирилхолинэстеразы сыворотки крови лошади и мембраносвязанной АХЭ мозга крыс. Показано, что кинетика термоинактивации обоих этих ферментов описывается суммой двух процессов первого порядка, которые характеризуются разными значениями констант скорости. Доли «быстро» и «медленно» инактивирующегося фермента зависят от температуры опыта. Вычислены значения активационных параметров для обеих стадий денатурации и обсуждаются возможные причины уменьшения скорости в ходе денатурационного процесса. Высказано предположение о том, что денатурированные при нагревании белки способны в результате разворачивания белковой глобулы более интенсивно взаимодействовать с нативными молекулами фермента, повышая тем самым их термостабильность. Доли «быстро» и «медленно» инактивирующегося фермента определяются в таком случае кинетическими параметрами процессов термоденатурации и образования ассоциатов нативного и денатурированного белков.

Процесс термоинактивации мембраносвязанной АХЭ эритроцитов не подчиняется кинетике реакции первого порядка и в интервале температур от 47° до 58° протекает по меньшей мере в две стадии [1], которые различаются по константам скорости и активационным параметрам. От температуры зависит также отношение долей быстро и медленно инактивирующегося препарата. Эти результаты были объяснены двумя альтернативными возможностями, учитывающими протекание процесса в двух следующих друг за другом этапах, либо существованием двух, денатурирующихся с разной скоростью, форм фермента [1]. При этом возможно, что сложное кинетическое поведение АХЭ эритроцитов в процессе термоинактивации обусловлено взаимодействием этого белка с мембранной структурой, о чем свидетельствует тот факт, что для солиubilизации АХЭ мембран эритроцитов необходима обработка этого белково-липидного комплекса ионными детергентами [2].

В настоящей работе поставлена задача исследования кинетики термоинактивации двух разных холинэстераз: мембраносвязанной АХЭ мозга крыс и водорастворимой бутирилхолинэстеразы (БХЭ) сыворотки крови лошади. Оба эти фермента имеют субъединичное строение [3, 4], и их субъединицы характеризуются величиной M . Так как сывороточный фермент истинно растворим в воде, его свойства, в том числе и законо-

мерности процесса термоденатурации, не искажены белково-липидными взаимодействиями. Можно предположить, что сопоставление данных термонинактивации холинэстераз мозга и сыворотки позволяет оценить роль липидного компонента в определении свойств и стабильности мембраносвязанного фермента.

Материалы и методы

Препарат БХЭ сыворотки крови лошади с уд. акт. 130 Е/мг был предоставлен Институтом вакцины и сывороток им. Мечникова (Москва). Мембранный препарат АХЭ получали из коры больших полушарий головного мозга крыс. Ткань обрабатывали при $+4^{\circ}$ в гомогенизаторе из плексигласа (3 мин при 1000 об/мин). Приготовленный на 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.4), гомогенат центрифугировали 10 мин для удаления кусков ткани и ядер на центрифуге К-24 при 1000 g. Супернатант подвергали второму центрифугированию при 100000 g (45 мин) на ультрацентрифуге VAC-602. Осадок промывали 0.05 М фосфатным буфером и гомогенизировали повторно там же для получения микросомной фракции мембран.

Активность обеих холинэстераз измеряли в 0.05 М фосфатном буфере (рН 7.4), спектрофотометрически [5] на спектрофотометре Perkin Elmer 402. Концентрация субстрата (ацетилхолин йодистый, ч. д. а.) в реакционной среде—20 мМ; концентрация 5,5'-динитробис (2-нитробензойной кислоты) (ч., «Рсахим») —0.3 мМ. Измерения начальной скорости гидролиза субстрата проводили при 25° при $\lambda=412$ нм.

Опыты по денатурации ферментов осуществляли в термостатированных стеклянных реакторах, которые были снабжены термометром для контроля температуры, при постоянном интенсивном перемешивании, объем реакционной среды—от 1.5 до 10 мл.

В начале эксперимента необходимый объем буферного раствора нагревали до нужной температуры. Затем в реактор вводили раствор фермента, подбирая такие соотношения объемов, чтобы уменьшение температуры реакционной среды не превышало $0.1-0.2^{\circ}$. В определенное время из реактора отбирали аликвоты и быстро охлаждали в погруженных в ледяную воду пробирках для прекращения процесса денатурации. В этих пробах определяли активность исследуемых ферментов, как описано выше.

Титрование растворов БХЭ для определения активности фермента проводили методом Berge [6]. Используемые реактивы и детали методики титрования описаны ранее [7].

Обработку кинетических данных и их статистический анализ проводили на мини-ЭВМ «Искра-1256».

Результаты и обсуждение

Нагревание растворов БХЭ сыворотки крови лошади и АХЭ мозга крыс приводит к необратимой инактивации этих ферментов, скорость которой зависит от температуры. Это допускает проведение опытов

только в интервале от 50° до 60° в случае АХЭ и от 55° до 65° в случае БХЭ. При одинаковой температуре быстрее инактивируются АХЭ (рис. 1). Следовательно, наличие связи этого белка с мембранной структурой не является фактором, повышающим термостабильность фермента.

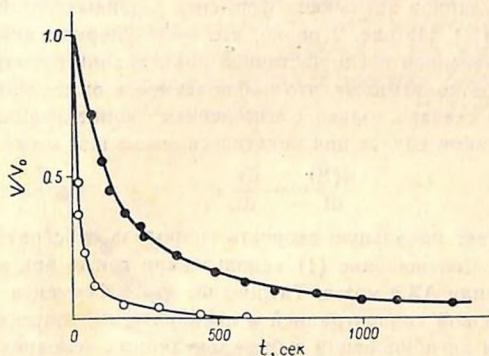


Рис. 1. Термоинактивация бутирилхолинэстеразы (●) и ацетилхолинэстеразы (○) при 60° в 0,05 М фосфатном буфере с pH 7,4

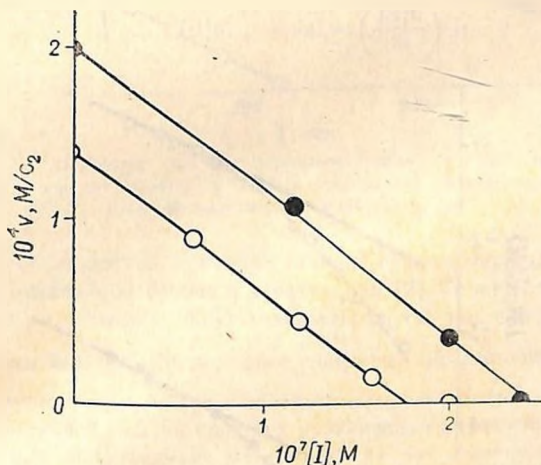


Рис. 2. Титрование нативной (●) и частично инактивированной (○) бутирилхолинэстеразы O,O-диэтил-п-нитрофенилфосфатом

Изучение активности холинэстераз проводили при высоких концентрациях субстрата, где скорость реакции определяется, в основном, каталитической константой и концентрацией активных центров фермента. Для выяснения, какая из этих величин меняется в процессе термоинактивации, проводили титрование нативного и частично инактивированного препаратов БХЭ. В качестве титранта использовали необратимый ин-

гибитор О, О-диэтил-п-нитрофенилфосфат. Результаты титрования представлены на рис. 2 в виде зависимости остаточной активности фермента после окончания реакции ингибирования от концентрации ингибитора. Отрезок абсциссы на этом графике равен концентрации активных центров фермента в реакционной среде, и наклон прямой характеризует величину молекулярной активности фермента в данных условиях эксперимента, $a_m = v/[E]$. Из рис. 2 видно, что молекулярная активность БХЭ остается неизменной после частичной инактивации препарата при 60°. Эти результаты показывают, что наблюдаемое в опыте уменьшение активности БХЭ связано только с изменением концентрации активного фермента. В таком случае при кинетическом анализе можно принять

$$\frac{d(E)}{dt} = \frac{dv}{dt}, \quad (1)$$

где v обозначает начальную скорость гидролиза субстрата в стандартных условиях. Соотношение (1) использовали также при анализе кинетики инактивации АХЭ мозга. Титрование этого фермента затруднено в связи с его низкой концентрацией в препарате, не допускающей проведения реакции ингибирования в бимолекулярных условиях.

Для определения кинетического порядка процесса термоннактивации холинэстераз исходили из известного уравнения [8]:

$$\ln \left(\frac{d[E]}{dt} \right) = \ln k + n \cdot \ln [E], \quad (2)$$

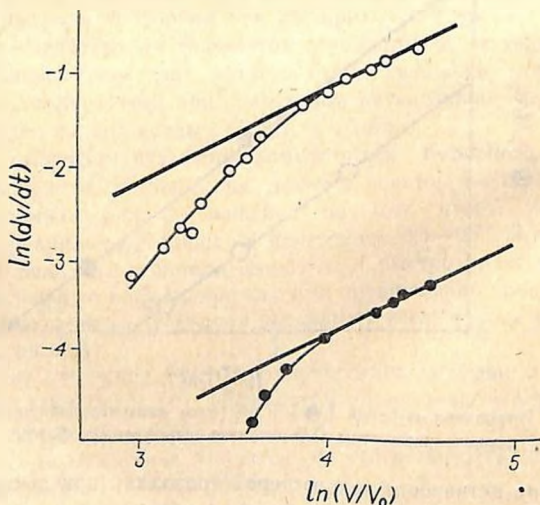


Рис. 3. Определение порядка реакции термоннактивации бутирилхолинэстеразы при 55° (●) и 60° (○)

в котором вместо концентрации фермента $[E]$ использовали начальную скорость гидролиза субстрата v или относительную величину v/v_0 . При этом, исходя из уравнения (2):

$$\ln \left(\frac{dv}{dt} \right) = \text{const} + n \cdot \ln \left(\frac{v}{v_0} \right). \quad (3)$$

Примеры обработки кинетических кривых инактивации БХЭ, согласно этому уравнению, приведены на рис. 3. В начальный период инактивация фермента подчиняется кинетике первого порядка, однако в ходе реакции наблюдается отклонение кинетических кривых от этой закономерности. Аналогичные результаты получены также в случае АХЭ мозга. Такое сложное кинетическое поведение является характерным для многих белков, у которых отклонение процесса денатурации от кинетики первого порядка часто объясняют существованием двух или

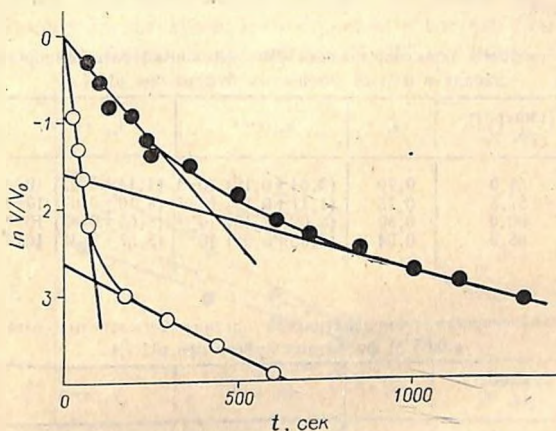


Рис. 4. Обработка кривых термоденатурации бутирилхолинэстеразы (●) и ацетилхолинэстеразы (○) в координатах кинетического уравнения реакции первого порядка при 60°

большого числа последовательных реакций первого порядка, или разветвленным механизмом процесса денатурации [9]. Те же объяснения применимы и в случае изученных холинэстераз, так как обработка результатов в координатах кинетического уравнения первого порядка $\ln \left(\frac{v}{v_0} \right)$ и t дает кривую с двумя прямолинейными участками (рис. 4). Независимо от конкретной модели процесса инактивации фермента (последовательные или параллельные пути реакции) наблюдаемая картина может быть описана кинетическим уравнением:

$$\left(\frac{v}{v_0} \right) = a_1 e^{-k_1 t} + a_2 e^{-k_2 t}. \quad (4)$$

При достаточно разных значениях констант k_1 и k_2 их значения можно рассчитать из наклонов линейных участков зависимости $\ln \left(\frac{v}{v_0} \right)$ от t . Результаты анализа приведены в табл. 1 и 2.

Экстраполяция получаемых в координатах $\ln \left(\frac{V}{V_0} \right)$ и t прямых к $t=0$ позволяет точно оценить доли «быстро» и «медленно» инактивирующегося фермента α_1 и α_2 (табл. 1, 2). Доля быстро инактивирующегося фермента определяется температурой опыта. Кроме того, было замечено, что соотношение концентраций быстро и медленно инактивирующейся БХЭ зависит от общей концентрации белка в инкубационной смеси. При этом уменьшение концентрации белка дестабилизирует фермент, в связи с чем во всех опытах по определению активационных параметров процесса термоденатурации использовали одинаковые концентрации белка.

Таблица 1

Константы скорости терминиактивации бутирилхолинэстеразы сыворотки крови лошади в 0,05 М фосфатном буфере при pH 7,4

Температура, °C	α_1	k_1, c^{-1}	k_2, c^{-1}
55,0	0,70	$(3,64 \pm 0,19) 10^{-4}$	$(1,14 \pm 0,27) 10^{-4}$
57,5	0,75	$(1,11 \pm 0,12) 10^{-3}$	$(4,10 \pm 0,67) 10^{-4}$
60,0	0,80	$(5,02 \pm 1,10) 10^{-3}$	$(8,65 \pm 0,87) 10^{-4}$
65,0	0,94	$(5,85 \pm 0,98) 10^{-2}$	$(5,57 \pm 2,31) 10^{-3}$

Таблица 2

Константы скорости терминиактивации ацетилхолинэстеразы мозга крыс в 0,05 М фосфатном буфере при pH 7,4

Температура, °C	α_1	k_1, c^{-1}	k_2, c^{-1}
50,0	0,20	$(1,06 \pm 0,15) 10^{-3}$	—
52,5	0,55	$(2,90 \pm 0,19) 10^{-3}$	—
55,0	0,70	$(4,15 \pm 0,51) 10^{-3}$	$(3,48 \pm 1,98) 10^{-4}$
57,5	0,81	$(9,09 \pm 3,50) 10^{-3}$	$(7,45 \pm 2,31) 10^{-4}$
60,0	0,93	$(3,14 \pm 0,81) 10^{-2}$	$(2,12 \pm 0,19) 10^{-3}$

Для описания температурной зависимости констант скорости инактивации холинэстераз использовали уравнение Арренюса:

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT} \quad (5)$$

Это уравнение соблюдается в случае обеих холинэстераз и допускает расчет величины E_a процесса инактивации (рис. 5). Процесс инактивации холинэстераз характеризуется высокими значениями E_a , которые приведены в табл. 3. Судя по литературным данным [9], подобные высокие значения активационной энергии являются весьма характерными для денатурации белков. Согласно общим представлениям о механизме и характере изменения строения белков в процессе их денатурации, предполагают, что величина E_a зависит от природы и количества разрывающихся при денатурации связей [9]. Высокие значения E_a свидетельствуют о разрыве большого числа слабых и, вероятно, не Kooperативных взаимодействий. Разрыв небольшого числа сильных и кооперативных

взаимодействий приводит к относительно низким значениям E_a . Применяя эти выводы в отношении холинэстераз, можно утверждать, что термоннактивация БХЭ сопровождается разрывом большого числа слабых связей, поддерживающих нативную структуру фермента. Полученные результаты свидетельствуют также о том, что связь белка с липидной мембраной, очевидно, уменьшает число критических взаимодействий, разрыв которых приводит к инактивации фермента, где определенную роль могут играть свойства мембраны, также зависящие от температуры. Зависимость ряда физико-химических параметров мембран может быть описана функцией типа уравнения Аррениуса [10]. Получаемые при этом эффективные значения E_a зависят как от природы наблюдаемого процесса, так и от строения и состава мембран. Эти активационные параметры не превышают 15—17 ккал/моль, что значи-

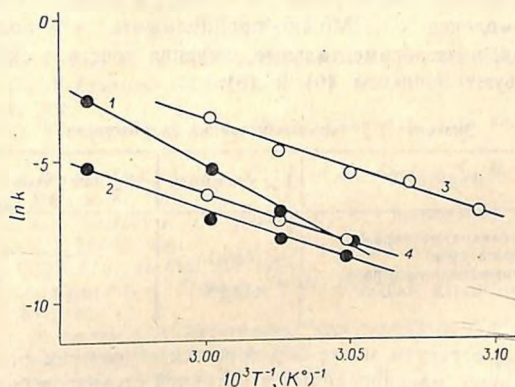
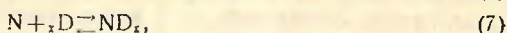


Рис. 5. Определение величины E_a для первой и второй стадий процесса термоннактивации бутирилхолинэстеразы (1 и 2) и ацетилхолинэстеразы (3 и 4)

тельно ниже E_a для термоденатурации мембраносвязанной АХЭ. Интересно добавить, что в этом интервале значений E_a находится активационная энергия 13,8 ккал/моль, полученная для процесса термоннактивации мускаринового холинорецептора мозга [12]. Учитывая результаты опытов по солюбилизации этого мембранного белка [13], можно заключить, что рецепторный белок связан с мембранной структурой очень тесно, и его стабильность определяется, в основном, состоянием липидного бислоя.

Как видно из табл. 3, значения E_a начальной и конечной стадий процесса термоннактивации АХЭ, а также конечной стадии термоннактивации БХЭ близки. Исключением является начальный период термоденатурации растворимой БХЭ, для которого значение $E_a = 114$ ккал/моль отличается от остальных величин E_a . По-видимому, только этот процесс протекает в условиях, значительно отличающихся по ха-

рактеру взаимодействий нативного белка с окружением. Можно объяснить изменения наблюдаемой активационной энергии в ходе процесса денатурации БХЭ образованием между нативными (N) и уже денатурированными (D) молекулами белка комплексов (агрегатов), ND_x , стабилизирующих нативный белок.



Согласно этой схеме, наблюдаемые кинетические закономерности определяются скоростью денатурации N и ND_x , а также условиями образования комплекса ND_x . Можно предположить, что последняя реакция быстрая, и экспериментальные значения констант скорости k_1 и k_2 характеризуют процессы (6) и (8).

Таблица 3

Значения E_a^- термoinактивации холинэстераз

Фермент	E_a^1 , ккал/моль	E_a^2 , ккал/моль
Ацетилхолинэстераза мозга крыс	68 ± 15	78 ± 19
Бутирилхолинэстераза сыворотки лошади	114 ± 8	73 ± 17

Описанные агрегаты могут образоваться с участием разных функциональных групп, маскированных в нативной структуре белка и освобождающихся только при разворачивании его глобулярной структуры в процессе денатурации. Вероятно, что в качестве стабилизирующего компонента могут выступать любые белки, которые денатурируются в данных условиях. Реакционной схемой (6—8) можно объяснить также кинетику денатурации АХЭ мозга, однако в этом случае E_a для стадий (6) и (8) одинакова. Следовательно, количество тех решающих взаимодействий, которые определяют стабильность белка в состояниях N и ND_x , существенно не меняется, в чем может сказываться роль связи этого белка с мембранной структурой.

THERMAL INACTIVATION OF ACETYLCHOLINESTERASE FROM RAT BRAIN AND BUTYRYLCHOLINESTERASE FROM HORSE SERUM

SEPP A. V., KRAUSBERK T. H., JÄRV J. L.

Chair of Organic Chemistry, State University, Tartu, Estonian SSR

The kinetics of thermal inactivation of two different cholinesterases, the membrane-bound acetylcholinesterase from rat brain and the water-soluble butyrylcholinesterase from horse serum has been investigated at

various temperatures. For both enzymes the inactivation reaction can be described as a combination of two first-order processes with different rate constants. These rate constants as well as the ratio of the rapidly and slowly inactivating enzyme quota depend strongly upon temperature. The activation energy (E_a) for the initial step of butyrylcholinesterase inactivation is remarkably high, that of the slow step is lower and is close to the appropriate values for both slow and rapid steps of acetylcholinesterase inactivation. This great change of the reaction rate during the denaturation process as well as the change of the E_a in the case of butyrylcholinesterase may be explained by formation of a complex between the native and denatured protein molecules that stabilizes the native protein against thermal inactivation.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Coleman M. H., Eley D. D. *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 646—657, 1963.
2. Brodbeck U., Di Francisco C., Ott P. *Proc. 3 Meeting Europ. Soc. Neurochem.*, 548—550, 1980.
3. Trevor A. J., Gordon M. A., Parker K. K., Chan S.-L. *Life Sci.*, **23**, 1209—1220 1978.
4. Teng T.-L., Harpst J. A., Lee J. C., Zinn A., Carlson D. M. *Arch. Biochem. Biophys.*, **176**, 71—81, 1976.
5. Ellmann G. L., Courtney K. D., Andres Jr. V., Featherstone R. M. *Biochem. Pharmacol.*, **7**, 88—95, 1961.
6. Berry W. *Biochem. J.*, **49**, 615—620, 1951.
7. Яро Я. Л., Аавиксаир А. А., Годовиков Н. Н., Лангел Ю. Л., Пастъ Э. Э. *Биохимия*, **41**, 827—835, 1976.
8. Березин И. В., Клесов А. А. *Практический курс химической и ферментативной кинетики*, М., Изд-во МГУ, с. 6—8, 1976.
9. Жолд М. *Физическая химия денатурации белков*, М., Мир, с. 212—350, 1968.
10. Cossins A. R. *Biochem. Biophys. Acta*, **470**, 395—411, 1977.
11. Graziana V., Livne A. J. *Membrane Biol.*, **7**, 275—284, 1972.
12. Лангел Ю. Л., Ринкен А. А., Тяхепылд Л. Я., Яро Я. Л. *Нейрохимия*, **1**, 343—352, 1982.
13. Hurko O. *Arch. Biochem. Biophys.*, **190**, 434—445, 1978.

Государственный
университет, Тарту

Поступила 26. VII 1982

УДК 577.153

ВЛИЯНИЕ ОТРАВЛЕНИЯ КРЫС ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИМ ИНГИБИТОРОМ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ НА АКТИВНОСТЬ Na⁺, K⁺-АТФазы ГОЛОВНОГО МОЗГА

КАЗЕННОВ А. М., МАСЛОВА М. Н., САВИНА Г. В., ШАЛАБОВ Д. А.

Изучена активность АХЭ и Na⁺, K⁺-АТФазы в коре больших полушарий мозга крыс в разные сроки после отравления животных фосфорорганическим ингибитором АХЭ Гд-7 (0,5 мкмоль/кг). Активность АХЭ через 2,5 ч после отравления была ингибирована на 85%; в первые двое суток фермент быстро реактивировался: до 50 и 60% от исходного уровня соответственно через 24 и 48 ч. После введения животным Гд-7 в общей митохондриальной и микросомной фракциях коры больших полушарий уже через 2,5 ч было обнаружено повышение активности Na⁺, K⁺-АТФазы. В митохондриальной фракции активность Na⁺, K⁺-АТФазы оказалась повышенной в течение последующих двух суток и была наибольшей через 24 ч (132% от нормального уровня). Изменения в активности Na⁺, K⁺-АТФазы наблюдались только в случае обработки фракций мозга дезоксихолатом натрия.

В настоящее время системе холинорецептор—ацетилхолин—АХЭ приписывают ведущую роль в процессе проведения нервного импульса в холинергических синапсах НС [1—3]. Этот процесс нарушается при отравлении животных фосфорорганическими ингибиторами (ФОИ) в результате инактивации АХЭ и накопления избыточных количеств медиатора ацетилхолина (АХ) в синапсах [1].

При тяжелом отравлении ФОИ выжившие животные довольно быстро адаптируются, несмотря на почти полное ингибирование АХЭ головного мозга; однако мало известно о компенсаторных биохимических механизмах этой адаптации. Следует отметить, что при действии АХ и других холиномиметиков в высоких концентрациях, а также антихолинэстеразных соединений развивается стойкая деполяризация постсинаптической мембраны вследствие повышения проницаемости мембран для одновалентных катионов и изменяется внутриклеточное соотношение Na⁺ и K⁺ [1]. Логично предположить, что для восстановления нормального трансмембранного потенциала постсинаптической мембраны должны изменяться процессы активного транспорта одновалентных катионов, за который ответственна Na⁺, K⁺-АТФаза, играющая ведущую роль в генерации клеточного потенциала [4].

В литературе имеются единичные сообщения об изменении активности Na⁺, K⁺-АТФазы при отравлении животных ФОИ. Так, в

работе Jovic и соавт. [5] было показано, что отравление животных смертельными дозами зомана и диизопропилфторфосфата сопровождается снижением активности Na^+ , K^+ -АТФазы головного мозга на 30—40%. При хроническом (на протяжении 12—24 недель) отравлении крыс диизопропилфторфосфатом Glow и соавт. [6] наблюдали активацию Na^+ , K^+ -АТФазы в микросомах головного мозга.

В этой работе мы попытались проследить характер изменения активности Na^+ , K^+ -АТФазы в головном мозгу крысы в первые двое суток после отравления животных легкопроникающим в мозг ФОИ Гд-7— $[(\text{CH}_3)(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})\text{P}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SC}_2\text{H}_5]$ [7] в дозе, которая вызывает тяжелое, но не смертельное отравление.

Материалы и методы

Работа была выполнена на белых крысах-самцах массой 180—250 г, которым внутримышечно вводили Гд-7, разведенный на физиологическом растворе. Контрольным животным вводили физиологический раствор в таком же объеме. После введения ФОИ крыс забивали декапитацией через 2,5; 24 и 48 ч, и для исследования брали смешанную (артериальную и венозную) кровь и головной мозг. Мозг после декапитации быстро извлекали, на холоду освобождали от оболочек и выделяли кору больших полушарий. Затем ткань гомогенизировали в 9-кратном объеме 0,25 М сахарозы на 0,05 М трис-буфере (pH 7,4) в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком. Ядра и неразрушенные клетки удаляли путем центрифугирования в течение 10 мин при 600 g. Надосадочную фракцию разделяли далее на общую митохондриальную и микросомно-цитоплазматическую фракции центрифугированием при 10000 g в течение 20 мин.

В полученных фракциях определяли активность АХЭ по методу Ellman [8] в нашей модификации [9], содержание белка по методу Lowry [10] и активность Mg^{2+} -АТФазы и Na^+ , K^+ -АТФазы [11]. Для выявления максимальной активности АТФаз использовали методический прием, заключающийся в предварительной обработке фракций мозга детергентом дезоксихолатом натрия (ДОХ) с целью разрушения замкнутых мембранных структур, которые образуются при гомогенизации и могут «экранировать» активные центры мембраносвязанных ферментов [11, 12]. Для этого к 0,2 мл изучаемой фракции добавляли 0,2 мл 0,25% раствора ДОХ, приготовленного на 0,25% М растворе сахарозы в 0,05 М трис-буфере (pH 7,4) и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. После этого общий объем пробы доводили до 2,0 мл раствором сахарозы, и 0,1 мл получившейся смеси вводили в инкубационную среду для определения активности АТФаз (общий объем 0,4 мл). Инкубация продолжалась 30 мин при 30°.

Результаты и обсуждение

В предварительной серии опытов была подобрана максимально переносимая крысами доза Гд-7. Она составила 0,5 мкмоль/кг массы животных. Первые признаки интоксикации развивались через 25—30 мин и проявлялись в беспокойстве животных и выраженном бронхоспазме. Еще через несколько минут развивались фибрилляция мышц и парез конечностей. Через 2—2,5 ч признаки интоксикации начинали ослабевать, а еще через 1 ч крысы начинали активно двигаться и на следующий день практически не отличались от контрольных.

Таблица 1

Активность АХЭ (мкмоль/мг белка/ч) головного мозга и ХЭ (мкмоль/мл/ч) крови в разные сроки после отравления крыс Гд-7

Ткань	Контроль	Срок после введения Гд-7		
		2,5 ч n=7	24 ч n=7	48 ч n=6
Общая митохондриальная фракция коры больших полушарий	3.08±0,18	0,52±0,05 (17%)*	1,70±0,07 (55%)	2,00±0,12 (65%)
Микросомно-цитоплазматическая фракция коры больших полушарий	2,27±0,17	0,25±0,02 (11%)	1,14±0,16 (50%)	1,31±0,69 (57%)
Кровь	52,5±1,4	3,0±1,1 (5,5%)	13,5±2,3 (26%)	31,0±0,9 (59%)

* в скобках указана относительная активность АХЭ и ХЭ в % к контролю

При изучении активности АХЭ в головном мозгу и холинэстеразы (ХЭ) крови у отравленных крыс были получены следующие результаты (табл. 1). Гд-7 в дозе 0,5 мкмоль/кг вызывал через 2,5 ч угнетение активности ХЭ крови на 95%, а активности АХЭ мозга приблизительно на 85%. В первые два дня после введения животным ФОИ наблюдалось довольно быстрое восстановление активности АХЭ в головном мозгу и ХЭ в крови, причем в мозгу реактивация АХЭ за первые сутки составила около 45%, за вторые—около 10%, а в крови соответственно 20 и 35%. Такое быстрое восстановление активности фосфорилированной АХЭ наблюдали и другие исследователи [13, 14], применявшие сходные по химическому строению ФОИ. Считают, что это происходит в основном за счет спонтанной реактивации фермента.

У контрольных и отравленных Гд-7 животных в общей митохондриальной и микросомно-цитоплазматической фракциях была определена активность Mg^{2+} -АТФазы и Na^+ , K^+ -АТФазы до и после инкубации их с ДОХ. В необработанных ДОХ митохондриальной и микросомной фракциях коры больших полушарий контрольных животных активность Na^+ , K^+ -АТФазы составила соответственно 1,44 и 0,77

мкмоль/мг белка/ч и была приблизительно в 2 раза меньше, чем активность Mg^{2+} -АТФазы. После инкубации обеих фракций с ДОХ происходило повышение активности Na^{+} , K^{+} -АТФазы, причем это повышение оказалось более выраженным в митохондриальной фракции (в 5,6 раза), чем в микросомной (в 2 раза). Активность Mg^{2+} -АТФазы под действием ДОХ изменялась в меньшей степени: в митохондриальной фракции она повышалась на 60%, а в микросомной снижалась в 2 раза (табл. 2).

Таблица 2

Влияние отравления крыс Гд-7 на активность АТФаз (мкмоль/мг белка/ч) в общей митохондриальной и микросомно-цитоплазматической фракциях коры больших полушарий головного мозга

Фракция	Ферментативная активность	Детергент	Контроль n = 10	Срок после введения Гд-7		
				2,5 ч n=7	24 ч n=7	48 ч n=6
Общая митохондриальная	Σ АТФазы	—	4,70±0,17	4,80±0,25	5,37±0,26	5,10±0,13
		ДОХ	13,28±0,42	14,83±0,74	15,90±0,57	14,62±0,33
	Mg^{2+} -АТФаза	—	3,24±0,14	3,43±0,24	3,75±0,16	3,49±0,14
		ДОХ	5,19±0,32	4,82±0,32	5,21±0,36	5,05±0,20
	Na^{+} , K^{+} -АТФаза	—	1,44±0,07	1,45±0,13	1,60±0,11	1,61±0,06
		ДОХ	8,09±0,32	10,05±0,52*	10,69±0,30***	9,56±0,45*
Микросомно-цитоплазматическая	Σ АТФазы	—	1,92±0,06	2,12±0,06	1,93±0,07	1,73±0,10
		ДОХ	2,12±0,11	2,60±0,16	2,49±0,20	1,95±0,07
	Mg^{2+} -АТФаза	—	1,15±0,05	1,43±0,15	1,19±0,06	1,07±0,09
		ДОХ	0,62±0,05	0,67±0,04	0,66±0,04	0,67±0,05
	Na^{+} , K^{+} -АТФАза	—	0,77±0,05	0,79±0,04	0,74±0,04	0,66±0,02
		ДОХ	1,50±0,14	1,92±0,15*	1,83±0,22	1,27±0,05

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

В табл. 2 представлены также данные активности Mg^{2+} -АТФазы и Na^{+} , K^{+} -АТФазы во фракциях коры больших полушарий мозга крыс в разные сроки после отравления животных Гд-7. Следует отметить, что изменений активности Na^{+} , K^{+} -АТФазы в необработанных ДОХ фракциях мозга через 2,5; 24 и 48 ч после введения ФОИ по сравнению с контрольными животными не было обнаружено. Однако в случае применения ДОХ имело место повышение активности Na^{+} , K^{+} -АТФазы в микросомной фракции уже через 2,5 ч после введения животным Гд-7 (на 28%), которое сохранялось через 24 ч, однако через 48 ч активность фермента снижалась до уровня ниже исходного. Заметный прирост активности Na^{+} , K^{+} -АТФазы, выявляемой с помощью ДОХ, наблюдался в общей митохондриальной фракции коры больших полушарий уже через 2,5 ч (на 23%) и особенно через сутки (на 32%); активность фермента оставалась повышенной и через 48 ч (на 18%). Активность Mg^{2+} -АТФазы в обеих фракциях коры больших полушарий не изменялась как в случае определения ее в исходных

фракциях, так и во фракциях, обработанных ДОХ. Приведенные данные свидетельствуют о том, что при отравлении ФОИ АХЭ Гд-7 в митохондриальной и микросомной фракциях коры больших полушарий крысы имеет место повышение активности Na^+ , K^+ -АТФазы.

Как известно, в общей митохондриальной фракции 80% активности Na^+ , K^+ -АТФазы сосредоточено в синапсосомах, а остальная часть—в крупных фрагментах плазматической мембраны [15, 16]. В микросомной фракции большая часть фермента сосредоточена в мелких фрагментах плазматической мембраны [17]. Таким образом, можно сделать вывод, что обнаруженная активация Na^+ , K^+ -АТФазы под действием ДОХ в митохондриальной фракции происходит за счет разрушения (или повышения проницаемости мембран) синапсосом и крупных везикул плазматической мембраны, а в микросомной фракции—за счет дезинтеграции мелких везикул плазматической мембраны.

Обнаруженные изменения активности Na^+ , K^+ -АТФазы не были обусловлены гипоксией, которая имеет место при отравлении ФОИ, так как в специальной серии опытов, в которой животных подвергали воздействию гипоксической гипоксии (экспозиция в течение 2 ч в барокамере при разрежении воздуха, соответствующем 8000 м над уровнем моря), не было обнаружено изменения активности этого фермента, а также активности АХЭ.

Можно сделать вывод, что выявленные изменения активности Na^+ , K^+ -АТФазы в больших полушариях мозга при отравлении животных Гд-7 являются следствием действия самого ФОИ.

Работами Елаева и соавт. [18—20] показано, что как *in vivo*, так и в модельной системе *in vitro* АХ и другие холинотермические вещества способны в короткие сроки (в течение 1,5 ч) активировать Na^+ , K^+ -АТФазу, а также синтез РНК и белка в нервных клетках. В исследовании Clouet, Waelsch [21] продемонстрировано, что угнетение АХЭ мозга крыс ФОИ на 90% вызывает ускорение включения ^{14}C -лизина в белки мозга в первые двое суток после введения ФОИ животным.

Основываясь на этих работах, можно предположить, что повышение активности Na^+ , K^+ -АТФазы, выявленное при отравлении крыс Гд-7, обусловлено индукцией синтеза ферментативного белка в нервных клетках, причем это свойственно лишь той части фермента, которая выявляется после обработки субклеточных фракций ДОХ и, следовательно, сосредоточена в непроницаемых для АТФ везикулярных структурах плазматической мембраны.

Быстрое, уже через 2,5 ч, повышение активности Na^+ , K^+ -АТФазы в митохондриальной фракции, где ферментативная активность локализована преимущественно в митохондриях синапсосом, также можно объяснить индукцией синтеза фермента, если учесть, что синапсосомы

мы, выделенные из коры больших полушарий крыс, содержат РНК и обладают собственной белоксинтезирующей системой, которая локализована в синантосомных митохондриях и мембранных компонентах [22]. Высказанное предположение требует дальнейших экспериментальных подтверждений.

Использование детергентов при определении активности Na^+ , K^+ -АТФазы выявляет значительно большую, чем в интактном гомогенате, ферментативную активность и исключает ее зависимость от проницаемости мембран, что особенно важно при изучении влияния различных экспериментальных воздействий на ферментативную активность.

EFFECT OF ORGANOPHOSPHOROUS INHIBITOR OF ACETYLCHOLINESTERASE (AChE) ON THE ACTIVITY OF BRAIN Na^+ , K^+ -ATPase

KAZENNOV A. M., MASLOVA M. N., SAVINA G. V., SCHALABODOV A. D.

I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry,
USSR Academy of Sciences, Leningrad

The effects of organophosphorous compound Gd-7 (0.5 mmoles/kg, i. m) on the activities of AChE and Na^+ , K^+ -ATPase in rat cerebral cortex have been studied in vivo. This dose of Gd-7 induced a heavy but not lethal intoxication. The activity of AChE was inhibited by 85% in 2.5 h after injection and restored to 50% and 60% of the normal level in 24 and 48 h, respectively. The injection of Gd-7 caused a significant increase in the activity of Na^+ , K^+ -ATPase from crude mitochondrial and microsomal fractions; the most pronounced one in the crude mitochondrial fraction—132% of the normal level (80% of the enzymic activity was detected in synaptosomes). These changes in the activity of Na^+ , K^+ -ATPase were observed only after treatment of the particulate fractions with sodium desoxycholate disrupting the vesicular membrane structures.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Koelle G. B. (ed.) Cholinesterases and anticholinesterase agents, Springer-Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg, p. 187–298, 570–678, 1963.
2. Silver A. The biology of cholinesterases, North-Holland American Elsevier, Amsterdam-Oxford, 1974.
3. Келле Дж. Б.—В кн.: Международный симпозиум. Сравнительная фармакология синантических рецепторов, Л., Наука, с. 6–15, 1977.
4. Skou J. C. *Physiol. Rev.*, 45, 596–617, 1965.
5. Jovic P., Bachelard H. S., Clark A. G., Nicholas P. C. *Biochem. Pharmacol.*, 20, 3, 519–527, 1971.
6. Glow P. H., Opt L. J., Charnock J. S. *Arch. Intern. Pharmacodyn.*, 198, 22–28, 1972.
7. Кабачник М. Н. О механизме физиологического действия фосфорорганических соединений, М., Наука, 1965.
8. Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V., Featherstone R. M. *Biochem. Pharmacol.*, 7, 2, 88–95, 1961.

9. Маслова М. Н., Резник Л. В. Укр. биохим. ж., 48, 4, 450—453, 1976.
10. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., 193, 265—275, 1951.
11. Казеннов А. М., Маслова М. Н. Ж. эвол. биох. и физиол., 16, 5, 430—435, 1980.
12. Казеннов А. М., Маслова М. Н., Резник Л. В. Биохимия, 44, 2, 214—220, 1979.
13. Рейнер Э. Бюл. ВОЗ, 44, 1, 113—115, 1972.
14. Austin L., James K. A. C. J. Neurochem., 17, 5, 705—707, 1970.
15. Gilbert J. C., Wyllie M. G. Brit. J. Pharmacol., 56, 1, 49—57, 1976.
16. Паладин А. В., Курсенко О. В., Вавилова Г. Л. Биохимия, 35, 2, 404—411, 1970.
17. Медди Э. Биохимические исследования мембран, М., Мир, с. 30—51, 1979.
18. Елаев Н. Р., Семенов Е. В. Биохимия, 39, 3, 636—640, 1974.
19. Елаев Н. Р. Цитология, 20, 8, 970—972, 1978.
20. Елаев Н. Р. Биохимия, 45, 10, 1749—1754, 1980.
21. Clouet D. H., Waelsch H. J. Neurochem., 10, 1, 51—63, 1963.
22. Morgan I. G., Austin L. J. Neurochem., 15, 1, 41—51, 1968.

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

Поступила 2. III 1982

УДК 577.175.52+577.175.73+577.175.82/8

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА КАРДИОАКТИВНОГО ТРИПТИЧЕСКОГО ФРАГМЕНТА БЕЛКА-НОСИТЕЛЯ НЕЙРОГОРМОНА «С».

СРАПИОНЫЯН Р. М., СААКЯН С. А., СААКЯН Ф. М., ГАЛОЯН А. А.

Из трипсинового гидролизата кардиоактивного гликопротеина—носителя нейрого르몬а «С», используя ионообменную хроматографию, гель-фильтрацию через глицин-амидированный сефадекс G-10, бумажную хроматографию и жидкостную хроматографию высокого давления, удалось выделить гликопептид, сохранивший нативную коронарорасширяющую активность. Указанный гликопептид является эффективным ингибитором фосфодиэстеразы сАМР мозга и структурно близким, по данным масс-спектрального анализа, нейрого르몬у «С» соединением. Наличие углеводного компонента в нем подтвердилось качественной реакцией Шифф-перiodной кислоты. Соотношение глюкозамина и галактозаминов приблизительно равно 2,5. Среди аминокислотных остатков преобладают серин, глицин и аспаргин.

Можно полагать, что в состав гликопептида входит гетеросахаридная цепь, состоящая из глюкозы, глюкозамина и галактозамина.

В настоящее время в литературе накоплен большой фактический материал о предшествующих формах гормонов как продуктах прямой трансляции в их биосинтезе и трансформации в клетках путем протеолиза в гормоны, секретируемые железами в кровь [1—5]. При различных функциональных состояниях ЦНС крупные молекулы, подвергаясь гидролизу пептидазами, образуют новые эндогенные биоактивные соединения.

В качестве примера можно указать на гликопептид [6, 7], выделенный нами из триптического гидролизата кардиоактивного гликопротеина—носителя нейрого르몬а «С», описанного ранее [8, 9]. Указанный гликопептид представляет несомненный интерес, поскольку не только обладает эффективной способностью расширять коронарные сосуды, но и вызывает значительное ингибирование фосфодиэстеразы сАМР мозга и принимает участие в регуляции активности фосфорилазы в различных органах у крыс [10]. Кроме того, как показали результаты масс-спектрального анализа, гликопептид является соединением [7], структурно близким нейрого르몬у «С», который ранее был обнаружен в нативной форме в составе низкомолекулярных соединений укусно-кислого экстракта гипоталамической части мозга [11].

Исходя из вышесказанного, было целесообразно дальнейшее изучение этого соединения вести в сравнительном аспекте. Некоторые итоги этих исследований изложены в настоящем сообщении.

Материалы и методы

В работе были использованы следующие реактивы: трипси́н, дважды перекристаллизованный, фирмы «Worthington» (США), диметилформамид фирмы «Merck» (ФРГ), додецилсульфат натрия, какадидовая кислота и водорастворимый карбонимид фирмы «Ferk», глицинимид фирмы «Diskinson and Co.» (США), сефадексы G-100, G-50, G-25, G-10 фирмы «Pharmacia» (Швеция), диэтиламиноэтилцеллюлоза фирмы «Whatman» (Англия), амфолины «ЛКВ» (Швеция).

Гель-фильтрацию белков проводили на колонке с сефадексом G-100, размерами 2×50 см, а для разделения триптических фрагментов использовали G-25, G-10 и глицинамидированный сефадекс G-10. Фракции собирали на коллекторе типа SF-62 (ЧССР) со скоростью от 10 до 60 мл/ч. В качестве элюирующего буфера применяли борно-боратный буфер (pH 8) и бидистиллированную воду, которые подавались микронасосом типа 6017 (ЧССР). В качестве маркера использовали 0,01%-ный раствор голубого декстрана. Глицинамидированную пробку сефадекса G-10 вели по методу Greig и соавт. [12] с некоторыми модификациями [13].

Ионообменную хроматографию проводили на анионите ДЭАЭ-целлюлозе, уравновешенной 0,005 М натрий-фосфатным буфером, pH 6,5. Применяли линейную градиентную элюцию по соответствующей схеме, где значительный градиент концентрации соли сочетался с небольшим понижением pH буфера от 6,5 до 5. Скорость элюции составляла 20 мл/ч.

Диск-электрофорез на ПААГ проводили в системе гелей по Мауреру [14] по методу Davics [15]. Продолжительность форе́за составляла обычно 3 ч при силе тока в 4 мА на трубку. Окрашивание гелей проводили 0,5%-ным раствором амидочерного 10 В в течение 30 мин.

Идентификацию гликопротеинов осуществляли по методу Zachariis и соавт. [16] с некоторыми изменениями. Полиакриламидные гели обрабатывали 10%-ным ТХУ в течение 30 мин, отмывали несколько раз дистиллированной водой, окисляли углеводы 1%-ным KIO_4 в 3%-ной CH_3COOH в течение 30 мин при 0° . Далее промывали 30 мин под струей воды и оставляли на ночь в 7%-ном растворе CH_3COOH . Отмытые гели окрашивали реактивом Шиффа (0,5 М $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ в 1н. HCl) в течение 1 ч в темноте при 20° . Затем 3—4 раза промывали 1%-ным раствором Na-m-бисульфита в 0,1 н. HCl (по 10 мин). По появлению окрашенных в малиновый цвет зон судили о наличии гликопротеидов.

Содержание белка определяли по методу Lowry и соавт. [17]. Определение оптической плотности растворов производили через 1 ч после приливания реактива Фоллина на фотокolorиметре типа Н-57 при 525 нм.

Изоэлектрофокусирование проводили на приборе фирмы «ЛКВ» с колонкой объемом 110 мл при температуре 4° . Испытуемые образцы перемещали в 3%-ный раствор амфолинов с интервалами pH 5—7 при сту-

пенчатом изменении напряжения. Продолжительность фокусирования составляла 48 ч, конечное напряжение—500 В, сила тока—0,8 мА.

Ферментативный гидролиз трипсином и химотрипсином проводили в аммонийбикарбонатном буфере, pH 8, в течение 18 ч; пепсином—в буферной смеси растворов муравьиной и уксусной кислот, pH 2. Соотношение фермент—субстрат поддерживали 1:80.

Нисходящую хроматографию на бумаге FN-11 осуществляли в системе растворителей бутанол—уксусная кислота—вода (4:1:5).

Биологическое тестирование проводили *in situ* на кошках под уретановым наркозом по методу Mogawitz, Zahn [18].

Аминокислотный анализ проводили на автоматическом анализаторе фирмы «Liquiment» (ФРГ). Гидролиз испытуемых образцов вели в 5,7 н. HCl в запаянных ампулах при 110° в течение 24 ч. Использовали ионообменную смолу ДС-6А «Dugum» в колонке размерами 0,45×35 см. Анализ проводили в ступенчатом градиенте Na-цитратного буфера: 0,2 М, pH 3,25; 4,25; 1,1 М, pH 7,9. Скорость элюции—20 мл/ч. Эта часть работы выполнена в лаборатории химии белка Института биорганической химии АН СССР.

Углеводный анализ метилированного, ацетилированного и силлированного производных гидролизованного в 4 н. HCl образца проводили в капиллярной колонке хроматографа размерами 0,5×0,5 мм×45 см, с фазой SE—30. Газ-носитель—гелий 0,5 мл/мин. Температурный режим—140—220°, градиент—1—2° в мин, детектор—пламенно-ионизационный. В качестве стандарта использован маннитол.

Аминосахара определяли на анализаторе «Liquiment Labatron» (ФРГ), на колонке размерами 0,4×10,5 см со смолой ДС-6А (США) в 0,35 М Na-цитратном буфере, pH 5,28, скорость элюции—20 мл/ч. Детекция с помощью О-фталевого альдегида в 0,4 н. растворе боратного буфера, скорость—10 мл/ч.

Результаты и обсуждение

Выделение и очистка. Электрофоретически гомогенный коронаро-расширяющий белок-гормональный комплекс, условно обозначенный нами как ЕНС, изолировали из гипоталамусов крупного рогатого скота по схеме (рис. 1), описанной ранее [9]. После диссоциации низкомолекулярных соединений в результате анализа белка против 0,1 н. раствора уксусной кислоты в течение 48 ч при постоянном встряхивании его денатурировали кипячением, либо инкубировали с 6 М мочевиной. Затем белковый раствор охлаждали до 37° и добавляли к нему трипсин, разведенный в аммоний-бикарбонатном буфере. Фермент-субстратное соотношение равнялось 1:80. Ферментативную реакцию приостанавливали после 18-часовой инкубации, и продукты триптического гидролизата дифференцировали гель-фильтрацией через сефадекс G-25. Дальнейшую очистку активного фрагмента производили с помощью бумажной хроматографии, повторной фильтрации через глицинамидированный сефадекс G-10 (рис. 2).

При гель-фильтрации продуктов триптического гидролиза БНС выявлялось 5 фракций, пики которых отмечены в диапазоне 238—278 нм (рис. 3). При биологическом тестировании полученных фракций коронарорасширяющая активность была обнаружена в III пике, элюируясь с колонки в третьем объеме элюента (300—320 мл). Фракция была условно обозначена как ТфБНС (триптический фрагмент белка-носителя нейрогомона «С»). После хроматографии указанной фракции на бумаге элюат зоны, соответствующей R_f 0,15, где была обнаружена коронарорасширяющая активность, подвергли гель-фильтрации, используя сефадекс G-10. Материал пика, соответствующего IV-му объему элюента, представлял собой гликопептид с кардиотропной активностью.

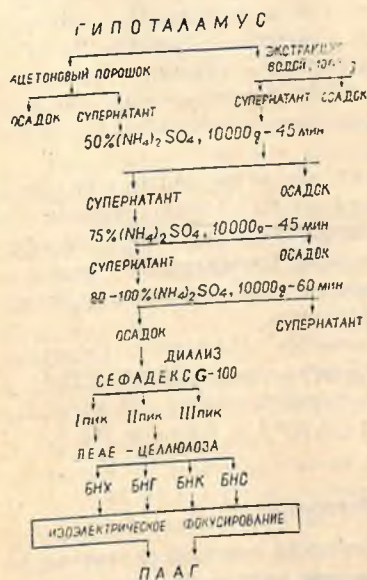


Рис. 1. Схема выделения и очистки кардиоактивных белков из гипоталамусов крупного рогатого скота

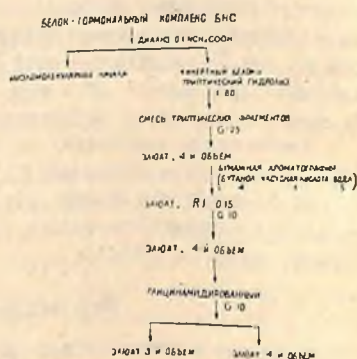


Рис. 2. Схема выделения и очистки кардиоактивного триптического фрагмента белка-носителя нейрогомона «С» (БНС)

Поскольку в процессе работы была обнаружена исключительная адсорбирующая способность этого соединения, было целесообразно использовать на последнем этапе очистки колонку с сефадексом G-10, обработанную глицинамидированием [13]. Эффективность применяемого способа была очевидной; как показали результаты исследований, этим методом не только удалось получить гомогенный препарат ТфБНС в адекватном количестве, но и отдиссоциировать это вещество на две активные формы, обозначенные по порядку элюирования из колонки как ТфБНС₃ и ТфБНС₄ (рис. 4). Они отличались друг от друга про-

филом элюций и спектральной характеристикой, выявляя, однако, одинаковую способность расширять коронарные сосуды. Действие этих соединений характеризуется достаточно длительным латентным периодом (рис. 5): коронарорасширяющий эффект начинался лишь через 20—30 мин после введения препарата, достигая своего максимума на 80-й мин. При этом отмечалось плавное динамическое нарастание коронарорасширяющего эффекта на фоне некоторого падения кровяного давления и сильного увеличения объемной емкости крови, оттекающей из венозных сосудов сердца, приблизительно на 250—300% по сравнению с нормой. Аналогичным воздействием обладает кардиоактивный нейрого르몬 «С», выделенный из состава низкомолекулярных соединений гипоталамуса крупного рогатого скота.

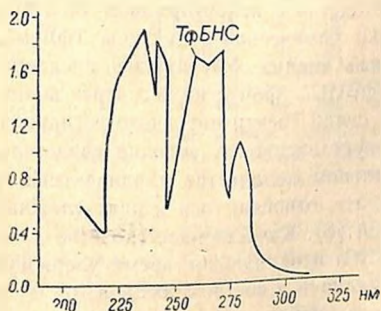


Рис. 3. Профиль элюции продуктов триптического гидролизата БНС при гель-фильтрации через сефадекс G-25; на оси абсцисс—измерение в диапазоне волн 200—350 нм, на оси ординат—оптическая плотность

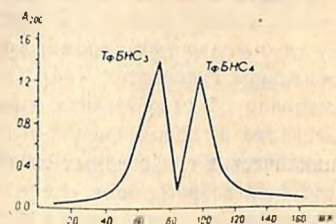


Рис. 4. Профиль элюции ТфБНС через глицинамидированный сефадекс G-10, колонка размерами 1×50 см. Скорость элюции—10 мл/час. На оси абсцисс—объем элюента, на оси ординат—поглощение при 200 нм

Дальнейшие работы были проведены с ТфБНС₄, так как он проявлял большое сходство с нейрого гормоном «С» по способности ингибировать ФДЭ сАМР и активировать фосфорилазу в различных органах [10]. Структурные особенности, выявленные на основании масс-спектрального анализа этих соединений, сделали правомочным предположение о сходстве их строения [6]. Можно полагать, что дальнейшая деструкция этого фрагмента с сохранением активного региона даст возможность выявить его структурную гомологию с нейрого гормоном «С».

Аналогия ТфБНС₄ с нейрого гормоном «С» выявлена и в резистентности по отношению к денатурирующим агентам, температурным и ферментативным воздействиям, растворимости в воде (рН 5,5) и различных кислых растворителях (рН 2—4), проникновению через полупроницаемую мембрану, характерной слабой нингидрин-положительной реакцией. Одной из уникальных особенностей ТфБНС₄, так же, как и нейрого гормона «С», является его высокая стабильность к действию

щелочей, кислот и высокой температуры (до 105°). При всех описанных условиях они сохраняют биологическую активность приблизительно на 80%.

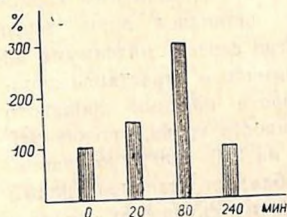


Рис. 5. Изменение объемной емкости крови за единицу времени при внутривенном введении кошкам элюата ТфБНС. Наркоз—уретан с хлоралозой. На оси абсцисс—время в мин, на оси ординат—объемная емкость крови в %

Выше уже говорилось о том, что ответ на вопрос, действительно ли изучаемая фракция проявляет сходство с нейрогормоном «С», был получен после попытки расшифровки химической структуры ТфБНС₄, используя хромато-масс-спектральный анализ. Убедившись предварительно в гомогенности препарата ТфБНС₄, пропустив его через колонку газо-жидкостного хроматографа, сняли спектр нативного и гидролизованного препаратов ТфБНС₄. Сопоставление их величин свидетельствовало об относительно максимальном количестве кардиоактивного вещества в гидролизованном препарате, относящегося к ряду сложных циклических гликозидных соединений [6]. Качественное сходство масс-спектров нейрогормона «С» и ТфБНС₄ и одинаковое время удерживания основного вещества говорят о наличии в составе белкового носителя нейрогормон «С»-подобного соединения.

Одновременно можно было думать и о структурной гетерогенности ТфБНС₄. Для проверки этого предположения было определено наличие углеводов в образце ТфБНС₄ после электрофореза в 7,5%-ном ПАА методом периодная кислота—реактив Шиффа [16]. Были получены воспроизводимые данные, демонстрирующие наличие одной, окрашенной в малиновый цвет, зоны, что свидетельствовало о наличии углеводного компонента. С целью выяснения его состава был проведен химический анализ на автоматическом аминокислотном анализаторе, включающий раздельное определение аминокислот, гексозаминов и нейтральных сахаров.

Известно, что за последнее время количественный метод определения гексозаминов претерпел значительную эволюцию. Были преодолены трудности, связанные с определением и идентификацией этих соединений, прежде всего с сокращением продолжительности анализа с 900 до 150 мин [19] и повышением чувствительности от 250 до 1 нмоль исследуемого образца [20].

Настоящий анализ проведен со стандартной смесью, состоящей из 1,5 нмоль гексозаминов (рис. 6, нижний снимок) и гидролизата ТфБНС₄, где образец был взят в количестве 0,030 мг. При этих условиях достигнуто отделение глюкозаминов и галактозаминов за 140 и 157 мин соответственно; соотношение их было равным приблизительно

2,5. Кроме того, в регионе между фенилаланином и лизином, а также гистидином и аргинином обнаруживаются два минорных пика (на рисунке отмечены стрелками), не совпадающие с аминокислотами и взятыми в качестве стандарта гексозами. Учитывая время выхода с колонки, можно предположить, что они являются дисахаридами.

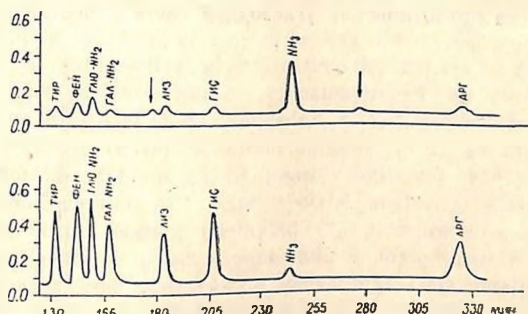


Рис. 6. Кривая анализа аминокислот, гексозаминов стандартной смеси (нижний снимок) и ТфБНС₄ (верхний снимок) после предварительного гидролиза 4 н. НСl в течение 4 ч

Результаты общего углеводного анализа ТфБНС₄ продемонстрировали наличие глюкозы, выходящей двумя пиками, соответствующим её α - и β -формам (рис. 7).

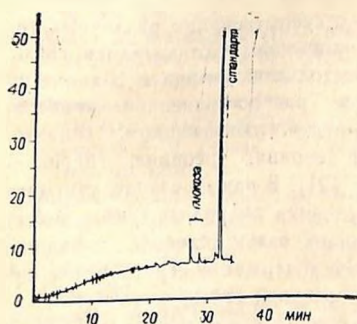


Рис. 7. Кривая общего углеводного анализа ТфБНС₄. На оси абсцисс— время выхода глюкозы, на оси ординат—содержание сахара в нмоль

На рис. 8 приведена кривая аминокислотного анализа того же образца ТфБНС₄, но уже подвергнутого гидролизу 6 н. НСl в течение 24 ч. Увеличение продолжительности времени гидролиза и концентрации НСl приводило к появлению целого ряда аминокислотных остатков, выходящих из колонки между глицином и лизином: аспарагина, серина, аланина, валина, изолейцина, лейцина. Среди них отмечалось преобладающее содержание таких полярных аминокислот, как серин, глицин, аспарагин.

Резюмируя вышеприведенные данные, можно прийти к выводу о наличии в составе ТфБНС₄ гетеросахаридной цепи, состоящей из глюко-

козы, глюкозамина и галактозамина. В настоящее время трудно однозначно оценить функциональную значимость углеводной части ТфБНС₁, но можно, по крайней мере, утверждать, что она своей гидрофобностью, электрическими свойствами делает ТфБНС₄ более стойким к различным воздействиям (щелочным и температурным), сохраняя его биологическую активность. Пока мы не располагаем точными сведениями относительно места присоединения углеводной части к пептидной.

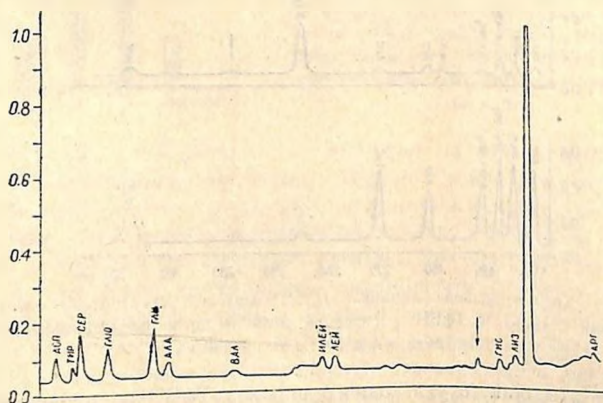


Рис. 8. Кривая аминокислотного анализа ТфБНС₄ после предварительного гидролиза 6 л. HCl в течение 24 ч

Из литературных данных известно о существовании различных типов углеводно-пептидной связи, как, например: N-гликозидная связь, осуществляемая между углеводом N-ацетилглюкозамина и N-концевой амидной группой аспарагина; не менее распространенной является также O-гликозидная связь между N-ацетилглюкозамином, галактозой, ксилозой и гидроксильной группой серина, треонина, гидроксипролина, гидроксилизина, гидроксипролина и ряда других [21]. В нашем случае, учитывая стабильность ТфБНС₄ при жестких условиях гидролиза, что может свидетельствовать о возможности наличия связи углевода с гидроксильной группой оксипролина и высокое содержание серина в нем, более вероятным кажется наличие O-гликозидной связи.

Другой нерешенной проблемой является место нахождения ТфБНС₄ в белке-предшественнике. Является ли он терминальным концом или же служит пептидно-дисульфидным мостиком, пока не выяснено. Возможно, что ТфБНС₄—место опознавания предшествующей биоактивной молекулы, в которой функциональная часть ковалентно присоединена к адресованному соединению. Дальнейшие исследования внесут определенную ясность относительно типа связи углевода с пептидом и его полифункциональной роли.

ISOLATION AND CHARACTERISTICS OF CARDIOACTIVE TRYPTIC FRAGMENT OF NEUROHORMONE "C" PROTEIN-CARRIER

SRAPIONYAN R. M., SAAKYAN S. A., SAAKYAN F. M., GALOYAN A. A.

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

A coronary dilatory glycopeptide has been purified from trypsin hydrolyzate of cardioactive glycoprotein—the carrier of neurohormone "C"—by means of ion-exchange chromatography on DEAE-cellulose, gel filtration on glycineamide Sephadex G-100, paper chromatography and high performance liquid chromatography. This glycopeptide is an effective inhibitor of brain cAMP phosphodiesterase and is structurally related to neurohormone "C" (mass-spectral analysis). Staining by the periodic acid-Schiff reaction confirmed the presence of a carbohydrate moiety; glucosamine to galactosamine ratio is approximately 2.5; serine glycine and asparagine residues are prevailing. Data obtained point to the presence of glucose, glucosamine and galactosamine containing heterosaccharide moiety in this coronary dilatory glycopeptide.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Bernstein Y., Armstrong Y. Mc. D., Padde D. M., Miskoni L. Biochem. Biophys. Res. Commun., 42, 2—7, 1971.
2. Gospodarowicz D., Bialicki H., Greenberg G. J. Biol. Chem., 253, 3736—3749, 1978.
3. Hamilton Y. W., Niall H. D., Kentman H. T., Potts J. T., Cohn D. V. Fed. Proc. 32, 269—278, 1973.
4. Walter R., Schleisinger D. H., Schwarts I. R., Capra Y. D. Biochem. Biophys. Res. Commun., 44, 1270—1274, 1971.
5. Gruber K. A., Morris M. Endocrine Res. Commun., 45—59, 1980.
6. Срапионян Р. М., Джембазян Т. А., Галоян А. А. Вопросы биохимии мозга, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 6, с. 157—160, 1970.
7. Срапионян Р. М., Саакян С. А., Медисов Ф. А., Галоян А. А. ДАН АрмССР, 70, 182—186, 1980.
8. Галоян А. А. ДАН АрмССР, 38, 305—307, 1964.
9. Срапионян Р. М., Саакян С. А., Галоян А. А. Вопросы биохимии мозга, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 11, с. 97—104, 1976.
10. Срапионян Р. М., Саакян С. А., Абелян Ж. Г., Галоян А. А. Нейрохимия, 1, 36—43, 1982.
11. Галоян А. А. ДАН АрмССР, 34, 109—111, 1962.
12. Chen M., Creig S., Stoner I. Biochemistry, 11, 3559—3563, 1972.
13. Галоян А. А., Срапионян Р. М., Карапетян Р. О., Саакян С. А. ДАН АрмССР, 67, 176—179, 1978.
14. Маурер Г. Диск-электрофорез, М., Мир, с. 248, 1971.
15. Davies B. J., Ornstein L. Disk Electrophoretic reprinted by Distillation. Product. Ind. N. Y., 1962.
16. Zacharius R., Zell T. Anal. Biochem., 30, 148—152, 1969.
17. Lowry O. H., Rosenbrough N. Y., Farr A. L. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
18. Morawitz P. L., Zahn A. Deutsch. Arch. Klin. Med., 116, 364, 1914.
19. Cheng P. W., Boat T. F. Anal. Biochem., 85, 271—282, 1978.
20. Ford J. D., Baner J. R. Copyright by Acad. Press, 538—550, 1978.
21. Sharon N., Lis H. Chem. Eng. News, 59, 21—44, 1981.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Поступила 20. IX 1982
271

УДК 547.96.07

ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДА δ -СНА И ЕГО АНАЛОГОВ НА БИОЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРОЛИКОВ

БАХАРЕВ В. Д., САРГСЯН А. С., МИХАЛЕВА И. И.

Исследованы эффекты пептида δ -сна (ПДС) и некоторых его аналогов с помощью регистрации электроэнцефалограммы кроликов при внутрижелудочковом введении в различных дозах. Показано, что пептид вызывает увеличение выраженности δ -волн в суммарной энцефалограмме в дозах 20—150 мкг/кг, отмечено наличие индивидуальной чувствительности животных к препарату. Из аналогов наиболее выраженным эффектом, хотя и более слабым, чем у природного пептида, обладали цикло-(Gly-DSIP), Asp⁵-DSIP и D-Ala³-DSIP. Показано, что действие пептида δ -сна у крыс с искусственно депривированным сном более существенно.

В последние годы значительное внимание уделяется исследованиям эндогенных факторов сна, имеющих пептидную природу [1—6]. Один из них — ПДС или DSIP (Delta-Sleep Inducing Peptide) — был выделен Monnier и соавт. [3] из мозговой венозной крови кроликов в процессе сна, вызванного электростимуляцией таламической области мозга. Согласно сообщению авторов, этот пептид, имеющий структуру Trp-Ala-Gly-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu, вызывает при внутрижелудочковом и внутривенном введении увеличение выраженности медленных или δ -волн в энцефалограмме животных и ряд поведенческих реакций, характерных для сна [4—6].

С целью изучения взаимосвязи между структурой и функцией этого эндогенного фактора в Институте биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР был предпринят синтез ПДС и ряда его аналогов [7, 8], структура которых схематически приведена на рисунке.

Изучение сомногенных свойств ПДС, синтезированного в ИБХ им. М. М. Шемякина АН СССР, привело к противоречивым результатам. Так, с одной стороны, был обнаружен сильный эффект больших доз ПДС (до 200 нмоль) при центральном введении кроликам, кошкам, крысам [9—11]. С другой стороны, попытки воспроизведения данных Monnier и соавт. не привели к успеху. Так, например, введение препарата в дозе 6 нмоль центрально и 30 нмоль внутривенно кроликам и крысам не давало достоверного увеличения сна [12].

Столь же противоречивые данные об активности ПДС появились и в литературе. Сомногенное действие пептида было подтверждено несколькими авторами [13—15] на кошках, крысах и мышах при систем-

ном введении в дозах 30—80 нмоль. Более того, согласно последним сообщениям, это вещество в качестве лекарственного средства успешно используется при лечении людей с различными нарушениями сна [16, 17]. В то же время, опыты Tobler и Borbely [18] на крысах не выявили достоверного действия ни при системном, ни при внутрижелудочковом введениях. В противоположность ожидаемому отмечалось повышение двигательной активности и уменьшение выраженности δ -волн в электроэнцефалограмме.

В связи со столь неоднозначными результатами тестирования, полученными разными авторами, возникла необходимость дальнейшего исследования сомногенных свойств ПДС. Задачей настоящей работы являлось изучение влияния нативного пептида δ -сна и его аналогов на энцефалограмму животных (кролики, крысы) при внутрижелудочковом введении в различных дозах в нормальных условиях и в условиях стрессорных воздействий искусственной депривации сна.

Материалы и методы

В 144 опытах на 48 кроликах породы шиншилла обоего пола массой $1,8 \pm 0,3$ кг регистрировали электрокортикограмму до и после введения препарата. Животные находились в условиях, ограничивающих их подвижность в свето- и звукоизолированной камере. Активный электрод вводили субдурально в крышу черепа над зрительной областью коры больших полушарий (17 поле), индифферентный—в носовые кости. Животное использовали не более чем в 3 экспериментах с промежутком не менее 7 суток. Пептиды растворяли непосредственно перед употреблением в стерильном физиологическом растворе и инъецировали в боковой желудочек мозга на стороне регистрации. В контрольной части опыта до препарата кроликам вводили в эквивалентном объеме физиологический раствор (0,04 мл) и регистрировали фоновую энцефалограмму в течение 45—60 мин.

Регистрацию электрокортикограммы осуществляли монополярно с помощью чернилопишущего восьмиканального энцефалографа «Медикор 01—1751» и анализировали на широкополосном анализаторе-интеграторе «Медикор-4657». Постоянная времени фильтров верхних частот равнялась 0,3 с, что соответствовало предельной частоте 0,53 Гц. Предельная частота фильтров низких частот—70 Гц. Полосы частот фильтрационных контуров анализатора составляли для δ -ритма—1,5—3, θ —4—7, α —8—13, γ —31—70 Гц. Оценка результатов, кроме графических методов разделением суммарной биоэлектрической активности по полосам, осуществлялась также регистрацией показателей интегрирования с помощью трехзначного цифрового индикатора в мкВ/с. Параллельно с этим регистрировали электрокардиограмму и электромиограмму шейных мышц.

В работе производили также исследование влияния ПДС на животных с искусственно депривированным сном. С этой целью во второй половине дня крыс в металлическом контейнере помещали на 12 ч в

холодильник, где они находились при температуре $+4^{\circ}$ до утра. Утром через 2—3 ч после того, как животные согревались при комнатной температуре, у них регистрировали электрокортикограмму. В фоне в боковые желудочки мозга вводили физиологический раствор, в опыте — ПДС из расчета 50 мкг/кг массы в объеме 15 мкл. В контрольной серии ПДС и физиологический раствор вводили животным, которых не помещали в холодильник, а оставляли на 12 ч в контейнере при комнатной температуре.

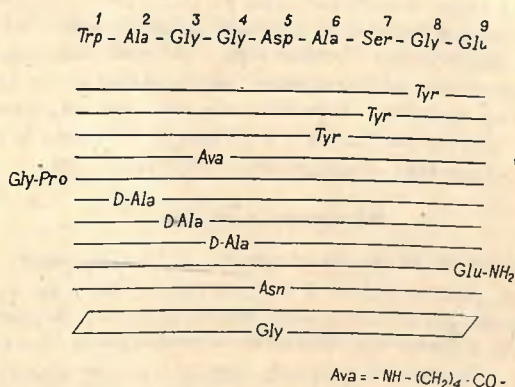


Рис. Структура ПДС и его аналогов

Депривацию сна осуществляли также болевым раздражением, накладывая вечером на 12 ч на хвост крыс жесткий металлический зажим.

Полученные результаты обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики с вычислением средних величин, среднего квадратичного отклонения, ошибок средних. Достоверность различий опыта и контроля оценивали с помощью критерия Стьюдента. В таблицах рядом с основным значением средней величины приведена удвоенная ошибка опыта, что позволяет быстро произвести ориентировочную оценку достоверности в сравнении с контролем [19].

Результаты и обсуждение

Было исследовано влияние ПДС и его аналогов на электроэнцефалограмму кроликов при внутрижелудочковом введении в различных дозах. Показано, что препарат вызывает увеличение количества δ -волн в суммарной энцефалограмме, спектр колебаний смещался в область низких частот, δ -волны становились более высокоамплитудными, появлялись медленные колебания с периодом более 2—3 с. Эти явления коррелировали с уменьшением активности миограммы шейных мышц и урежением частоты сердечных сокращений. При этом пептид

оказался эффективным лишь в узком диапазоне доз: 20—150 мкг/кг массы животного. Дозы 3 мкг/кг и менее совершенно не влияли на прирост δ -волн. Дозы 1000 мкг/кг и более стабилизировали δ -волны, уменьшая их разброс во времени, но не вызывая абсолютного или относительного их увеличения. Оптимальные дозы препарата не всегда приводили к абсолютному приросту δ -волн: стабилизация их на фоне уменьшения суммарной биоэлектрической активности общей энцефалограммы делала их преобладающими в общем спектре. Увеличение δ -волн относительно суммарной активности может быть обусловлено существенным уменьшением в общем спектре быстрых составляющих, в первую очередь так называемого α -, и особенно β -диапазонов. На диапазоны θ -, γ -ритмов препарат не оказывал заметного влияния.

Пик основной активности препарата по δ -волнам наступал через 30—60 мин после введения. У некоторых животных через 2—3 ч после введения наблюдали активацию α -ритма, что позволило высказать нам предположение о двухфазности действия препарата. Кроме того, анализ графических записей доказывает существование индивидуальной чувствительности животных к пептиду. Некоторые кролики к нему вообще не чувствительны или слабо чувствительны. Ориентировочно, по видам чувствительности кроликов можно разделить на несколько групп: 1—высокочувствительные, с преобладанием первой фазы действия препарата, под влиянием которого δ -волны в абсолютном значении увеличиваются по сравнению с фоном в 1,5—2 раза и более. Вторая фаза активации α -ритма отсутствует полностью. Такие эффекты мы наблюдали у 3 кроликов, то есть у 17 % особой исследованной группы; 2—среднечувствительные, у которых абсолютный прирост δ -волн не превышает 20—30 % по сравнению с фоном, и их можно разделить на 2 подгруппы: а) с преобладанием через 60—90 мин после введения пептида 1-й фазы активации δ -волн (6 кроликов, то есть 33 %); б) с преобладанием через 120—180 мин после введения пептида 2-й фазы активации α -волн (2 кролика, то есть 11 %). 3—низкочувствительные, у которых δ -волны почти не увеличиваются, в основном снижаются α - и β -ритмы; 2-я фаза активации α -волн также выражена слабо, чаще отсутствует (5 кроликов, то есть 28 %). 4—нечувствительные (2 кролика, то есть 11 %).

Среди исследованных животных, включая и эксперименты с тестированием аналогов, преобладали особи 2а и 3 групп, реже встречались животные 1 и 4 групп, почти не встречались особи 2б группы.

Выраженная индивидуальная чувствительность к препарату подтверждает факт, что ПДС не фармакологическое, а физиологически активное вещество, эффект которого зависит от исходного уровня функционального состояния ЦНС, то есть от того, взято в эксперимент утомленное или отдохнувшее животное, от времени года и времени суток, пола животного, его возраста. По всей видимости, определяющим фактором эффективности препарата является активность дельтаритмоводящих систем, предположительно серотонинергических систем среднего мозга.

Опубликованные ранее результаты исследования ПДС на кроликах, кошках и собаках [11] были получены в осенне-зимний период 1978—79 гг., опыты проводились во второй половине дня и поэтому эффекты оказывались значительно более выраженными по сравнению с результатами данной серии, которая проводилась весной 1981 года, в основном, в первой половине дня.

Таблица 1

Влияние ПДС и его аналогов на δ -диапазон энцефалограммы кролика*

Название вещества	δ -активность и энцефалограммы по результатам интегрирования в мкВ/с	
	контроль	опыт
ПДС	273 $\pm$ 49	486 $\pm$ 37**
Tyr ⁸ -ПДС	28 $\pm$ 51	275 $\pm$ 32
Tyr ⁷ -ПДС	269 $\pm$ 34	36 $\pm$ 47
Tyr ⁶ -ПДС	207 $\pm$ 32	221 $\pm$ 54
Asn ⁵ -ПДС	212 $\pm$ 26	29 $\pm$ 3*
(Glu-NH ₂) ⁹ -ПДС	250 $\pm$ 47	232 $\pm$ 39
Ava ^{3,4} -ПДС	317 $\pm$ 53	388 $\pm$ 27
(Gly-Pro) ¹ -ПДС	329 $\pm$ 35	401 $\pm$ 42
D-Ala ³ -ПДС	233 $\pm$ 29	325 $\pm$ 36*
D-Ala ⁴ -ПДС	202 $\pm$ 48	230 $\pm$ 56
Цикло-(Gly-ПДС)	311 $\pm$ 32	385 $\pm$ 23*

* через 60 мин после внутрижелудочковой инъекции 50 мкг/кг препарата в объеме 40 мкл. Каждый аналог исследовали в 4—7 опытах на 3 кроликах, основной фактор—ПДС—в 54 опытах на 18 кроликах. Результаты, имеющие вероятность различия с контролем по критерию Стьюдента более 0,99, помечены звездочкой, более 0,999—двумя звездочками

Аналоги ПДС, исследованные в таких же условиях, как и основное вещество, оказались либо слабее природного фактора, либо полностью неактивны. Сравнительная активность аналогов представлена в табл. 1. Цикло-(Gly-ПДС), Asn⁵-ПДС и D-Ala³-ПДС проявляют наиболее выраженный эффект. В то время как аналоги Ava^{3,4}-ПДС, (Gly-Pro)¹-ПДС—менее активны, а Tyr⁷-ПДС, Tyr⁶-ПДС и D-Ala⁴-ПДС полностью неактивны. Аналог (Glu-NH₂)⁹-ПДС вызывал уменьшение количества δ -волн в энцефалограмме и проявлял слабое активирующее действие. Следует отметить, что высокочувствительные к ПДС кролики были чувствительны к влиянию аналогов, а нечувствительные животные оставались таковыми и при исследовании аналогов. На основании полученных результатов и анализа литературных данных можно предположить, что ПДС является представителем группы нейропептидов—кардинально новых веществ в физиологии, не пусковых, или адаптационно-трофических, известных нам ранее, а принципиально отличных от них, готовящих клетки к нормальному протеканию процессов, а в данном случае защищающих клетки от избыточной афферентной импульсации. Их эффект зависит от уровня готовности и проявляется, в основном, при его понижении. По-видимому, меняя уровень готовности протекания нормальных физиологических реакций, ПДС способствует ему, повышает готовность к реакции, а не вызывает её. Системные воздей-

ствия ПДС не могут быть ограничены одним лишь влиянием на сон, который является сложным, многокомпонентным процессом и тесно связан с организацией и запечатлением воспринимаемой информации. Не исключено влияние ПДС на другие интегративные процессы мозга, в частности на память.

Таблица 2

Влияние ПДС на энцефалограмму крыс, лишенных сна*

Номер группы	Условия эксперимента	Количество крыс	Суммарная биоэлектрическая активность в мкВ/с	Показатель интегрирования δ -ритма в мкВ/с
1	Интактные крысы в контроле	8	456 $\pm$ 39	214 $\pm$ 21
2	Депривация сна низкой температурой, введение физиологического раствора	6	327 $\pm$ 47	214 $\pm$ 25
3	Депривация сна болевой импульсацией, введение физиологического раствора	6	403 $\pm$ 26	202 $\pm$ 39
4	Интактные крысы, введение ПДС	8	480 $\pm$ 23	260 $\pm$ 17
5	Депривация сна низкой температурой, введение ПДС	6	520 $\pm$ 51	360 $\pm$ 38
6	Депривация сна болевой импульсацией, введение ПДС	6	496 $\pm$ 38	310 $\pm$ 11

* препарат вводили в боковой желудочек мозга в дозе 50 мкг/кг, в контроле—эквивалентный (15 мкл) объем физиологического раствора. Вероятность различий в раженности δ -ритма у разных групп крыс по критерию Стьюдента следующая:

№ 1—№ 2—недостаточно;

№ 1—№ 3—недостаточно;

№ 1—№ 4—более 0,99;

№ 1—№ 5—более 0,999;

№ 1—№ 6—более 0,999;

№ 4—№ 6—более 0,999;

№ 2—№ 5—более 0,999;

№ 3—№ 6—более 0,999;

№ 4—№ 5—более 0,999.

Имеющиеся сообщения о неэффективности ПДС могут быть объяснены несоблюдением условий тестирования эффектов и способов хранения. В частности, тестирование длительно хранившегося в растворе препарата [12] было заранее обречено на неудачу, так как пептид весьма неустойчив в растворе, подвержен воздействиям микроорганизмов и других разрушающих факторов. Целесообразно исследовать эффекты пептида не вручную, не по изменению латентного периода появления δ -волн [20], не по сонным веретенам [12], а с помощью соответствующей электронной аппаратуры, анализирующей энцефалограмму по заданным алгоритмам, позволяющей четко тестировать δ -волны и другие компоненты энцефалограммы. Показанная индивидуальная чувствительность животных к ПДС подвергает сомнению

результаты [20], полученные на трех кроликах. Результаты исследования эффектов ПДС у животных с нарушенным сном оказались следующими: он слабо влиял на энцефалограмму интактных животных, то есть статистически значимо, но не постоянно, на некоторых крыс вообще не оказывал влияния. Значительно сильнее препарат воздействовал на крыс, лишенных сна, особенно помещенных в холодную среду. Энцефалографическое исследование до и после введения пептида у крыс после депривации сна болше в сравнении с контролем подтвердило выраженный эффект ПДС у животных с нарушенным сном (табл. 2). Следует отметить, что нарушения сна привели к относительному увеличению δ -ритма в энцефалограмме у животных после предварительной депривации. Тем не менее, с учетом этого факта прирост δ -колебаний после инъекций исследуемого вещества болше, чем у животных после введения пептида без депривации.

Полученные результаты позволяют высказаться о болшей эффективности ПДС в ситуации с предварительно сниженным уровнем функционирования системы сна, после искусственно вызванных нарушений. По-видимому, в зависимости от уровня функционирования будет и ответ организма на инъекцию препарата, а отсюда неоднозначность реакций, которые может вызвать ПДС.

Воздействия холодом или болевым раздражителем являются комплексными факторами, поэтому ситуацию, возникающую вследствие их влияния, нельзя рассматривать как чистую депривацию сна. В то же время длительное охлаждение и сильная боль являются мощными стрессорными факторами, а наблюдение за поведением животных и проведенные эксперименты с регистрацией энцефалограммы до и после инъекций препарата показывают неспецифические антистрессорные эффекты ПДС.

EFFECT OF DELTA-SLEEP INDUCING PEPTIDE AND ITS ANALOGS ON THE RABBIT BRAIN BIOELECTRIC ACTIVITY

BAKHAREV V. D., SARGSYAN A. S., MIKHALEVA I. I.

S. M. Kirov Military Medical Academy, Leningrad

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, USSR Academy of Sciences, Moscow

The effect of Delta-Sleep Inducing Peptide (DSIP) and its analogs (intraventricular injection) on rabbit electroencephalogram has been studied. DSIP (20—150 mcg/kg bw) makes delta waves more prominent (the animals appeared to be individually sensitive to this compound). Cyclo-(Gly-DSIP), Asn⁵-DSIP and D-Ala³-DSIP proved to be the most potent analogs among those tested, although not as potent as DSIP. It was demonstrated that DSIP is extremely effective in animals deprived from sleep.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Nagasaki H., Iriki M., Inoue S., Ushizono K. Proc. Japan Acad., 50, 241—246, 1974.
2. Pappenheimer J. R., Koski G., Fencf U., Karnovsky M. L., Krueger J. J. Neurophysiol., 38, 1299—1311, 1975.
3. Schoenenberger G. A., Maier P. F., Tobler H. J., Monnier M. Pflügers Arch., 369, 99—109, 1977.
4. Monnier M., Dudler L., Gächter R., Maier P. F., Tobler H. J., Schoenenberger G. A. Experientia, 33, 548—552, 1976.
5. Schoenenberger G. A., Monnier M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 1282—1286, 1977.
6. Monnier M., Dudler L., Gächter R., Schoenenberger G. A. Neurosci. Letters, 6, 9—13, 1977.
7. Саргсян А. С., Сумская Л. В., Александрова И. Ю., Безруков М. В., Михалёва И. Н., Иванов В. Т., Балабан П. М. Биоорганич. химия, 7, 1125—1149, 1981.
8. Саргсян А. С., Михалева И. Н. Перспективы биоорганической химии в создании новых лекарственных препаратов. (Тезисы Всесоюз. симп). Рига, с. Р19, 1982.
9. Богословский М. М., Карманова И. Г., Максимук В. Ф., Альбертин С. В. Ж. эвол. биох. физиол., 15, 430—433, 1979.
10. Карманова И. Г., Максимук В. Ф., Воронов Н. Б., Богословский М. М., Демин Н. Н., Рыбинская И. П., Альбертин С. В. Ж. эвол. биох. физиол. 15, 583—589, 1979.
11. Медведев В. Н., Бахарева В. Д. Ж. эвол. биох. физиол., 15, 379—384, 1979.
12. Ковальзон В. М., Цибульский В. Л. Ж. высш. нервн. деят., 30, 1064—1066, 1980.
13. Pole P., Schneeberger J., Haefely W. Neurosci. Letters, 9, 33—36, 1976.
14. Kafi S., Monnier M., Gaillard J.-M. Neurosci. Letters, 13, 169—172, 1979.
15. Nagasaki H., Kitahama K., Valatx J. M. Brain Res., 192, 276—280, 1980.
16. Schnelder-Helmert D., Gnirss F., Monnier M., Schenker F., Schoenenberger G. A. Int. J. Clin. Pharm. Ther. Toxicol., 19, 341—345, 1981.
17. Blois R., Monnier M., Schoenenberger G. A., Tissot R., Gaillard J.-M. Abstracts of the fifth European Sleep Congress, Amsterdam, p. P—16, 1980.
18. Tobler I., Borbely A. A. Waking and Sleeping, 4, 139—153, 1980.
19. Бендат Дж., Пирсал Л. Измерение и анализ случайных процессов. М., Мир, 470 с., 1971.
20. Гринявичюс К.-К. А., Милашюс А. М. Ж. высш. нервн. деят., 32, 1084—1089, 1982.

Военно-медицинская академия
им. С. М. Кирова, Ленинград
Институт биоорганической химии
им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва

Поступила 19. 11 1982

УДК 577.156

ОЧИСТКА И ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНОЙ АСПАРАГИНОВОЙ ПРОТЕИНАЗЫ ИЗ МОЗГА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

БАРХУДАРЯН Н. А., АЗАРЯН А. В.

Используя осаждение сульфатом аммония (30—70%), гель-фильтрацию на колонке с сефадексом G-100, аффинную хроматографию на пепстатин-сефарозе, была выделена в электрофоретически гомогенном состоянии высокомолекулярная аспарагиновая протеиназа. Активность фермента определяли флуориметрически при pH 3,2, используя в качестве субстрата пиридоксилгемоглобин. M фермента 160 кД. K_m относительно пепстатина— 10^{-8} М, K_m относительно субстрата пиридоксилгемоглобина— 10^{-5} М, pI 5,6, а оптимум pH 3,2. По ряду свойств (pH оптимум, субстратная специфичность, чувствительность к ингибиторам) фермент подобен катепсину D, выделенному из того же источника.

В нормальных и патологически измененных тканях различных животных наряду с основной лизосомной аспарагиновой протеиназой—катепсином D [1] была обнаружена высокомолекулярная аспарагиновая протеиназа (M 90—100 кД), классифицируемая одними авторами как катепсин E-подобный фермент [2—4], другими—как димер или предшественник катепсина D [5—9].

В настоящей работе сообщается об очистке и некоторых свойствах высокомолекулярной аспарагиновой протеиназы из коры больших полушарий мозга крупного рогатого скота.

Материалы и методы

Кору больших полушарий мозга крупного рогатого скота получали сразу после забоя животных и хранили при -20° . Навеску в 200 г в 400 мл 0,05 М цитратного буфера, pH 3,9, содержащего 0,2% тритон X-100, гомогенизировали в гомогенизаторе типа Поттер, а затем центрифугировали 1 ч при 100000 g.

Приготовление аминоксидилсефарозы-4В. Активированную бромцанном сефарозу-4В на стеклянном фильтре тщательно промывали холодной дистиллированной водой. 3 г геля (мокрый вес) растворяли в 3 мл 10% диаминоксидана, предварительно оттитрованного 6 н. HCl до pH 10,1 и медленно перемешивали на магнитной мешалке в течение 24 ч при 4° . Полученную аминоксидилсефарозу-4В промывали 1 л холодной дистиллированной воды и 500 мл диоксана.

Пепстатин-аминогексилсефарозу-4В готовили из 3,5 мг пепстатина, 2,1 мг N, N'-дициклогексилкарбодимида и 1,2 мг N-гидроксисукцинимид, которые растворяли в 1,5 мл N, N'-диметилформамида. Смесь помещивали 24 ч при 4° и к ней добавляли диоксановую суспензию аминогексилсефарозы-4В. Реакция присоединения проходила при постоянном помещивании в течение 24 ч при комнатной температуре. После этого гель промывали последовательно 100 мл раствора диоксан: N, N'-диметилформамида (1:1); 300 мл дистиллированной воды, 300 мл 0,05 М трис-HCl буфером, pH 8,5, содержащим 1 М NaCl, снова дистиллированной водой и 100 мл 0,05 М цитратного буфера, pH 3,9 (уравновешивающий буфер при аффинной хроматографии). Несвязанный пепстатин в промывной жидкости определяли по торможению активности пепсина; для его удаления гель промывали 4 М мочевиной, затем уравновешивающим буфером и упаковывали в колонку (0,8×5 см).

Электрофорез белков в 7,5%-ном ПААГ проводили по методу Davis [10] при 4°. Электродным буфером служил 0,025 М трис-глициновый буфер, pH 8,3. Электрофоретическое разделение вели 2 ч при 4° и силе тока 5 мА на трубку.

Для проведения электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия (ДС-Na) белок обрабатывали 5 мин кипячением в 1%-ном ДС-Na, приготовленном на 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,4, содержащем 0,1%-ный β-меркаптоэтанол. В электродный и гелевый буферы добавляли 0,1%-ный ДС-Na. Электрофоретическое разделение осуществляли в 10%-ном геле в течение 5—6 ч при комнатной температуре и силе тока 8 мА на трубку, затем гели фиксировали в 20%-ной ТХУ, красили 1%-ным раствором амидочерного 10 В в 7%-ной уксусной кислоте, отмывая до обесцвечивания фона.

Количество белка определяли по Lowry и соавт. [11], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин. При фракционировании на колонке с сефадексом G-100, хроматографии на пепстатинсефарозе и при изoeлектрическом фокусировании содержание белка определяли, используя фотометр «Uvicord 2» (LKB, Швеция).

М белков определяли по методу Andrews [12]. Колонку с сефадексом G-150 (5×55 см), уравновешенную 0,025 М фосфатным буфером, pH 7,6, калибровали с помощью голубого декстрана (М 2000 кД), альдолазы (М 147 кД), щелочной фосфатазы (М 86 кД), сывороточного альбумина быка (М 67 кД), овальбумина (М 45 кД).

Активность высокомолекулярной аспаратинговой протенназы определяли флуорометрически [13], в качестве субстрата был использован гемоглобин, ковалентно связанный с пиридоксаль-5'-фосфатом (ПГ). Для определения ферментативной активности пробы объемом 0,6 мл, содержащие 0,05 М цитратный буфер, pH 3,2, 200 мкг субстрата ПГ и необходимое количество фермента, инкубировали при 37° в течение 60 мин. Реакцию останавливали добавлением 0,15 мл 30%-ной ТХУ. После центрифугирования при 5000 г pH проб доводили до 5,5 добавлением 0,3 мл 1 М натрий-цитратного буфера, pH 7,2. Количество кисло-

торастворимых пептидов определяли флуорометрически на спектрофлуориметре фирмы «Farrand Optical Co Inc.» (США). Флуоресценцию измеряли при 410 нм (возбуждение при 330 нм). Контролем служили субстрат и фермент, никубированные отдельно. За единицу активности фермента принимали такое его количество, которое вызывает в течение 1 ч при 37° образование фосфопиридоксилпептида, соответствующего по флуоресценции 1 нмоль пиридоксаминна.

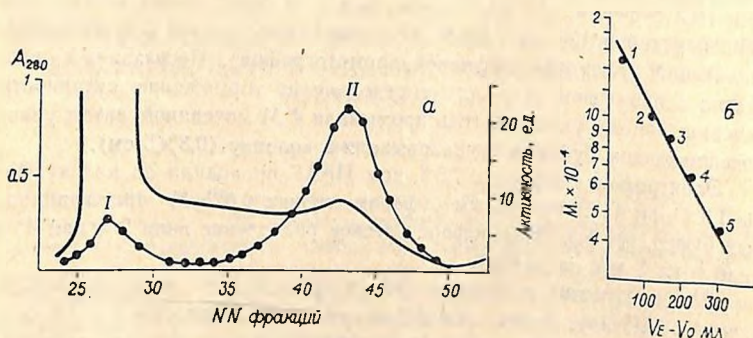


Рис. 1. Фракционирование белков из коры больших полушарий мозга, осажденных сульфатом аммония (30—70%), на сефадексе G-100, а—профиль элюции гидролизата пиридоксилгемоглобина при pH 3,2, элюцию проводили 0,025 М фосфатным буфером, pH 7,6 со скоростью 40 мл/ч. Цифрами обозначены пики эндопептидазной активности; б—определение М аспарагиновой протеиназы, 2—щелочная фосфатаза, 4—бывший сывороточный альбумин, 5—овальбумин. V_E —элюционный объем, V_0 —свободный объем

Действие фермента на 1%-ные белковые субстраты (бычий сывороточный альбумин, γ -глобулин, гемоглобин, протамин) определяли с помощью О-фталдигальдегида при pH 3,2 [14].

ИЭФ проводили на колонке фирмы «ЛКВ» (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. ИЭФ продолжали 24 ч при 4° и напряжение колонку, достигал постоянной величины. По окончании электрофокусирования содержимое колонки собирали фракциями по 1,25 мл, и в них измеряли pH и ферментативную активность.

Результаты и обсуждение

Очистка фермента. Из коры больших полушарий головного мозга быка растворимые белки осаждали сульфатом аммония (30—70%). Полученный осадок отделяли центрифугированием, растворяли в 30 мл 0,025 М фосфатного буфера, pH 7,6 и наносили на колонку с сефадек-

сом G-100 (5×55 см), уравновешенную 0,025 М фосфатным буфером, pH 7,6. После гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-100 были получены два пика с эндопептидазной активностью при pH 3,2 (рис. 1, а). Фермент, содержащийся во втором пике, был идентифицирован нами как катенсин D с М 50 кД. Первый пик, обладающий более высокой М, выходил в свободном объеме колонки, его активность составляла 5% от общей активности, определенной после гель-фильтрации. В данной статье рассматриваются свойства первого пика (рис. 1, а, фракции 26—28). 40 мл раствора белков первого пика доводили концентрированной HCl до pH 3,9 и наносили на колонку с пепстатин-сефарозой (0,8×5 см), уравновешенной 0,05 М цитратным буфером, pH 3,9, затем собирали вышедший белок и промывали колонку 0,05 М цитратным буфером, pH 3,9. Для элюции неспецифически сорбированных белков колонку промывали 0,05 М цитратным буфером, pH 3,9 с 0,5 М NaCl. Далее колонку последовательно промывали дистиллированной водой и элюирующим буфером, 0,1 М Na₂CO₃ с 0,5 М NaCl, pH 8,0 (рис. 2). Было получено 0,4 мг очищенного фермента. Все стадии очистки проводили при 4°.

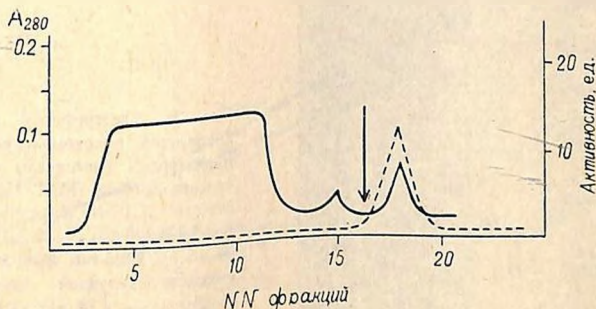


Рис. 2. Профиль элюции высокомолекулярной аспарагиновой протеиназы на колонке с пепстатин-сефарозой (0,8×5 см). (---) — активность фермента; (—) — поглощение при 280 нм. Стрелка показывает начало элюции буфером, 0,1 М Na₂CO₃ с 0,5 М NaCl, pH 8,0

Характеристика препаратов фермента. При электрофорезе в ПААГ (7,5%) очищенного препарата фермента получали 1 полосу. В случае электрофореза в ПААГ в присутствии ДДС-Na и β-меркаптоэтанола также получали 1 полосу, соответствующую М около 100 кД (рис. 3, а).

Методом ИЭФ установили, что высокомолекулярная аспарагиновая протеиназа имеет изоэлектрическую точку при pH 5,6.

При гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-150 аспарагиновая протеиназа элюировалась одним симметричным пиком, который соответствует белкам с М 100 кД (рис. 1, б).

К_м исследуемого фермента в реакции гидролиза пиридоксилгемоглобина по методу Лайнуивера-Берка равна 10⁻⁵ М.

Изучена чувствительность фермента к ингибиторам, специфичным для разных классов протеиназ. Оказалось, что активность фермента практически не угнетается 10^{-3} М п-хлормеркурибензоатом, ЭДТА, йодуксусной кислотой, динизопропилфторфосфатом. Ингибитор пепсина β -фениллизруват в той же концентрации примерно на 50% ингибирует активность фермента. Пепстатин, который, как известно, является ингибитором пепсина, ренина, гастриина и катепсина D [15—17], при низких концентрациях полностью ингибирует активность высокомолекулярной аспарагиновой протеиназы. Константа ингибирования (K_i) фермента относительно пепстатина по методу Диксона равна 10^{-8} М (рис. 4).

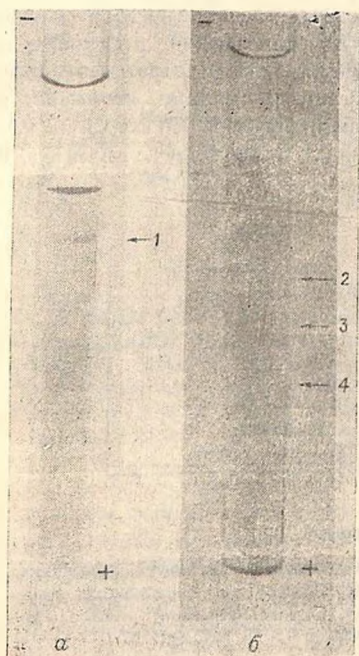


Рис. 3. Электрофорез очищенных препаратов высокомолекулярной аспарагиновой протеиназы (а) и катепсина Д (б) в ПААГ (10%) в присутствии ДДС-Na и β -меркаптоэтанола. 1—М 100 кД; 2—50 кД; 3—35 кД; 4—15 кД. Образцы содержали 40 мкг высокомолекулярной аспарагиновой протеиназы и 60 мкг катепсина Д

Исследование рН-зависимости активности высокомолекулярной аспарагиновой протеиназы показало, что максимальная активность фермента приходится на рН 3.2. Его субстратная специфичность тестировалась с помощью следующих белковых субстратов—гемоглобина, альбумина, γ -глобулина, протаминсульфата. Полученные результаты показали, что фермент лучше всего гидролизует гемоглобин, значительно хуже альбумин и γ -глобулин (10 и 5% относительно гидролиза гемоглобина соответственно) и не расщепляет протаминсульфат.

Причислить исследуемый фермент к катепсину Е мы не можем, так как оптимум рН катепсина Е 2,5, он лучше расщепляет альбумин, чем гемоглобин, и является кислым белком—рI 4,1 [1, 18, 19]. По ряду

свойств—рН оптимум, субстратная специфичность, чувствительность к ингибиторам—фермент подобен катепсину D (КФ. 3.4.23.5), выделенному нами из того же источника.

Казаковой и Ореховичем [8] из миомы матки был выделен катепсин D с М 95 кД. При электрофорезе в присутствии ДДС-На фермент дает фрагменты с М 15,8 кД, 28,6 кД, 45 кД. Этими же авторами были получены очищенные препараты катепсина D из нормальной печени и селезенки, из опухолей селезенки и почки. Все они имеют М 45 кД. При электрофорезе в присутствии ДДС-На эти ферменты дают фрагменты с М 15,8 кД, 28,6 кД и незначительное количество белка с М 45 кД. Эти данные позволяют предположить, что высокомолекулярный катепсин D из миомы матки имеет димерную структуру.

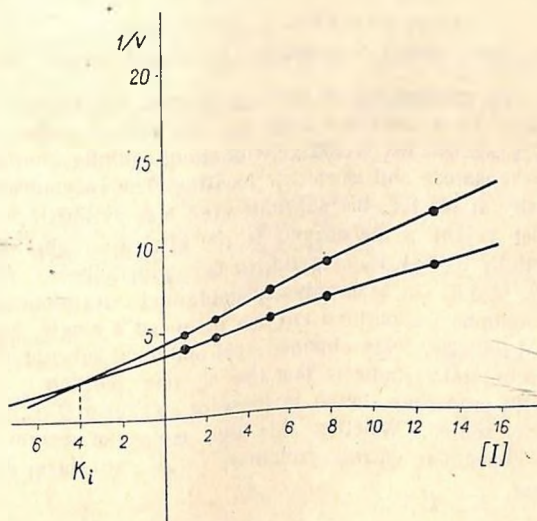


Рис. 4. Определение величины K_i относительно пепсатина. V—относительная флуоресценция: (1)—нг пепсатина в пробе. 10 мкг фермента инкубировали с набором концентраций пепсатина (1—20 нг) в течение 10 мин при комнатной температуре, затем добавляли 200 мкг или 400 мкг субстрата (ПГ) и инкубировали в течение 1 ч при 37°

Препараты выделенной нами высокомолекулярной аспарагиновой протениназы при электрофорезе в ПААГ в присутствии ДДС-На и β-меркаптоэтанола не распадаются на фрагменты. Это говорит о том, что высокомолекулярная аспарагиновая протениназа из коры больших полушарий мозга не является димером катепсина D из того же источника. При электрофорезе в ПААГ в присутствии ДДС-На препарата катепсина D, выделенного из коры больших полушарий головного мозга крупного рогатого скота, были получены фрагменты с М 15 и 35 кД и некоторое количество белка с М 50 кД (рис. 3, б).

Эти результаты согласуются с данными Tang и соавт. [9]. В селенке свиньи ими был обнаружен изофермент катепсина D с M 100 кД, который при электрофорезе в ПААГ в присутствии ДДС-На дает одну полосу, соответствующую M 100 кД. На основе иммунологических исследований авторы предполагают, что изофермент с M 100 кД является предшественником катепсина D с M 50 кД (КФ. 3.4.23.5).

Дальнейшие исследования будут направлены на выяснение вопроса: является ли выделенная нами высокомолекулярная аспаргиновая протеиназа из коры больших полушарий мозга крупного рогатого скота самостоятельным ферментом или предшественником катепсина D.

A HIGH MOLECULAR WEIGHT ASPARTIC PROTEINASE FROM CATTLE BRAIN. PURIFICATION AND PROPERTIES

BARKHUDARYAN N. A., AZARYAN A. V.

Institute of Biochemistry, Armenian SSR Academy of Sciences, Yerevan

An aspartic proteinase has been purified to electrophoretically homogeneous state by a procedure involving ammonium sulfate fractionation (30—70%), Sephadex G-100 gel filtration, affinity chromatography on pepstatin-Sepharose and isoelectric focusing. The enzyme was assayed fluorometrically at pH 3.2, the substrate used was pyridoxil-hemoglobin. The molecular weight of the enzyme is 100 kDa, it's highly sensitive to pepstatin with K_i 10^{-6} M. K_m of pyridoxil-hemoglobin is 10^{-5} M, pH optimum is 3.2, pI 5.6. On SDS-polyacrylamide gel electrophoresis in the reducing conditions the purified enzyme produced a single band corresponding to M 100 kDa. Data obtained—pH optimum, substrate specificity, sensitivity to inhibitors—indicate that the enzyme purified is an aspartic proteinase with properties similar to those of cathepsin D (E. C. 3.4.23.5) from the same source. Whether this high molecular weight proteinase acts as an independent aspartic proteinase or as a precursor of cathepsin D is not clear.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Barrett A. J. Cathepsin D and other carboxyl proteinases in mammalian cells and tissues (Barrett A. J. ed.), North Holland, Amsterdam, 209—229, 1977.
2. Yamamoto K., Katsuda N., Kato K. Eur. J. Bioch., 92, 499—508, 1978.
3. Yamamoto K., Katsuda N., Nimeno, Kato K. Eur. J. Bioch., 95, 459—567, 1979.
4. Turk V., Kregar J., Gubensek F., Popovic T., Locnikar P., Lah T. FEBS Federation of European Biochemical Societies, 60, 317—330, 1980.
5. Yago N., Bowers W. E. J. Biol. Chem., 250, 4749—4754, 1975.
6. Bowers W. E., Beyer C. F., Yago N. Biochim. Biophys. Acta, 497, 272—280, 1977.
7. Yasani B., Yasani M. K., Talbot M. D. Biochem. J., 169, 287—295, 1978.
8. Казакова О. В., Орехович В. Н. Биохимия, 44, 10, 1762—1767, 1979.
9. Huang J. S., Huang S. S., Tang J. J. of Biological Chem., 254, 22, 11405—11417, 1979.
10. Davis B. J. Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 404—427, 1964.
11. Lowry D. H., Rosebrough N. Y., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., 193, 265—275, 1951.
12. Andrews P. Biochem J., 96, 595—606, 1965.
13. Акопян Т. Н., Карабашян Л. В., Арутюнян А. А., Галоян А. А. Биол. ж. Армении, 31, 6, 612—615, 1978.
14. Акопян Т. Н., Оганисян А. И., Арутюнян А. А., Арзуманян А. М., Галоян А. А. Биол. ж. Армении, 30, 11, 57—61, 1977.
15. Umezawa H., Aoyagi T., Morishima H., Matsuzaki M., Hamada H., Takauchi J. J. Antibiotics, 23, 259—262, 1970.
16. Woessner J. F. Biochim. Biophys. Res. Commun., 47, 965—970, 1972.
17. Marks N., Grynbaum A., Lajtha A. Science, 181, 949—951, 1973.
18. Lapresle C., Webb T. Biochem. J., 84, 455—462, 1962.
19. Lapresle C.—In: Tissue Proteinases (Barrett A. J., Dingle J. T., eds.), North Holland Publishing Co, Amsterdam, p. 135—155, 1971.

Институт биохимии
АН АрмССР, Ереван

Поступила 21. XII 1982

УДК 612.82:612.015.348.577.95

НАРУШЕНИЕ СИНТЕЗА БЕЛКОВ ПРИ ПОВРЕЖДАЮЩЕМ ДЕЙСТВИИ ЭТАНОЛА В АНТЕНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ НА РАЗВИВАЮЩИЙСЯ МОЗГ

МАЙЗЕЛИС М. Я., ЗАБЛУДОВСКИЙ А. Л., ШИХОВ С. Н.

У половозрелых крыс, подвергшихся воздействию этанола в антенатальном периоде, выявлено угнетение синтеза водонерастворимых белков мозга, наиболее выраженное в гиппокампе. Показаны половые различия изменений синтеза белков в результате пренатальных воздействий этанола. Установлены особенности реакции белоксинтезирующей системы мозга на действие экстремальных факторов, а также изменения содержания циклических нуклеотидов в структурах мозга. Отмечен определенный параллелизм изменений условнорефлекторной деятельности и синтеза белков в отделах мозга у опытных животных. Полученные данные обосновывают представление о важной роли нарушений метаболизма белков в ЦНС в механизме повреждающего действия этанола на развивающийся мозг.

Многочисленные клинические данные свидетельствуют о повреждающем действии этанола на развивающийся мозг [1—4]. В экспериментальных исследованиях установлены особенности функции, метаболизма и структуры головного мозга животных, перенесших воздействие этанола в антенатальном периоде. В частности, были показаны нарушения двигательной активности, условнорефлекторной деятельности [5—8], процессов миелинизации и развития мозга [9—11]. Выявлены изменения содержания в мозгу ряда ферментов [12—14], нейромедиаторов [15—16], нарушения белкового метаболизма [17—18]. Однако в большинстве работ авторы ограничивались изучением морфометрических, функциональных и биохимических показателей у плодов, новорожденных или преимущественно на ранних этапах постнатального развития. Мало исследовано влияние этанола, вводимого пренатально, на состояние белкового метаболизма в мозгу животных в позднем онтогенезе.

Целью настоящей работы являлось изучение синтеза белков и некоторых других нейрохимических показателей в разных структурах мозга и сопоставление этих данных с функциональными нарушениями ЦНС у половозрелых крыс, подвергшихся действию этанола в антенатальном периоде.

Материалы и методы

Крысы-самки с 5-го дня и до конца беременности вместо питьевой воды получали 7° этиловый спирт, кроме того, им дополнительно вводили

ли желудочным зондом по 1,5—2 мл 40%-ного этанола 2—3 раза в неделю. Ежедневное потребление этилового спирта составляло 3,0—7,0 мл/кг. Опытные и контрольные животные и их потомство находились в одинаковых условиях вивария на стандартном пищевом рационе.

В возрасте 2 месяцев у животных исследовали ряд поведенческих тестов: поведение в «открытом поле», выработку и сохранение условных рефлексов пассивного (УРПИ) и активного (УРАИ) избегания в Y-образном лабиринте или челночной камере.

При исследовании синтеза белков мозга в качестве предшественников использовали меченые аминокислоты (^3H -тирозин, ^{35}S -метионин, ^{14}C -гидролизат хлореллы), которые вводили внутрибрюшинно за 1 ч до декапитации. Исследовали их включение в суммарные белки различных структур мозга (кора полушарий, гиппокамп, стриатум и хвостатое ядро, мозжечок, продолговатый мозг, гипоталамус, а также в отдельные фракции (водорастворимая, водонерастворимая, растворимая в тритоне X-100), выделенных из тех же структур. Счет радиоактивности проводили на жидкостном сцинтилляционном счетчике Ракбета (LKB). Рассчитывали удельную активность (расп./мин/мг белка) и относительную удельную активность (ОУА) как отношение радиоактивности белка и ТХУ-супернатанта. Содержание циклических нуклеотидов в мозгу определяли с помощью стандартных радиоиммунологических наборов («Amersham»). Результаты исследований обрабатывали статистически, используя непараметрический критерий Вилкоксона, Манна, Уитни. В опытах было использовано 80 белых крыс.

Результаты и обсуждение

Вес новорожденных животных опытной серии был существенно ниже, чем в контроле, однако к 3 неделям средний вес опытных и контрольных крыс выравнивался. Возможно, это объясняется меньшим числом крыс в каждом помете опытной серии в результате более высокой смертности в постнатальный период. Так, если у контрольных животных к 21-му дню погибло 22% всех родившихся, то у опытных крыс, подвергавшихся воздействию этилового спирта в антенатальном периоде, в первые 3 недели погибло до 40% животных, то есть в 2 раза больше, чем в контрольной группе.

При исследовании включения меченых аминокислот (^3H -тирозина, ^{35}S -метионина, ^{14}C -гидролизата белка хлореллы) в суммарные белки, выделенные из разных структур мозга, не выявлено существенных различий между животными, подвергавшимися воздействию этанола, и контрольными (рис. 1). У опытных крыс-самцов при использовании разных меченых предшественников разнонаправленные изменения ОУА не превышали 10% по сравнению с контрольными. В аналогичных опытах на крысах-самках во всех структурах мозга обнаруживалась тенденция к активации включения меченых аминокислот в белки ($p > 0,05$).

Можно предположить, что отсутствие существенных изменений синтеза суммарных белков у опытных животных связано с неоднозначными

сдвигами метаболизма белков в отдельных фракциях. Исследование интенсивности включения меченых аминокислот в водорастворимые, водонерастворимые и растворимые в тритоне X-100 белки показало, что изменения синтеза белков в этих фракциях у опытных животных действительно были не всегда однозначны.

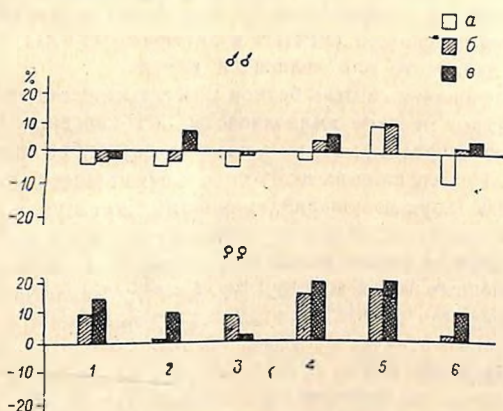


Рис. 1. Изменения включения меченых аминокислот в суммарные белки мозга крыс (в %), перенесших пренатальные воздействия этанола. а— ^{35}S -метионин; б— ^3H -тирозин; в— ^{14}C -гидролизат хлореллы. 1—кора, 2—гиппокамп, 3—базальные ганглии, 4—мозжечок, 5—продолговатый мозг, 6—гипоталамус

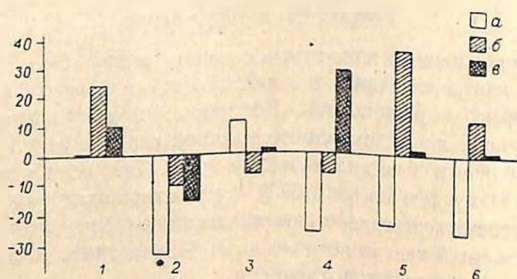


Рис. 2. Изменения включения ^3H -тирозина во фракции белков мозга крыс-самцов (в %), перенесших пренатальные воздействия этанола. а—водонерастворимые, б—водорастворимые, в—растворимые в тритоне X-100 белки. 1—кора, 2—гиппокамп, 3—базальные ганглии, 4—мозжечок, 5—продолговатый мозг, 6—гипоталамус

На рис. 2 показаны изменения включения ^3H -тирозина в отдельные фракции белков мозга у крыс-самцов, перенесших воздействие этанола, по сравнению с контрольными. Включение аминокислоты в водонерастворимые белки у опытных животных в большинстве структур снижено. При этом наибольшее угнетение синтеза белков в этой фракции отмечено в гиппокампе (34% при $p < 0.05$). В коре полушарий изменений не

наблюдали, в подкорковых отделах обнаружена незначительная активация включения предшественника. В водорастворимых белках в гиппокампе, подкорковых отделах, мозжечке включение аминокислоты в белки имело тенденцию к снижению (до 10%), а в коре полушарий и продолговатом мозгу отмечалась активация синтеза. Включение предшественника в белки, растворимые в тритоне X-100, было несколько снижено в гиппокампе, а в мозжечке и коре полушарий наблюдали противоположные изменения. Таким образом, у опытных животных изменения синтеза белков были не всегда однонаправленны в отдельных фракциях. При этом обращают на себя внимание следующие факты: для водонерастворимых белков мозга в 4-х из 6 исследованных структур характерно угнетение синтеза, наиболее выраженное в гиппокампе; лишь в этой структуре обнаружены однонаправленные сдвиги—угнетение синтеза во всех группах белков, особенно водонерастворимых.

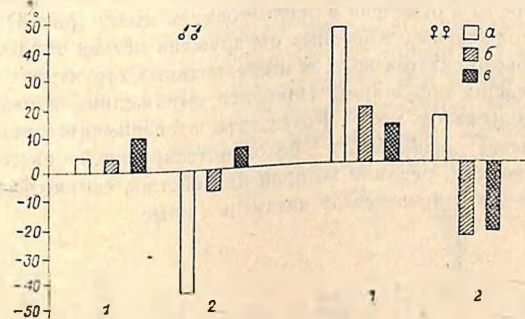


Рис. 3. Изменения включения ^{14}C -гидролизата хлореллы во фракции белков мозга крыс (в %), перенесших пренатальные воздействия этанола. Обозначения те же, что на рис. 2

Учитывая наиболее выраженные изменения белкового метаболизма в гиппокампе, в специальной серии опытов исследовали показатели синтеза белков в этой структуре в разных фракциях с использованием и других меченых аминокислот. В опытах на крысах-самцах с применением ^{14}C -гидролизата хлореллы (рис. 3) было показано, что у опытных животных наряду с небольшой активацией включения предшественника в белки во всех фракциях в коре полушарий и гиппокампе обнаруживалось угнетение синтеза белков, особенно водонерастворимых, где включение предшественников было снижено на 50%. В аналогичных опытах у крыс-самок, подвергавшихся воздействию этанола, в коре полушарий во всех фракциях, особенно в водонерастворимых белках, отмечалась некоторая активация синтеза белков, однако в гиппокампе включение меченых предшественников в водо- и тритонрастворимые белки было снижено.

Приведенные результаты подтверждают данные, полученные в опытах с ^3H -тирозином, и указывают на определенные различия изменений синтеза отдельных групп белков в разных отделах мозга животных, пе-

ренесших пренатальные воздействия этанола. При этом следует подчеркнуть, что из всех исследованных структур мозга у опытных животных наибольшее угнетение синтеза белков обнаружено в гиппокампе. Установлены половые различия изменений синтеза белков у животных, подвергавшихся воздействию этанола в эмбриогенезе: более значительные нарушения наблюдались у крыс-самцов.

Исходя из положения о том, что во многих случаях патология, не выявляемая в обычных условиях, может быть обнаружена при определенных функциональных нагрузках, в специальной серии экспериментов исследовали влияние стресса, вызванного комбинированным действием шума и вибрации в течение 1 ч, на включение ^3H -лизина в суммарные белки разных отделов мозга. Было установлено, что реакция на стресс у животных обеих групп имеет существенные различия. Для интактных крыс характерно увеличение включения ^3H -лизина в белки во всех структурах, кроме коры полушарий, при этом наибольшая активация синтеза белков отмечена в продолговатом мозгу (рис. 4). В отличие от этого у подопытных животных обнаружена четкая тенденция к снижению белкового синтеза во всех исследованных структурах мозга, кроме коры больших полушарий. Наиболее выраженные изменения отмечены в продолговатом мозгу. Результаты экспериментов указывают на функциональные особенности белоксинтезирующей системы мозга опытных животных, реакция которой на действие сильных раздражителей существенно отличается от интактных крыс.

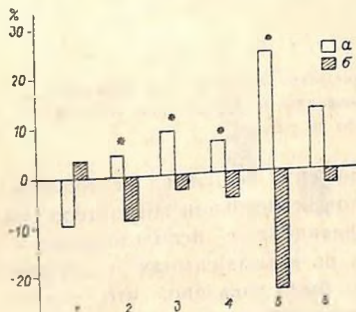


Рис. 4. Изменения включения ^3H -лизина в суммарные белки отделов мозга крыс (в %) при стрессе. а—контроль, б—этанол анте-лат, 1—кора, 2—гиппокамп, 3—базальные ганглии, 4—мозжечок, 5—продолговатый мозг, 6—гипоталамус

Как известно, в регуляции синтеза РНК и белков принимают участие циклические нуклеотиды [19, 20]. С учетом этого определяли уровень сАМР и сGMP в структурах мозга подопытных и контрольных животных. Результаты исследований выявили существенные различия содержания циклических нуклеотидов в отделах мозга у опытных крыс по сравнению с контролем. При этом у крыс-самцов уровень сАМР во всех исследованных отделах мозга—коре полушарий, гиппокампе, мозжечке—был снижен, а у самок—достоверно увеличен (рис. 5).

Содержание сGMP в мозгу подопытных крыс-самок было повышено по сравнению с контрольными, а у самцов в разных отделах моз-

та изменения были неодинаковы: в коре полушарий отмечалась достоверная активация, а в мозжечке — снижение уровня cGMP (рис. 6).

Таким образом, изменения в содержании циклических нуклеотидов, в особенности cAMP, имеют определенное сходство с показателями синтеза белков в мозгу у опытных животных разного пола, хотя оценить конкретную роль этих изменений представляется затруднительным.

Результаты проведенных опытов свидетельствуют о значительных нейрохимических сдвигах в мозгу половозрелых животных, перенесших пренатальные воздействия этанола. У них выявлены определенные нарушения синтеза белков в ЦНС, носящие не тотальный, а избирательный характер. Угнетение синтеза не обнаруживалось в суммарных белках, выделенных из разных структур, но четко определялось в водонерастворимой фракции большинства отделов мозга. Как известно, эта фракция включает не только структурные белки мембран, но и часть локализованных в них и связанных с мембранами ферментов.

Особого внимания заслуживают данные о половых различиях в синтезе белков и содержании циклических нуклеотидов в результате воздействия этанола в пренатальном периоде. Эти факты прямо указывают на большую раннимость к действию этилового алкоголя развивающейся белоксинтезирующей системы мозга крыс-самцов и, по-видимому, отражают общую биологическую закономерность.

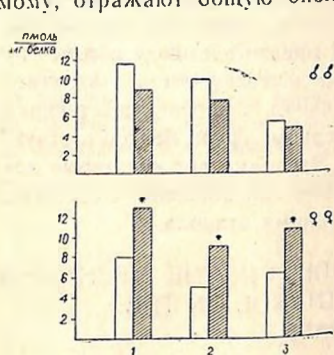


Рис. 5

Рис. 5. Содержание cAMP (пмоль/мг белка) в мозгу крыс, перенесших пренатальные воздействия этанола. а—контроль, б—этанол антенат. 1—кора, 2—гиппокамп, 3—мозжечок

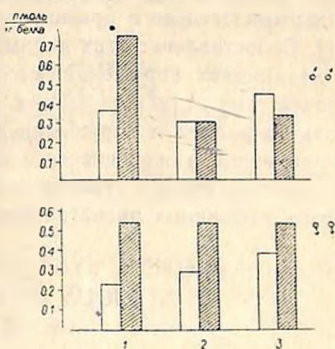


Рис. 6

Рис. 6. Содержание cGMP (пмоль/мг белка) в мозгу. Обозначения те же, что на рис. 5

Обращает на себя внимание тот факт, что нарушения белкового метаболизма у подопытных животных особенно рельефно выявились при использовании экстремальных факторов в качестве функциональных нагрузок. Так, если в нормальных условиях не удалось установить достоверных изменений синтеза суммарных белков у подопытных животных, то в условиях стресса у них обнаружены статистически значимые различия синтеза белков в 4-х из 6 исследованных церебральных

структур по сравнению с реакцией контрольных животных на такие же воздействия. Полученные данные указывают на целесообразность применения функциональных нагрузок при изучении состояния белоксинтезирующей системы мозга в условиях патологии.

Выявленные изменения синтеза белков мозга у животных, перенесших пренатальные воздействия этанола, сопоставлялись с особенностями условнорефлекторной деятельности. В 2-месячном возрасте у подопытных и контрольных животных исследовали скорость выработки и сохранение УРПИ и УРАИ. При этом у опытных крыс были выявлены определенные изменения высшей нервной деятельности. Следует отметить, что были нарушены не все, а наиболее сложные формы обучения. Так, показатели УРПИ, являющегося относительно простой формой обучения, у опытных животных были не изменены, в наибольшей степени патология выявлялась при использовании условных рефлексов двустороннего избегания. Более выраженные нарушения условнорефлекторной деятельности были отмечены у опытных крыс-самцов.

Полученные результаты свидетельствуют об определенных особенностях выработки и сохранения УРАИ у подопытных животных, что коррелирует с нарушениями синтеза белков в структурах мозга. В этой связи особое значение имеет тот факт, что наиболее выраженное угнетение синтеза белков у опытных крыс наблюдали в гиппокампе—структуре, которая, по современным представлениям, является одним из ключевых звеньев в организации консолидации временных связей [23, 24]. Сопоставление этих данных позволяет прийти к выводу о том, что в механизмах нарушений высшей нервной деятельности в результате воздействия этилового спирта в антенатальном периоде существенная роль принадлежит нарушению синтеза отдельных групп белков в структурах мозга, в особенности в гиппокампе. Это намечает некоторые новые пути подхода к терапии отдельных форм врожденной патологии мозга, вызванных пренатальными воздействиями этанола.

ROLE OF PROTEIN SYNTHESIS DISORDERS IN THE MECHANISM OF NOXIOUS EFFECT OF ETHANOL ON THE DEVELOPING BRAIN

MAIZELIS M. Ya., ZABLUDOVSKY A. L., SHIKHOV S. N.

Institute of Psychiatry, RSFSR Health Ministry, Moscow

The inhibition of insoluble brain proteins synthesis has been detected in the brain, especially in hippocampus, of the mature rats prenatally exposed to ethanol (this process is sex-dependent). Some peculiarities of the response of the brain protein-synthesizing system to extremal conditions and to the alteration of the brain cyclic nucleotides content are established. A certain correlation between changes in the conditioned reflex activities and protein synthesis in the brain are revealed. Data obtained confirm the significance of CNS protein metabolism disorders in the mechanism of noxious effect of ethanol on the developing brain.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Шурыгин Г. И. Педиатрия. 11, 71—73, 1974.
2. Усова Е. В., Сазонова Н. С., Рассадина З. А. Ж. невропат. и психиатр., 10, 1552—1556, 1981.
3. Дульнев В. Д. Влияние хронического алкоголизма родителей на развитие нервной системы у потомства. Автореф. канд. дис. М., 1964.
4. Omenn G. S., Dixon R., Ball J.—In: The Fetal Alcohol Syndrome, Wash. p. 23—31, 1979.
5. Малаховский В. Г., Прозоровский В. Б. Фармакол. и токсикол., 38, 88—90, 1975.
6. Чаленков С. Н. Труды Смолен. мед. ин-та, 31, с. 15—21, 1970.
7. Bond N. W. Psychol. Reports, 41, 3, 1269—1270, 1977.
8. Abel E. L. Pharmacol. Bioch. Behav., 10, 2, 239—243, 1979.
9. Попова Э. Н., Фрумкина Л. Е. Ж. невропат. и психиатр., 7, 1059—1062, 1960.
10. Druse M. J., Hofstet J. H. Drug. Alcohol Depend., 2, 5—6, 421—428, 1977.
11. Rasmussen B., Christensen N. Acta path. et microbiol. Scand., A 88, 285—289, 1980.
12. Куниковская Л. С. Клиника, патогенез и лечение алкоголизма, Кишинев, с. 112—114, 1973.
13. Thadani P., Pushpa V., Slotkin T. A., Schanberg S. Neuropharmacol., 16, 289—293, 1977.
14. Kornguth S. F. Brain Res., 177, 2, 347—360, 1979.
15. Ellis J., Krstak M., Poschlova N. Activ. Nerv. super., 18, 3, 220—221, 1976.
16. Lan C., Thadani P. V., Schanberg S. M. Neuropharmacol. 15, 505—507, 1976.
17. Ravat A. K. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol., 12, 723—732, 1975.
18. Khawaja G. A., Wallgren H., Usmt H., Hilsko P. Res. Comm. Chem. Pathol Pharm., 22, 3, 573—580, 1978.
19. Daly J.—In: Cyclic nucleotides in the nervous system, Pl. Press., 1977.
20. Хачатрян Г. С. Вопросы биохимии мозга, 13, с. 206—220, 1978.
21. Воронин Л. Г., Семенова Т. П. Ж. высш. нерв. деят., 4, 574—582, 1968.
22. Виноградова О. С. Гиппокамп и память, М., 1975.

Московский НИИ психиатрии МЗ РСФСР

Поступила 27. IX 1982

УДК 612.82:613.815

КОРРЕЛЯЦИЯ НЕЙРОХИМИЧЕСКИХ И ПОВЕДЕНЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРЫС ПРИ АЛКОГОЛЬНОЙ АБСТИНЕНЦИИ

*ЭДМОНДС Х. Л. (мл.), **СЫТИНСКИЙ И. А., ***СИЛЬВЕСТЕР Д. М.,
****БЕЛЛИН С. И.

Изучена взаимосвязь между показателями уровней ГАМК, глутаминовой кислоты и глутаминна в целом мозгу крыс и поведенческими тестами, индексами шкалы субъективной оценки поведения и величиной средней мощности ЭЭГ при алкогольной абстиненции. Концентрация глутаминна снижалась в 2 раза в мозгу крыс в период лишения этанола после хронической алкоголизации по сравнению с его уровнем у контрольных животных. Спустя 24 ч после лишения этанола изменений в уровнях глутаминовой кислоты и ГАМК в головном мозгу крыс, получавших различный рацион пищи, не было обнаружено. Во время алкогольной абстиненции у животных возникала гиперактивность ЦНС, которая проявлялась в увеличении индекса субъективных показателей их поведения и снижении величины начального порога на раздражение электрическим током. Величина средней мощности электроэнцефалограммы (ЭЭГ) крыс возрастала на 75% в течение первых 24 ч после прекращения приема этанола. Выраженность симптомов лишения этанола была значительно меньше у крыс, получавших дополнительно сахарозу (25,2 ккал/кг, per os) сразу после каждой инъекции этанола. Симптомы гиперактивности ЦНС и возникновение судорожных явлений, присущих алкогольному абстинентному синдрому, не связаны с изменением уровня ГАМК и глутаминовой кислоты в целом мозгу подопытных животных.

Выяснение взаимоотношений между этанолом, оказывающим депрессивный эффект на функциональную активность нервных структур, и ГАМК, медиатором торможения в ЦНС, обуславливает интерес исследователей к показателям обмена ГАМК в нервных клетках головного мозга при алкогольной интоксикации. Однако данные о ее концентрации в головном мозгу животных при действии этанола весьма противоречивы: однократное его введение вызывало увеличение содержания ГАМК, снижение или отсутствие изменений в ее уровне [1—3]. Сходная противоречивость показателей содержания ГАМК в нервных структурах мозга была установлена и при хронической алкогольной интоксикации. В большинстве работ не учитывалось значение фаз нервной возбудимости и не принималось во внимание появление симптомов первичных нарушений деятельности систем кровообращения и дыхания. В наших исследованиях [4, 5] было показано, что уровень ГАМК в головном мозгу крыс при действии этанола зависит от его дозы и фазности изменения функционального состояния ЦНС. Наличие проти-

воречий в данных различных авторов о концентрации ГАМК в головном мозгу в связи с эффектами этанола в значительной степени объясняется отсутствием общепринятой методики моделирования острой или хронической алкогольной интоксикации (разные виды или линии лабораторных животных, дозы этанола и способы его введения, сроки взятия ткани мозга для исследования и т. д.). В какой-то степени эти различия могут быть обусловлены питанием подопытных животных и (или) калорийностью их диеты, что может способствовать центральным эффектам этанола и выражаться как в изменении функции медиатора торможения, так и в его уровне в головном мозгу. В большинстве исследований не проводили соответствующего контроля калорийности питания подопытных животных, а также уделяли мало внимания нейрохимическим коррелятам поведенческих реакций при алкогольной абстиненции.

В работе с целью установления роли указанных факторов особое внимание обращено на изучение функционального состояния животных в период лишения этанола после хронической интоксикации при разных уровнях калорийности их пищевого рациона, а также на исследование показателей биоэлектрической активности головного мозга, поведенческих реакций и физиологических тестов, свидетельствующих о гипервозбудимости ЦНС как основном симптоме алкогольного абстинентного синдрома.

Материалы и методы

В опытах использовали взрослых крыс-самцов линии Sprague-Dawley (300—500 г). Каждая крыса содержалась в индивидуальной клетке при постоянной температуре и 12-часовом цикле освещенности в сутки. Физическую зависимость от этанола воспроизводили посредством его внутрибрюшинного введения, согласно методике Majchrowicz [6] в нашей модификации [7]. В течение 4 дней через каждые 8 ч вводили 10%-ный раствор этанола в дозах, определяемых состоянием животных согласно шкале субъективной оценки его поведения (табл. 1). Потеря установочного рефлекса возникала у животных после введения им в течение дня 10,8 г/кг этанола (75,6 ккал/кг/день). При наличии остаточных симптомов интоксикации животные при очередной инъекции получали дозу этанола меньше, чем 3,6 г/кг. Для сохранения калорийности суточного рациона (75,6 ккал/кг/день) крысам орально вводили раствор сахарозы сразу же после инъекции этанола. Подопытные животные были распределены на 4 группы. В 1-й группе (контроль) животные получали в течение 4 дней рацион питания (ad lib) общей калорийностью 75,6 ккал/кг/день. Через каждые 8 ч вводили 3 мл физиологического раствора (внутрибрюшинно, всего 13 введений) для контроля стрессового эффекта инъекции; животные

2-й группы («сахароза») получали через каждые 8 ч (всего 13 раз) раствор сахарозы (25,2 ккал/кг, рег ос, без витаминов и минеральных веществ); в 3-й группе («этанол») животным через каждые 8 ч вводили этанол (3,6 г/кг, внутривенно, 25,2 ккал/кг). Всего в течение суток крыса получала за счет этанола 75,6 ккал/кг; в 4-й группе («этанол+сахароза») животные дополнительно получали сахарозу (25,2 ккал/кг, рег ос) сразу после каждой инъекции этанола. Эта группа животных получала в 2 раза больше калорий по сравнению с другими группами крыс. На 5-й день в 8 ч утра после введения последней, 13-й дозы, животные всех групп лишались своего калорийного рациона. Наблюдение за ними проводили в течение суток, начиная с 8 ч, для установления у них тремора и проявления аудиогенных судорог. Максимальное проявление симптомов алкогольной абстиненции (16—24 ч после инъекции последней дозы этанола) соответствовало активной фазе суточного цикла крысы (24 ч — 8 ч). Аудиогенные судороги вызывали через каждые 4 ч воздействием звука электрического зуммера (100 дБ/1 мл/мин). Достоверность различия в степени развития аудиогенных судорог у животных разных групп устанавливали статистической обработкой, употребляя критерий Фишера [8].

Таблица 1

Шкала субъективной оценки поведения	
П а р а м е т р ы	Последующая доза введения этанола (г/кг)
Индексы возбудимости	
8 Генерализованные судороги, приводящие к гибели	3,6
7 Генерализованные миоклонические судороги с потерей установочного рефлекса	
6 Генерализованный миоклонус без потери установочного рефлекса	
5 Односторонний миоклонус	
4 Фокальная клоническая активность	
3 Треморы	
2 Гиперреакция	
1 Гиперактивность	
0 Норма	
Индексы интоксикации	
—1 Атаксия	2,7
—2 В течение 10 с не удерживаются на перекладине (2,2 см)	1,8
—3 Не могут передвигаться	0,9
—4 Потеря установочного рефлекса	0,0

Через 24 ч после введения последней дозы этанола крыс декапитировали, и выделенный мозг замораживали в жидком азоте в течение 30 с. Исследования нашей лаборатории [9] показали, что посмертное увеличение уровня ГАМК в ткани мозга [10—13] незначительно, если мозг замораживается в течение 30 с. Замороженный мозг гомогенизировали в 9 объемах охлажденного 10%-ного раствора ТХУ, центрифугировали

30 мин при 30 000 об/мин; рН супернатанта доводили до 7 посредством 5 н. КОН. Уровни аминокислот в ткани головного мозга крыс определяли с помощью ферментативного анализа: 1) для определения концентрации ГАМК применяли метод Jakoby, Scott [14] с использованием Gabase (фирма «Sigma Chemical», США); 2) содержание глутаминовой кислоты определяли посредством сочетания ферментативного анализа с флуориметрическим методом [15]; 3) глутамин—по методике Bergmeyer [16]. Статистическую обработку результатов биохимических определений проводили с помощью ЭВМ (Digital Equipment Corporation PDP 11/40), программы UCLA BMDP [17] и анализом ковариантности (ANOCOVAR) [18].

Концентрацию этанола в крови животных определяли в пробах из хвостовой вены с помощью газового хроматографа с пламенно-ионизационным детектором (модель 5750 Hewlett-Packard, температура колонки—180°, сорбент—Porapak Q, газ-носитель—гелий) по методике Раупе и соавт. [19]. Достоверность различия данных устанавливали статистической обработкой [20].

За неделю до начала инъекций этанола крысам под нембуталовым наркозом (50 мг/кг внутривенно) вводили электроды с резьбой из нержавеющей стали в кости черепа над левой и правой зонами сенсомоторной коры больших полушарий (3 мм сбоку от средней линии, 2 мм сзади от соединения венечного и стреловидного швов на черепе) и над лобной пазухой. Электроды закрепляли на специальной панели (Cam-bion integral circuit socket), которую приклеивали к черепу пластиче-ской массой, используемой для зубных протезов. Биоэлектрическую активность головного мозга наблюдали на экране двухлучевого осцилло-скопа с запоминающим устройством («Tektronix» 5103) и записывали с помощью электроэнцефалографа Grass Model 7. Функциональное состояние ЦНС животных в период алкогольной абстиненции характери-зовали показателем величины амплитуды ЭЭГ. Для количественной оценки возбудимости ЭЭГ был применен интегрированный показатель средней мощности ЭЭГ. Суммирующий интегратор электроэнцефало-графа (Grass 7P10B) учитывал площадь под кривой, соответствую-щую ее мощности (энергии), и преобразовывал эту величину в серию им-пульсов, частота которых была пропорциональна общему вольтажу ЭЭГ в соответствии со временем [21]. Среднюю мощность ЭЭГ выра-жали средним числом интегративных импульсов за 4 последователь-ных 15-секундных отрезка записи, свободных от артефактов. Запись ЭЭГ для каждой крысы с электродами была сделана до введения им этанола (контроль) и затем через 4-часовые интервалы после инъек-ции его последней дозы. Спустя 4, 8, 12, 16, 20 и 24 ч после введения последней дозы этанола поведение каждого животного описывали со-гласно шкале субъективной оценки поведения (табл. 1) с одновремен-ной записью ЭЭГ длительностью до 2 мин и оценкой чувствительности к аудиогенным судорогам. Величину начального порога измеряли по-средством удара электрического тока по лапам от электрифицирован-

ной решетки (Lafayette Instrument Operant Chamber), на которую помещали животных. Ток пропускали в течение 5 с и увеличивали его силу с 0,5 мА на последующие 0,5 мА с 30-секундными интервалами, пока животные не отдергивали одновременно более чем одну лапу от решетки или же применяли максимальную силу тока в 10 мА. В случае изменения чувствительности к аудиогенным судорогам определение величины начального порога откладывали на 2 ч. Ежедневно в 8 ч животных взвешивали. Для сравнения ряда показателей (величина средней мощности ЭЭГ, показатели шкалы субъективной оценки поведения и начального порога и т. д.) применяли статистический анализ с тестом Mann-Whitney U и тестом кратного ряда Duncan [22].

Результаты исследований

Нейрохимические данные. В табл. 2 приведены показатели содержания ГАМК, глутаминовой кислоты и глутамин в целом мозгу крыс, лишенных этанола после его хронического введения. Уровень ГАМК был достоверно выше ($p < 0,01$) в ткани мозга тех животных, которым вводили лишь этанол или сахарозу. Не установлена разница между показателями контрольной группы и групп животных, получавших одновременно этанол и сахарозу, не выявлено различий между данными об уровне ГАМК в целом мозгу крыс, которым орально вводили только сахарозу или же внутрибрюшинно лишь этанол. Это увеличение концентрации ГАМК в целом мозгу животных, вероятно, обусловлено ограниченной калорийной ценностью их рациона (до 75,6 ккал/кг/день).

Таблица 2

Содержание ГАМК, глутаминовой кислоты и глутамин (мкмоль/г ткани) в головном мозгу крыс в период 24-часовой алкогольной абстиненции

Группы животных	ГАМК	Глутаминовая кислота	Глутамин
Контроль (5)	$1,6 \pm 0,4$	$9,7 \pm 1,8$	$5,6 \pm 0,6$
«Сахароза» (5)	$2,6 \pm 0,2^*$	$11,1 \pm 0,3$	$4,6 \pm 0,5$
«Этанол» (6)	$2,3 \pm 0,1^*$	$11,2 \pm 1,5$	$2,8 \pm 0,3^*$
«Этанол + сахароза» (7)	$1,7 \pm 0,2$	$8,3 \pm 0,3$	$2,3 \pm 0,1^{**}$

Примечание: * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$, в скобках указано число опытов

Ни разница в калорийности и составе пищевого рациона животных, ни предварительное введение им этанола в течение 4 дней не оказывали эффекта на уровень глутаминовой кислоты в целом мозгу крыс в состоянии алкогольной абстиненции. Содержание глутамин в головном мозгу крыс было отчетливо выше ($p < 0,001$) в тех группах животных, которым ранее не вводили этанол, по сравнению с крысами, лишенными этанола после их хронической алкоголизации. По-видимому, резкое прекращение приема этанола вызывает уменьшение уровня глутамин в целом мозгу крыс, которое не связано с калорийностью пищевого рациона и функциональным состоянием ЦНС. Животные, получавшие лишь са-

харозу или этанол, потребляли одинаковое количество калорий, но уровень содержания глутаминна в головном мозгу крыс первой группы («сахароза») был почти в 2 раза выше по сравнению с таковым у животных, которым вводили этанол. В свою очередь, животные, получавшие только этанол, потребляли лишь половину того количества калорий, которое имели крысы другой группы («этанол+сахароза»), но содержание глутаминна было одинаковым в целом мозгу животных этих двух групп в период алкогольной абстиненции.

Показатели концентрации этанола в крови крыс равны $2,74 \pm 0,22$ и $2,28 \pm 0,24$ мг/мл соответственно для животных, получавших только этанол, и для группы крыс, которым после инъекции этанола давали сахарозу. Скорость исчезновения этанола из крови для этих двух групп крыс равна соответственно $3,72 \pm 0,21$ и $3,70 \pm 0,28$ мг/мл/ч.

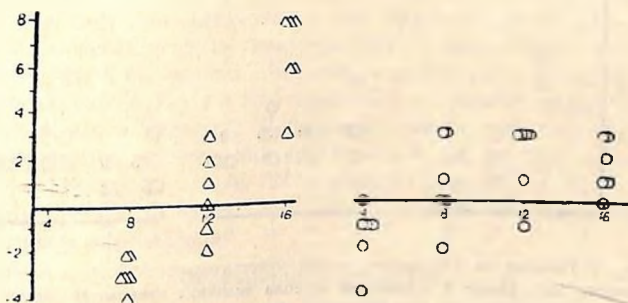


Рис. 1. Влияние рациона с добавлением сахарозы (группа «этанол+сахароза», O) на субъективные индексы поведения при алкогольной интоксикации и проявление гиперактивности ЦНС при лишении этанола. 4 ч последней дозы этанола группа животных «этанол», (Δ) показала выраженную степень интоксикации (потеря установочного рефлекса); у большинства крыс группы «этанол+сахароза», (O)—лишь средняя степень интоксикации. Спустя 16 ч абстиненции судорожная активность по шкале субъективной оценки поведения >3 отмечена у 5 из 6 крыс (группа «этанол»), но не у животных группы «этанол+сахароза». По оси абсцисс—время абстиненции (ч); по оси ординат—шкала субъективной оценки поведения

Показатели поведенческих реакций. Данные о потере массы тела были для 3 групп животных примерно сходными: этанол— $10 \pm 3\%$, этанол+сахароза— $10 \pm 2\%$ и сахароза— $11 \pm 2\%$. Наблюдения нашей лаборатории свидетельствуют, что потеря массы тела крыс на 10—15% даже при наличии пищи *ad lib* является функцией общих экспериментальных условий: нарушение нормального питания и обычного привычного сна, значительного стресса при проведении поведенческих реакций. На рис. 1 представлены показатели шкалы субъективной оценки поведения (табл. 1) для животных двух групп («этанол» и «этанол+сахароза») в период лишения этанола после его хронического приема. Животные группы «сахароза» не имели каких-либо признаков интокси-

кации или гипервозбудимости ЦНС. У животных, получавших этанол и сахарозу, проявления интоксикации и гипервозбудимости ЦНС ($p < 0,01$) во время алкогольной абстиненции были менее выражены по сравнению с теми, калорийность рациона которых обеспечивалась введением одного этанола. Тремор обнаруживали лишь у крыс, получавших этанол, спустя 12—24 ч после введения последней дозы. У 17 из 19 крыс, получавших этанол, возникали аудиогенные судороги, то же самое наблюдалось только у 1 из 9 крыс, которым вводили этанол с последующим приемом сахарозы.

Результаты объективной оценки поведения животных разных групп посредством измерения величины начального порога при их раздражении электрическим током, представлены на рис. 2.

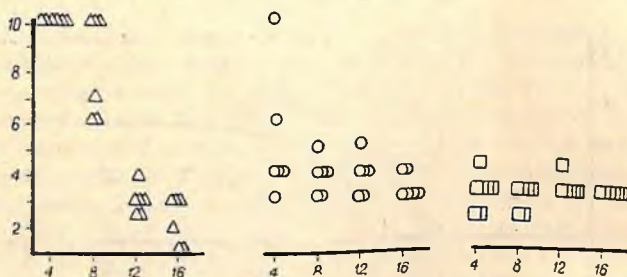


Рис. 2. Показатели начального порога чувствительности крыс к электрическому току. После 8 ч лишения этанола величина начального порога у всех крыс, получавших только этанол, была выше контроля (2—4 мА). Лишь у 1 из 6 крыс группы «этанол+сахароза» показано увеличение показателя начального порога. После 16 ч лишения этанола при состоянии животных с гипervозбудимостью ЦНС показатель начального порога утрачивает чувствительность: у 4 из 6 крыс величина начального порога была в пределах нормы (2—4 мА), но эти животные имели отчетливые симптомы эпилептиформной активности. В течение всего периода лишения величина начального порога была в пределах нормы у крыс группы «сахароза», □. По оси ординат—начальный порог (мА); остальные обозначения те же, что и на рис. 1

Все крысы до введения им первой дозы этанола показали величину начального порога в пределах 2—4 мА. У крыс, получавших этанол, отчетливо проявлялись симптомы интоксикации вплоть до потери установочного рефлекса (—1 по шкале субъективной оценки поведения), а величина их начального порога была >10 мА. В случае дополнительной калорийной добавки к приему этанола (группа «этанол+сахароза») 5 из 6 этих крыс имели гораздо меньшую степень интоксикации, которая, главным образом, выражалась в атаксии (—1 или —2 по шкале субъективной оценки поведения), и иную величину начального порога, равную 3—4 мА. Спустя 16 ч после лишения этанола величина начального порога у крыс из группы «этанол» несколько уменьшалась по сравнению с таковой у животных двух других групп, но это различие не было значительным.

Показатели биоэлектрической активности. В связи с индивидуальными различиями в абсолютных величинах и для выявления изменений, происходящих во время алкогольной абстиненции, величину амплитуды импульсов для каждой крысы выражали в процентах от ее показателя для периода спустя 4 ч после лишения этанола. Для всех животных, подвергнутых хронической интоксикации (группа «этанол»), было характерно значительное увеличение величины амплитуды импульсов в период лишения этанола с отсутствием таковых изменений у представителей двух групп («сахароза» и «этанол+сахароза») (рис. 3). Величина средней мощности ЭЭГ для контрольных крыс была постоянной в течение суток. Увеличение этого показателя по сравнению с контролем происходило у животных групп, подвергнутых ранее хронической интоксикации, в течение первых 16 ч после прекращения приема этанола: на 75% для группы «этанол» и на 25% для группы «этанол+сахароза» (рис. 4). Картина спонтанной ЭЭГ у всех крыс группы «этанол» спустя 24 ч после лишения этанола свидетельствует о проявлении судорожной, эпилептиморфной активности. Видимые подергивания передних лап и мышц морды наблюдали у 5 из 6 животных, а 3 крысы даже погибли после судорожного приступа. Добавка к рациону сахарозы отчетливо уменьшала степень алкогольной интоксикации. У группы животных «этанол+сахароза» спустя 16—24 ч лишения этанола не происходило увеличения средней мощности ЭЭГ, обусловленной продромальной эпилептиморфной активностью.

Обсуждение результатов

Эффект хронического введения повторных высоких доз (>2 г/кг) этанола на содержание аминокислот в целом мозгу крыс после прекращения его приема пока еще мало изучен [23—26]. Данные настоящей работы свидетельствуют, что симптомы гиперовозбудимости ЦНС и возникновение судорожных явлений, присущих алкогольной абстиненции, не связаны с изменением уровня ГАМК в целом мозгу подопытных животных. Однако это положение не является абсолютным утверждением для отрицания роли системы ГАМК в этиологии алкогольного абстинентного синдрома. Изменения в уровне ГАМК при этом состоянии могут происходить в отделах головного мозга, связанных с генерацией судорожной активности [23, 27]. Анализ целого мозга не позволяет также обнаружить сдвиги в содержании ГАМК и глутаминовой кислоты в пресинаптических нервных окончаниях или в постсинаптических рецепторах.

Уровень глутамината был примерно в 2 раза меньше в целом мозгу крыс в период лишения этанола после предварительного его хронического введения. Не исключено, что это снижение содержания глутамината в мозгу крыс, получавших этанол, обусловлено активизацией обмена веществ в нервных структурах вследствие гиперовозбудимости ЦНС и возникновения судорог во время алкогольной абстиненции. Функциональное значение падения уровня глутамината в мозгу животных и его обусловленность хроническим приемом этанола предстоит еще установить.

но следует отметить способность введенного глутамина снижать добровольное потребление этанола у крыс [28] и оказывать лечебный эффект у людей [29].

Важным следствием, вытекающим из настоящей работы, является установление, что выраженность симптомов алкогольного абстинентного синдрома связана с калорийностью пищевого рациона во время хронической алкоголизации подопытных животных. Отсутствие разницы в скорости исчезновения этанола из крови животных двух групп («этанол» и «этанол+сахароза») подтверждает, что влияние калорийности диеты не связано с увеличением процесса выведения этанола.

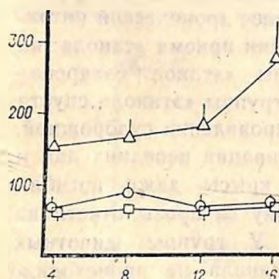


Рис. 3

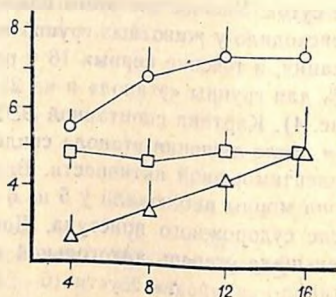


Рис. 4

Рис. 3. Показатели величины двойной амплитуды (мкВ) ЭЭГ подопытных крыс в период алкогольной абстиненции. Данные выражены к показателю 4 ч лишения этанола. Значительное увеличение величины амплитуды ЭЭГ обнаружено лишь у крыс группы «этанол», Δ: добавление к рациону сахарозы способствовало стабильности показателя величины амплитуды ЭЭГ у животных в период абстиненции. По оси ординат—двойная амплитуда; обозначения те же, что и на рис. 2

Рис. 4. Изменения показателя средней мощности ЭЭГ у крыс разных групп в период алкогольной абстиненции. Величина средней мощности ЭЭГ у крыс группы «этанол+сахароза» (○) до введения первой дозы этанола была выше таковых у представителей двух других групп. Следовательно, статистически достоверное увеличение ($p < 0,01$) показателя средней мощности ЭЭГ у крыс группы «этанол+сахароза» по сравнению с таковыми у животных группы «этанол» (Δ) и «сахароза» (□) спустя 8, 12 и 16 ч алкогольной абстиненции не может быть связано с действием этанола и (или) различием в диете. Применение анализа ковариантности (ANOVA) подтвердило, что статистически достоверный прирост ($p < 0,01$) показателя средней мощности ЭЭГ в течение каждые 4 ч происходил только у крыс, получавших лишь этанол. Группа крыс, получавших одну сахарозу, не имела изменений величины средней мощности ЭЭГ. По оси ординат—средняя мощность ЭЭГ (интегративные импульсы/15 с); обозначения те же, что и на рис. 2

Поскольку величина калорийности диеты определялась введением раствора сахарозы, то, тем самым, исключается возможная роль витаминов, минеральных и биологически активных веществ в процессе купирования симптомов алкогольного абстинентного синдрома. Мы лишь подчеркиваем важность соответствующих контролей режима питания в

нейротоксических исследованиях, так как объяснить механизм защитного эффекта калорийности пищевого рациона довольно затруднительно.

Показатели шкалы субъективной оценки поведения животных и параметры величины начального порога к действию электрического тока оказались полезными для установления степени интоксикации и выраженности симптомов абстиненции. Следует также подчеркнуть ценность использования интегрированного показателя средней мощности ЭЭГ для количественной оценки возбудимости ЦНС, который впервые был применен нами в исследованиях хронической интоксикации и алкогольной абстиненции.

NEUROCHEMICAL AND BEHAVIOURAL PARAMETERS OF ETHANOL WITHDRAWAL REACTIONS IN RATS

EDMONDS H. L. Jr*, SYTINSKY I. A**, SYLVESTER D. M***,
BELLIN S. I***

*School of Medicine, University of Louisville, USA

**Chair of Biochemistry, Lesgaft Institute of Physical Education,
Leningrad, USSR

***College of Pharmacy, Washington State University, USA

The relationship between the whole brain amino acid levels (GABA, glutamate and glutamine) and electroencephalographic (average energy content of EEG) and behavioural (subjective behaviour assesment scale and basic threshold of electric stimulation) parameters of ethanol withdrawal reactions has been studied in rats. Four dietary (Rat Chow, ad lib; Sucrose 25.2 Kcal/kg $\times$ 3 doses/day; Ethanol 25.2 Kcal/kg $\times$ 3 doses/day; Ethanol 25.2 Kcal/kg+Sucrose 25.2 Kcal/kg $\times$ 3 doses/day) animal groups were used to evaluate the effects of chronic ethanol administration on the above mentioned parameters. The only significant change in amino acid content was a decrease in glutamine in both the ethanol and ethanol+sucrose groups. Integrated EEG activity increased during withdrawal for 75% in ethanol and for 28% in ethanol+sucrose groups compared to control rats. Only the ethanol group animals manifested signs of withdrawal hyperexcitability: a significant increase in the subjective behavioural index and a slight decrease in the basic threshold of electric stimulation. Sucrose diminished the severity of ethanol withdrawal reactions. The amount of GABA and glutamate in the whole brain didn't affect the severity of ethanol withdrawal reactions.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сытинский И. А. Биохимические основы действия этанола на центральную нервную систему. М., Медицина, 191 с., 1980.
2. Сытинский И. А.—В кн.: Этанол и обмен веществ (под ред. Ю. А. Островского), Минск, Наука и техника, с. 161—174, 1982.
3. Noble E. P., Tewari S.—In: Metabolic Aspects of Alcoholism. (Ed. C. S. Lieber), London, MTP Press Limited, p. 149—185, 1977.
4. Sytinsky I. A. Abstract book 9th Int. Cong. Biochem., Stockholm, p. 447, 1973.
5. Sytinsky I. A., Priyatkina T. N. Fed. Proc. Trans. Suppl. 23, 879—880, 1964.

6. *Majchrowicz E.* Psychopharmacology, 43, 245—254, 1975.
7. *Edmonds H. L., Jr., Bellin S. I.* Pharmacologist, 23, 486, 1976.
8. *Sokal R. T., Rohlf F. J.* Biometry, San Francisco, W. H. Freeman, 1969.
9. *Sylvester D. M., Edmonas H. L., Jr., Medina M. A.* Proc. Epilepsy Int. Symp. 10, 191, 1978.
10. *Авенирова Е. Л., Маслова М. Н., Розенгарт В. И., Сытинский Н. А.* Вопросы мед. химии, 12, 633—636, 1966.
11. *Shank R. P., Aprison M. H.* J. Neurobiology, 2, 145—151, 1971.
12. *Lajtha A., Toth J.* Brain Res., 76, 546—551, 1974.
13. *Alderman J. L., Shellenberger M. K.* J. Neurochem., 22, 937—940, 1974.
14. *Jakoby W. B., Scott E. M.* J. Biol. Chem., 234, 937—940, 1959.
15. *Graham L. T., Aprison M. H.* Analyt. Biochem., 15, 487—497, 1966.
16. *Bergmeyer H. U.* (ed.) Methods of Enzymatic Analysis. New York, Academic Press, 4, 1720—1721, 1974.
17. *Dixon W. J.* (ed.) Biomedical Computer Programs. Berkley: University of California Press, 653—734, 1975.
18. *Kirk R. E.* Experimental Design: Procedures for Behavioral Science. Belmont, CA Brooks/Cole, 1968.
19. *Payne J. P., Hill D. W., Wood J. C. L.* Nature, 217, 903—904, 1968.
20. *Goldstein A.* Biostatistics. New York, Mac Millan, 1964.
21. *Goldstein L., Beck R. A.* Int. Rev. Neurobiol., 8, 266—309, 1965.
22. *Lyczak R. A.* Elementary Programming for Statistics. North Scituate, MA. Duxbury Press, 1980.
23. *Cooper B. R., Viik A., Gerris R. M., White H. L.* J. Pharmacol. Exp. Ther., 209, 396—403, 1979.
24. *Hemmingsen R., Chapman A. G.* J. Neurochem., 34, 1561—1566, 1980.
25. *Эдмондс Х. Л. (мл.), Сильвестер Д. М., Беллин С. И., Благова О. Е., Никитина З. С., Сытинский Н. А.* Физиол. ж. СССР, 96, 1298—1306, 1980.
26. *Edmonds H. L., Jr., Sytinsky I. A., Sylvester F. M., Bellin S. I.* Neurobehav. Toxicol. Teratol., 4, 34—41, 1982.
27. *Volicer L., Hurter B. P.* J. Pharmac. Exp. Ther., 200, 298—305, 1977.
28. *Rodgers L. L., Pelton R. B., Williams R. J.* J. Biol. Chem., 214, 503—506, 1955.
29. *Rodgers L. L., Pelton R. B.* J. Stud. Alcohol., 18, 581—587, 1957.

* Медицинский колледж Луизвилльского
университета, Кентукки;

Поступила 7. IX 1982

** Кафедра биохимии ГДОИФК им. П. Ф. Лесгафта,
Ленинград

*** Фармацевтический колледж государственного
университета, Пуллман, Вашингтон,

УДК 612.82:577.1

НЕКОТОРЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СИНАПТОСОМ ИЗ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС, ЛИШЕННЫХ ПАРАДОКСАЛЬНОЙ ФАЗЫ СНА

НИЛОВА Н. С.

Показано, что по метаболическому ответу на изменение содержания одновалентных катионов и Ca^{2+} в среде инкубации синапсомы, полученные из мозга крыс с нарушением сна, могут отличаться от синапсомы нормальных животных. В опытах *in vitro* наблюдали изменение чувствительности дыхания синапсомы из больших полушарий и ствола головного мозга крыс, подвергнутых лишению парадоксальной фазы сна: ингибирование дыхания на глутамине в присутствии Na^+ в пониженной концентрации усиливалось, активация дыхания в ответ на деполяризацию вследствие увеличения содержания K^+ уменьшалась. В то же время изменение дыхания синапсомы в присутствии Ca^{2+} оказалось аналогичным изменению дыхания при нарушении сна: добавление Ca^{2+} не влияло на эффект нарушения сна на дыхание. Совпадение эффектов лишения парадоксальной фазы сна подопытных животных и прибавления Ca^{2+} в среду инкубации было отмечено также при исследовании сорбции рутевого красного синапсомы из головного мозга крыс. Полученные данные могут свидетельствовать о возможности конформационных перестроек синаптических мембран при нарушении сна.

В настоящее время установлено, что при естественном сне головной мозг находится в активном состоянии, отличающемся по своему характеру от бодрствования. Ряд биохимических данных [1—3] позволяет предположить, что во время сна ликвидируются те конформационные изменения мембран (в первую очередь синаптических), которые постепенно развиваются во время бодрствования [3—5]. Для репаративных процессов именно в нейронах особенно нужна парадоксальная фаза сна (ПФС). Однако экспериментальные данные об альтерации клеточных мембран при нарушении сна немногочисленны и косвенны.

Альтерация синаптических мембран при нарушении сна, сопровождающаяся изменением уровня возбудимости нейронов, может выражаться, в частности, в перераспределении ионов по поверхности синаптических мембран, в изменении проницаемости к Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , в перераспределении этих катионов (особенно Ca^{2+}) в синаптической области.

Поэтому представляется важным изучить метаболический ответ синапсомы, выражающийся в изменении дыхания, при различном ионном составе среды инкубации в условиях лишения животных ПФС; привлекает внимание также и возможность сдвигов сорбционных свойств синап-

наптических мембран. Результаты отдельных серий опытов были опубликованы ранее [6—8].

Материалы и методы

Опыты ставили на белых крысах-самцах массой 160—180 г. Лишенные ПФС производили помещением животных на 24 ч на небольшие площадки, окруженные водой [9]. Контролем служили животные, которые содержались в обычных клетках.

Синапсосомы получали низкоскоростным центрифугированием в градиенте плотности сахарозы [10]. Дыхание регистрировали в аппарате Варбурга. Средой инкубации служила следующая смесь (в мМ): Na^+ —124, K^+ —5, KH_2PO_4 —1,2, MgSO_4 —1,3, трис — 30 при pH 7,35. В отдельных сериях опытов концентрация Na^+ составляла 7,5, K^+ —50 и Ca^{2+} —0,15 мМ. Субстратом дыхания служил глутамин или пирuvat в концентрации 5 мМ. Пробы содержали 7—9 мг белка. Белок определяли по Lowry и соавт. [11]. Сорбцию рутениевого красного анализировали по методу Левина и сотр. [12]. Условия инкубации проб описаны ранее [8].

Результаты и обсуждение

В первых сериях опытов исследовали дыхание синапсосом в среде с пониженным содержанием Na^+ (7,5 мМ). Результаты экспериментов представлены в табл. 1. Из этих данных следует, что дыхание синапсосом из больших полушарий и ствола головного мозга контрольных животных оказалось нечувствительным к понижению концентрации Na^+ в

Таблица 1
Влияние лишения парадоксальной фазы сна (ПФС) на дыхание на глутамине синапсосом головного мозга крыс при различном содержании Na^+ и Ca^{2+} в среде инкубации (в мкмоль $\text{O}_2/10$ мг белка/ч)

Состояние животного	Большие полушария Na^+ (мМ)			Стволовая часть головного мозга Na^+ (мМ)		
	124	7,5	7,5+ Ca^{2+} (0,15 мМ)	124	7,5	7,5+ Ca^{2+} (0,15 мМ)
Контроль	1,77±0,09 (18)	1,62±0,07 (17)	1,45±0,05 (18) $p < 0,05$	1,27±0,09 (11)	1,24±0,07 (13)	1,03±0,10 (12) $p < 0,05$
Лишение ПФС, 24 ч	1,77±0,07 (20)	1,51±0,07 (20) $p < 0,01$	1,48±0,06 (20)	1,25±0,04 (12)	1,03±0,07 (11) $p < 0,02$	1,03±0,07 (12)

среде инкубации при использовании глутамина в качестве субстрата дыхания. Это подтверждают и литературные данные о том, что основная система транспорта глутамина в синапсосомы не зависит от Na^+ [13]. Дыхание же синапсосом из головного мозга крыс, лишенных ПФС, становилось чувствительным к уменьшению концентрации Na^+ в среде инкубации: происходило статистически достоверное снижение потребления кислорода на 15% синапсосомами больших полушарий и на 18%

синапсосами стволовой части мозга. Это изменение чувствительности к Na^+ косвенно свидетельствует об альтерации синаптических мембран при нарушении сна, что может проявляться в изменении работы некоторых переносчиков, в частности глутаминна. Видимо, такая альтерация невелика и носит локальный характер.

Это заключение подтверждают результаты опытов, поставленных в аналогичных условиях с использованием в качестве субстрата дыхания глутамата [6]. Дыхание синапсосом из головного мозга контрольных животных на глутамате было чувствительно к уменьшению концентрации Na^+ в среде инкубации: ингибирование потребления кислорода составляло 27–34%. На фоне таких достаточно больших сдвигов эффектов собственно нарушения сна на дыхание уже не наблюдали.

В последующих сериях опытов [7] изучали дыхание синапсосом в условиях деполяризации на фоне нарушения сна животных. Деполяризацию вызывали повышением содержания K^+ в среде инкубации с 5 до 50 мМ. Многочисленные литературные данные указывают на то, что метаболический ответ синапсосом на деполяризующее воздействие включает целый ряд компонентов: усиление дыхания и аэробного гликолиза, Ca^{2+} -зависимый выброс медиаторов, увеличение связывания Ca^{2+} , структурные перестройки мембран вследствие лабильзации белок-липидных связей и усиления фосфорилирования белков [14–16].

Данные, характеризующие дыхание синапсосом на пирувате в условиях деполяризации и при лишении крыс ПФС в течение 24 ч, представлены в табл. 2. Они показывают, что повышение концентрации K^+ до 50 мМ вызывало активацию на 20–24% дыхания синапсосом, выделенных из головного мозга контрольных животных, если субстратом дыхания служил пируват. Этот хорошо известный метаболический ответ на деполяризацию имеет, по всей видимости, сложную природу. Помимо повышения дыхания, он включает усиление аэробного гликолиза и активацию пируватдегидрогеназы [17, 18]. Пусковым механизмом может служить уменьшение количества АТФ [18], возможно, вследствие активации фосфорилирования белков синаптических мембран [16].

Синапсосомы, выделенные из головного мозга крыс, лишенных ПФС, отличались пониженной чувствительностью к деполяризующему воздействию K^+ : усиление дыхания в этих условиях было менее выражено, чем в контроле, и составляло 12% для синапсосом больших полушарий и 9% для синапсосом ствола. Возможно, что такое уменьшение метаболического ответа синапсосом на деполяризующее воздействие является отражением уже существующего возбуждения, развивающегося в синаптических структурах при нарушении сна. Результатом этого может быть понижение возбудимости синаптических мембран и пониженная способность отвечать на деполяризацию.

Одновременно с изменением концентрации Na^+ и K^+ в среде инкубации исследовали эффект Ca^{2+} в небольших концентрациях на дыхание синапсосом из головного мозга лишенных ПФС крыс.

Таблица 2

Влияние лишения парадоксальной фазы сна (ПФС) на дыхание на пирувате синапсом головного мозга крыс при различном содержании K^+ и Ca^{2+} в среде инкубации (в μ моль $O_2/10$ мг белка/ч)

Состояние животного	Большие полушария				Стволовая часть головного мозга			
	в отсутствие Ca^{2+}		в присутствии Ca^{2+} (0,15 мМ)		в отсутствие Ca^{2+}		в присутствии Ca^{2+} (0,15 мМ)	
	K^+ (5 мМ)	K^+ (50 мМ)	K^+ (5 мМ)	K^+ (50 мМ)	K^+ (5 мМ)	K^+ (50 мМ)	K^+ (5 мМ)	K^+ (50 мМ)
Контроль	$2,93 \pm 0,09$ (19)	$3,52 \pm 0,09$ (19) $p < 0,001$	$3,03 \pm 0,09$ (17)	$3,01 \pm 0,11$ (17)	$2,45 \pm 0,07$ (13)	$3,3 \pm 0,07$ (13) $p < 0,001$	$2,48 \pm 0,10$ (13)	$2,83 \pm 0,09$ (13) $p < 0,05$
Лишение ПФС, 24 ч	$3,10 \pm 0,09$ (19)	$3,47 \pm 0,13$ (19) $p < 0,05$	$3,06 \pm 0,12$ (20)	$3,43 \pm 0,14$ (20) $p < 0,05$	$2,42 \pm 0,06$ (13)	$2,63 \pm 0,07$ (13) $p < 0,05$	$2,38 \pm 0,10$ (13)	$2,70 \pm 0,07$ (13) $p < 0,05$

p —достоверность различия между пробами, содержащими K^+ в концентрации 5 мМ и 50 мМ

Как видно из табл. 1, добавление Ca^{2+} в концентрации 0, 15 мМ на фоне пониженного содержания Na^+ вызывало в контроле статистически достоверное уменьшение дыхания синапсом в различных отделах головного мозга на 11—17% по отношению к пробам с пониженным содержанием Na^+ и без Ca^{2+} в среде. Влияние Ca^{2+} на окисление может быть двояким—на уровне митохондрий и на уровне поступления окисляемого субстрата. С одной стороны, Ca^{2+} способен угнетать NAD-зависимое окисление субстратов, вызывая утечку адениннуклеотидов из митохондрий [19]; с другой стороны, Ca^{2+} может ингибировать поступление субстратов окисления в синапсомы, связываясь с синаптическими мембранами и вызывая альтерацию переносчиков.

Приведенные в табл. 1 данные показывают, что добавление Ca^{2+} в среду инкубации синапсом, выделенных из головного мозга крыс, лишенных ПФС, не вызывало какого-либо дополнительного изменения дыхания по сравнению с пробами, содержащими Na^+ в пониженной концентрации в отсутствие Ca^{2+} . Таким образом, изменение дыхания синапсом, выделенных из головного мозга лишенных ПФС крыс, на фоне пониженного содержания Na^+ было таким же, как если бы здесь уже присутствовал Ca^{2+} , и его добавление не вызывало существенных сдвигов в дыхании синапсом,

Близость эффектов предшествовавшего нарушения сна животного и добавления извне Ca^{2+} в среду инкубации наблюдали и при исследовании дыхания синапсом в условиях деполяризации (табл. 2). В контроле добавление Ca^{2+} вызывало уменьшение метаболического ответа на деполяризующее воздействие K^+ в высоких концентрациях: деполяризация не вызывала усиления дыхания синапсом из больших полушарий, а в синапсомах ствола оно составляло всего 14%. В контроле активация дыхания достигала 20% у синапсом больших полушарий и 24% у синапсом стволовой части. При нарушении сна в отсутствие Ca^{2+} метаболический ответ синапсом также ослабевал: в ответ на деполяризующее воздействие наступала активация дыхания всего на 12% в синапсомах больших полушарий и на 9% в синапсомах ствола. Добавление Ca^{2+} на фоне лишения ПФС не вызывало какого-либо дополнительного эффекта на дыхание синапсом по сравнению с тем, что давало только нарушение сна при инкубации проб в отсутствие Ca^{2+} . Активация дыхания в данном случае составляла 12% для синапсом из больших полушарий и 13% для синапсом ствола.

Таким образом, приведенные результаты экспериментов могут быть косвенным свидетельством альтерации синаптических мембран при нарушении сна, что проявлялось в изменении чувствительности дыхания синапсом к изменению концентрации K^+ и Na^+ в среде инкубации. Изменение дыхания при прибавлении Ca^{2+} в небольшой концентрации имело ту же направленность, что и изменение дыхания синапсом мозга крыс, лишенных ПФС; вследствие этого Ca^{2+} на фоне на-

рушения сна не изменял эффект лишения ПФС на дыхание синапсом.

Более отчетливо взаимоотношения эффектов добавленного ивие Ca^{2+} и влияния лишения ПФС на свойства синаптических мембран проявлялись при изучении сорбции рутенневого красного—крупного шестивалентного катиона (табл. 3) [8].

Таблица 3

Влияние лишения ПФС на связывание рутенневого красного синапсосомами головного мозга крыс

Состояние животного	Кора больших полушарий		Стволовая часть головного мозга	
	количество связанного красителя моль, кг белка $\times 10^2$			
	в отсутствие Ca^{2+}	в присутствии Ca^{2+}	в отсутствие Ca^{2+}	в присутствии Ca^{2+}
Контроль	$0,880 \pm 0,006$ (27)	$0,510 \pm 0,007$ (21) $p < 0,01$	$0,390 \pm 0,005$ (26)	$0,340 \pm 0,005$ (27)
Лишение ПФС, 24 ч	$0,430 \pm 0,001$ (26) $p^* < 0,001$	$0,350 \pm 0,003$ (26) $p^* < 0,01$	$0,260 \pm 0,002$ (30) $p^* < 0,001$	$0,310 \pm 0,005$ (20)

p —вероятность достоверности различий связанного красителя в присутствии и в отсутствие Ca^{2+}

p^* —то же в контроле и при лишении ПФС

Лишение ПФС приводило к уменьшению числа мест связывания красителя на 51% синапсосомами коры больших полушарий и на 31% синапсосомами ствола. Добавление же Ca^{2+} в концентрации 0,5 мМ вызывало уменьшение числа мест связывания синапсосомами коры на 42% и практически не влияло на сорбцию рутенневого красного синапсосомами ствола (уменьшение числа мест связывания в данном случае статистически недостоверно). Если сравнить сорбцию рутенневого красного синапсосомами головного мозга при лишении ПФС в присутствии Ca^{2+} с сорбцией красителя синапсосомами контрольных животных также в присутствии Ca^{2+} , то видно, что эффект лишения ПФС на изменение числа мест связывания рутенневого красного уменьшался при наличии Ca^{2+} ; снижение числа мест связывания в коре составляло 31% (против 51% в отсутствие Ca^{2+}), а уменьшение числа мест связывания красителя синапсосомами ствола становилось статистически недостоверным. Эти данные свидетельствуют об определенных конформационных изменениях синаптических мембран при нарушении сна. Возможно также, что изменение конформации, происходящее при лишении животных ПФС и вызываемое присутствием Ca^{2+} в среде инкубации, затрагивает хотя бы частично одни и те же центры связывания красителя.

Идентифицировать центры связывания рутенневого красного и Ca^{2+} в синапсосах в настоящее время затруднительно. Этот краси-

тель и катион связываются с широким спектром кислых групп различных биополимеров, в особенности гликопротеинов, гликолипидов и фосфолипидов. Ганглиозиды и некоторые гликопротеины вносят значительный вклад в поверхностный отрицательный заряд синапсом [20]. Можно допустить, что изменение сорбции рутениевого красного синапсом из головного мозга крыс, подвергнутых лишению ПФС, было связано с перераспределением зарядов, вызванным изменением ориентации гликопротеинов и гликолипидов, определяющих конфигурацию и уровень возбудимости синаптических мембран. Присутствующий в среде инкубации Ca^{2+} может отчасти связываться теми же центрами. Возможно также некоторое перераспределение Ca^{2+} внутри синапсом и при нарушении сна. Этим можно объяснить параллельность эффектов добавленного извне Ca^{2+} и последствий нарушения сна на некоторые метаболические характеристики синапсом.

Следует отметить, что установленные эффекты лишения ПФС на дыхание синапсом при изменениях ионного состава среды инкубации невелики по абсолютным величинам и носят однозначный характер—картина аналогична для синапсом из больших полушарий и ствола головного мозга. По-видимому, речь идет о небольших альтерациях синаптических мембран, отражающих пластичность синапсов в ответ на развитие такого стресса, как нарушение сна.

ON BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF BRAIN SYNAPTOSOMES IN RATS DEPRIVED FROM PARADOXICAL PHASE OF SLEEP

NILOVA N. S.

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

The metabolic response of brain stem and hemispheres' synaptosomes to the shift in ion's content in the media has been studied in rats deprived from the paradoxical phase of sleep. Under these conditions the respiration of synaptosomes was less sensible to activation in the depolarizing media (elevated K^+) and more sensible to inhibition in the presence of low Na^+ (in vitro). At the same time changes in the respiration of synaptosomes in the presence of Ca^{2+} in control animals were similar to those in animals deprived from sleep. Another evidence to the similarity of effects of Ca^{2+} and sleep deprivation was detected in the test with ruthenium red sorption by synaptosomes. Data obtained point to the possible conformational reorganization of synaptic membranes on sleep deprivation.

ЛИТЕРАТУРА

1. Giuditta A.—In: Biochemical correlates of brain structure and function (ed. A. N. Davison), L., 293—337, 1977.
2. Karnovsky M. L., Reich P.—In: Adv. in neurochemistry (eds. B. W. Agranoff, M. H. Aprison), 2, N. Y., p. 213—275, 1977.

3. Демин Н. Н., Коган А. Б., Моисеева Н. И. Нейрофизиология и нейрохимия сна, Л., Наука, 1978.
4. Демин Н. Н.—В кн.: Цитохимические корреляты торможения нейронов (под ред. Л. З. Певзнера), Л., Наука, с. 18—39, 1978.
5. Демин Н. Н. Нейрохимия, 1, 20—26, 1982.
6. Нилова Н. С. Физиол. ж. СССР, 65, 352—356, 1979.
7. Нилова Н. С. Физиол. ж. СССР, 67, 1324—1328, 1981.
8. Нилова Н. С. Цитология, 22, 1081—1084, 1980.
9. Jouvet D., Vimont P., Delorme F. C. r. Soc. biol., 158, 756—759, 1964.
10. Hajos F. Brain Res., 93, 485—489, 1975.
11. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., 193, 265—275, 1961.
12. Тугай В. А., Левин С. В., Курский М. Д. Цитолгия, 15, 1103—1109, 1973.
13. Roberts P. J., Keen P. Brain Res., 67, 352—357, 1974.
14. Bellerocche J. S. de, Bradford H. S. J. Neurochem., 21, 495—505, 1973.
15. Bradford N. S., Bennet G. W., Thomas A. J. J. Neurochem., 21, 495—505, 1973.
16. Глебов Р. Н., Крыжановский Г. Н., Маликова Л. А., Родина Б. И., Ротанец В. В., Сандалов Ю. Г., Швец В. Н. Биохимия, 41, 975—981, 1976.
17. Bull R. J., Lutkenhoff S. D. J. Neurochem., 21, 913—922, 1973.
18. Kovachich G. B., Haugaard N. J. Neurochem., 28, 923—927, 1977.
19. Vinogradov A., Scarpa A., Chance B. Arch. Biochem. Biophys., 152, 646—654, 1972.
20. Garcia-Segura L. M., Martinez-Rodriguez R., Martinez-Murillo R., Bodonez E., Toledano A. Acta histochem., 61, 89—97, 1978.

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

Поступила 10. VIII 1982

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 615.015.1:547.466.3:612.82.001.6

ИНГИБИРОВАНИЕ ГАМК И ФЕНИБУТОМ
K⁺-СТИМУЛИРУЕМОГО ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ³H-ДОФАМИНА
ИЗ СИНАПТОСОМ ПРИЛЕЖАЩЕГО ЯДРА МОЗГА КРЫС

КОВАЛЕВ Г. И., ХЕТЕН Л.

Фенибут (β -фенил-ГАМК)—липофильное производное γ -аминомасляной кислоты—применяется как транквилизирующее средство со специфическим спектром фармакологического действия [1]. Следует признать, однако, что нейрoхимические механизмы эффекта препарата остаются до сих пор недостаточно изученными. Введение фенильного радикала в структуру молекулы ГАМК—тормозного медиатора в ЦНС млекопитающих—обусловило появление свойств, отличающихся от таковых у ГАМК. Так, фенибут не связывается с бичукуллинчувствительными рецепторами ГАМК [2], не взаимодействует с переносчиком системы захвата ГАМК синапсосомами [3]: в меньшей степени, чем ГАМК, ускоряет высвобождение ³H-ГАМК синапсосомами коры мозга крыс, проявляя чувствительность к действию как бичукуллина, так и пикротоксина [4].

Вместе с тем, согласно поведенческим и биохимическим критериям, фенибут способен также вызывать изменения нейрoхимических показателей и в дофаминергической системе, в частности в лимбических структурах мозга крыс [5].

Целью настоящей работы явилось изучение роли процесса высвобождения ³H-дофамина в механизме действия фенибута и ГАМК в синапсосомах прилежащих ядер мозга крыс в условиях *in vitro**.

Крысы-самцы линии Вистар (140±10 г) декапитировали после кратковременного (8 с) погружения в жидкий азот. Мозг быстро извлекали, на холоду выделяли прилежащие ядра (n. accumbens) (25±30 мг), которые далее измельчали в гомогенизаторе стекло-тефлон в 0,7 мл 0,32 М сахарозы, содержащей (в мМ): 2,0 Na₂HPO₄; 0,7 KН₂PO₄; 1,0 MgCl₂; 3,0 ЭДТА, pH 7,3.

Гомогенат центрифугировали (1000 g, 10 мин, 4°) для осаждения ядер и обломков клеток. Время от декапитации до инкубации синапто-

* Работа выполнена в Институте фармакологии и токсикологии клиники Шарите университета им. Гумбольдта в Берлине, ГДР. Авторы приносят благодарность Х. Энгель за техническую помощь в проведении экспериментов.

сом не превышало 15 мин. Процедуру по захвату меченого дофамина проводили по Rallgeyman и соавт. [6]. Пробы суспензии неочищенных синапсом разводили в отношении 1:5 модифицированным буфером [7], содержащим (в мМ): 130 NaCl; 1,7 KCl; 1,3 KH_2PO_4 ; 10,4 Na_2HPO_4 ; 1,3 MgSO_4 ; 1,3 CaCl_2 ; 11,0 глюкозы; 17,3 сахарозы; 1,1 аскорбиновой кислоты; 0,2 динатриевой соли ЭДТА; 0,125 паргиллина [8].

После насыщения буфера карбогеном величина pH была доведена до 7,3. Через 5 мин преннкубации синапсом при 37° в пробы вносили ^3H -дофамин («Amersham», 53,2 K_B /ммоль) до критической концентрации $4 \cdot 10^{-7}$ М. Синапсосомы инкубировали 10 мин. Захват останавливали быстрой фильтрацией суспензии через стекляннно-волоконистые фильтры («Whatman» GFB), и пробы помещали в суперфузионные камеры (внутренний объем 0,4 мл), модифицированные по Schmieder и соавт. [9]. Суперфузию проводили со скоростью 0,5 мл/мин. Фракции собирали ежесекундно. Схема суперфузии: 5 мин—буфером McIlwain, 4 мин—буфером McIlwain с мМ фенибута, ГАМК («Reanal») или пикротоксином («Fluka»), либо в сочетании; 5 мин—буфером, содержащим 30 мМ KCl с (без) упомянутыми веществами; 3 мин—буфером McIlwain. После окончания суперфузии фильтр и пробы растворяли в 8 мл сцинтиллятора Брэя для измерения радиоактивности. Эффект вещества на вызванную секрецию оценивали в процентах относительно действия 30 мМ KCl за 5-минутный период, принятого за 100%. Радиоактивность измеряли при помощи счетчика LKB-1210 (Ultrabeta). Статистический анализ проводили по непараметрическому критерию Гилкоксона, Манна и Уитни.

Установлено, что фенибут, ГАМК и пикротоксин не изменяли процесса базального высвобождения ^3H -дофамина из предварительно нагруженных синапсом прилежащих ядер мозга крыс. ГАМК в концентрации 50 мМ уменьшала (таблица) интенсивность K^+ -стимулируемого высвобождения ^3H -дофамина до 75%. Пикротоксин—блокатор хлорного ионофора в постсинаптическом рецепторном комплексе ГАМК-ергических синапсов [10]—не влиял на выброс ^3H -дофамина, вызванный калиевой деполяризацией, однако, будучи введенным совместно с 50 мМ ГАМК, нейтрализовал действие последней. По-видимому, это может свидетельствовать о наличии в дофаминергических нервных окончаниях прилежащих ядер мозга пресинаптических ГАМК-рецепторов, чувствительных к действию пикротоксина. Эти факты дополняют сведения о нейронной организации прилежащих ядер [11, 12]. Фенибут в данных условиях эксперимента проявил аналогичную ГАМК активность относительно вызванного высвобождения ^3H -дофамина: ингибировал процесс на 25% и показал зависимость этого торможения от присутствия пикротоксина (таблица).

Эти данные находятся в некотором противоречии со сведениями, полученными в экспериментах с ГАМК и баклофеном (пара-хлорфенил-ГАМК). Так, ГАМК стимулировала спонтанный [13] и вызванный деполяризацией [13, 14] выход ^3H -дофамина из срезов стриатума,

проявляя чувствительность к действию пикротоксина. Причиной данных расхождений можно считать зависимость от толщины срезов [14], двоякое действие ГАМК на внутриклеточные места хранения дофамина и бикуккуллинчувствительные [15] рецепторы ГАМК [16]. Надо иметь в виду, что большинство цитируемых данных получено на срезах, в то время как синаптосомы представляют собой модель *in vitro*

Таблица
Влияние фенибута и ГАМК на вызванную секрецию 3H-дофамина синаптосомами прилежащих ядер мозга крыс ($M \pm m$)

Вещества (мкМ)	n	Изменения, %	Критерий достоверности
I Контроль*	9	100,0 $\pm$ 8,8	
II ГАМК (50)	4	75,3 $\pm$ 14,5	$p < 0,02$ (Т-тест)
III Пикротоксин (50)	3	105,4 $\pm$ 9,1	$p > 0,05$
IV ГАМК (50)+пикротоксин (50)	3	107,6 $\pm$ 4,6	$p > 0,05$
V Фенибут (50)	5	75,5 $\pm$ 21,3	$p < 0,05$ (U-тест)
VI Фенибут (50)+пикротоксин (50)	3	104,1 $\pm$ 2,4	$p > 0,05$

* за 100% принят прирост сверхбазального уровня радиоактивности, высвобожденной при суперфузии буфером с 30 мМ КСl без исследуемых веществ, n—число опытов

нервных окончаний. Кроме того, несмотря на схожесть нейронной организации стриатума и прилежащих ядер [12], чувствительность рецепторов в этих структурах может быть различной [17]. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что ГАМК и фенибут оказывают регулирующее влияние на дофаминсодержащие нервные окончания в прилежащих ядрах, действуя на пикротоксинчувствительные участки. Возможно, что места связывания двух исследованных соединений являются одними и теми же, как это было показано для баклофена [18] и фенибута [19] на основе экспериментов, а для L-баклофена и на основании теоретических расчетов [20].

GABA AND PHENYBUT INHIBIT POTASSIUM-STIMULATED RELEASE OF ³H-DOPAMINE FROM RAT BRAIN N. ACCUMBENS SYNAPTOSOMES

KOVALEV G. I., HETEV L.

Institute of Pharmacology, USSR Academy of Medical Sciences,
Moscow, USSR

Institute of Pharmacology and Toxicology, Humboldt University, Berlin, DDR

Both GABA and phenybut (β -phenyl-GABA), 50 μ M each, decreased potassium-stimulated release of ³H-dopamine during superfusion of rat brain n. accumbens synaptosomes up to 75.3 $\pm$ 14.5% and 75.5 $\pm$ 21.3%, respectively. Picrotoxin (50 mM) eliminated these effects, but didn't affect the spontaneous release. Existence of the picrotoxin-dependent receptors regulating the presynaptic dopamine release from dopamine-containing n. accumbens nerve terminals is suggested.

ЛИТЕРАТУРА

1. Хаунина Р. А., Ланин Н. П. Хим.-фарм. ж., 12, 125—127, 1976.
2. Galli A., Ziletti L., Scotton M., Adembri G., Giotti A. J. Neurochem., 32, 1123—1125, 1979.
3. Морозов Н. С., Ковалев Г. И., Майсов Н. И., Ковалев Г. В., Раевский К. С. Хим.-фарм. ж., 1, 13—15, 1977.
4. Ковалев Г. И., Прихожан А. В., Раевский К. С. Бюл. экпер. биол. и мед., 94, 11, 59—61, 1982.
5. Алликметс Л. Х., Ряго Л. К., Нурк А. М. Бюл. экпер. биол. и мед., 93, 5, 64—65, 1982.
6. Palfreyman M. G., Palfreyman E. S., Clark S. G. Eur. J. Pharmacol., 28, 379—383, 1974.
7. McIlwain H. Biochem. J., 49, 382—393, 1991.
8. Hetey L., Quiring K. Acta biol. med. germ., 36, 889—895, 1980.
9. Schmieder S., Rudolf E., Fischer H.-D. Acta biol. med. germ., 37, 1707—1711, 1978.
10. Olsen R. Mol. and Cell Biochem., 39, 2, 261—279, 1981.
11. Walaas L., Fonnum F.—In: GABA-neurotransmitters, eds. P. Krogsgaard-Larsen, J. Scheef-Kruger, H. Kofod, Munksgaard—Copenhagen, Academic Press, p. 60—73, 1979.
12. Jones D. L., Mogensson G. L., Wu M. Neuropharmacology. 20, 29—37, 1981.
13. Giorgiueff M. F., Kemel M. L., Glowinski J., Besson M. J. Brain Res., 139, 115—130, 1978.
14. Starr M. Eur. J. Pharmacol., 50, 215—226, 1979.
15. Bowery N. G., Hill D. R., Hudson A. L., Doble A., Middlemiss D. N., Shaw J., Turnbull M. Nature, 283, 92—94, 1980.
16. Reimann W. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 316, 67, 1981.
17. Hitri A., Weiner W. D., Klawaus H. L.—In: Catecholamines: Basic and Clin. Front. Proc. 4th Int. Catecholamine Simp., Pacific Grove, Calif., v. 1, 553—555, 1978.
18. Bowery N. G., Hill D. R., Hudson A. L. Brit. J. Pharmacol., 74, 222E—223P, 1981.
19. Ряго Л. К., Нурк А. М., Корнеев А. Я., Алликметс Л. Х. Бюл. экпер. биол. и мед., 94, 11, 58—59, 1982.
20. Azanza M. Gen. Pharmacol., 12, 123—128, 1981.

Институт фармакологии АМН СССР,

Москва

Институт фармакологии и токсикологии
университета им. Гумбольдта, Берлин, ГДР

Поступила 20. XII 1982

УДК 612.8.015

ВЛИЯНИЕ ЭНДОГЕННЫХ ОЛИГОПЕПТИДНЫХ ЛИГАНДОВ НЕЙРОСПЕЦИФИЧЕСКИХ БЕЛКОВ ГРУППЫ S-100 НА ПОВЕДЕНИЕ

ШЕРСТНЕВ В. В., КОЧЕТКОВ И. В., БЕЛЯЕВ С. В., ЛЫСОВА Н. П.,
ДОЛГОВ О. Н., ПОЛЕТАЕВ А. Б.

Большой интерес, вызываемый естественными физиологически активными олигопептидами, возможность клинического применения этих высокоактивных и избирательно действующих молекулярных факторов [1—3] обуславливают необходимость разработки новых подходов к поиску олигопептидных регуляторов определенных функций и «поведенчески» активных олигопептидов. В работах последних лет указывалось на теоретическую возможность тесного структурно-функционального взаимодействия между системами нейроспецифических белков, рассматриваемых в качестве узловых компонентов молекулярной организации интегративной деятельности мозга [4], и олигопептидами, индуцирующими и/или модулирующими различные формы врожденного и приобретенного поведения [5—6]. Однако экспериментальной проверке данное положение практически не подвергалось, не проводился поиск синтезирующихся в нервной ткани олигопептидов, который основывался бы на их взаимодействии с теми или иными нейроспецифическими белками.

В данной работе исследовали «поведенческую» активность выделенных нами естественных олигопептидов, взаимодействующих с нейроспецифическими белками группы S-100.

Выделение и иммобилизация белков главной фракции S-100 на CNBr-сефарозе, а также получение суммарной олигопептидной фракции, экстрагировавшейся из мозга быка 0,5 М уксусной кислотой при 60°, и затем из нее фракций олигопептидов-катионов (P^+) и олигопептидов-анионов (P^-) (каждая из которых, по данным изотахофореза, состояла не менее чем из 3—4 компонентов) были описаны ранее [7].

Фракции P^+ и P^- , растворенные в 0,15 М NaCl, вводили в левый боковой желудочек мозга беспородных крыс-самцов массой 150—200 г под легким эфирным наркозом. Каждое животное получало по 100 мкг материала фракций P^+ либо P^- в объеме 20 мкл. Контрольным крысам вводили по 20 мкл 0,15 М раствора NaCl. Спустя 12 и 36 ч, а также через 14 суток после 1-кратной инъекции животных помещали последовательно в камеру I для тестирования ориентировочно-исследователь-

ской активности, а затем в камеру II, используемую для выработки условного рефлекса пассивного избегания темноты у крыс и тестирования его сохранения [8].

Камера I представляла собой параллелепипед (размеры $300 \times 200 \times 120$ мм), изготовленный из непрозрачного материала. «Потолок» камеры имел 20 (5×4) отверстий округлой формы диаметром 15 мм. В течение 4-минутного сеанса пребывания животных в камере I регистрировали: а) латентный период первого заглядывания в отверстие; б) общее число заглядываний в отверстия камеры. За 15 мин, что животные находились в камере II, регистрировали: а) латентный период первого перехода крысы из освещенного отсека в темный; б) скорость покидания темного отсека, то есть скорость избавления от действия тока; в) число заходов в темный отсек за сеанс; г) время, проводимое животными непосредственно у перехода из светлого отсека в темный, без попыток захода в последний (время заглядывания в «наказуемый» отсек). Каждая группа состояла из 10 животных. Статистическая обработка временных показателей проводилась по критерию Стьюдента, а числа заходов—по критерию Пирсона.

Поведение крыс всех групп в камере I было весьма сходным. Достоверных отличий в показателях поведенческой активности животных обнаружено не было, что указывает на отсутствие выраженных влияний олигопептидных лигандов S-100 на уровень ориентировочно-исследовательской активности животных.

Поведение животных в камере II отличалось у разных групп по следующим показателям: процент животных, совершавших переход из светлого отделения камеры в темное, характеризовался выраженной тенденцией к повышению по сравнению с контрольными крысами через 36 ч после введения Π^+ и особенно Π^- ($p < 0,1$). Тестирование через 14 дней после введения испытуемых пептидов выявило разнонаправленные по сравнению с контролем изменения этого показателя—животные группы Π^+ совершали меньше, а Π^- —больше переходов в темное отделение; отличия между животными, получавшими Π^+ и Π^- , достигали уровня значимости ($p < 0,01$). Общее время заглядывания животных в «наказуемый» темный отсек камеры не только различалось по своим значениям у разных групп, но и претерпевало различную динамику. Так, через 12 ч после введения пептидов, исходные значения этого параметра у крыс группы Π^+ , как и у контрольных животных, были низкими, резко возрастали (в 5—10 раз) через 36 ч и вновь снижались примерно до исходного уровня к 14 дню. У животных группы Π^- этот параметр был в 2—3 раза выше, чем у других групп в первый сеанс ($p < 0,05$), а затем прогрессивно снижался от сеанса к сеансу (рис. 1, 2).

Полученные данные свидетельствуют о том, что исследуемые имобилизованные белки группы S-100 биоспецифически взаимодействуют с рядом неидентифицированных олигопептидных лигандов, являющихся, вероятно, видонеспецифичными: последнее заключение основывается на данных о модуляции поведения крыс пептидами, выделявшимися из

ткани мозга быков; причем активность исследовавшихся факторов была выражена при использовании их в дозах, не превышающих десятков нг/животное. Следует отметить также продолжительность (не менее 2 недель) изменений в поведении крыс, получавших однократные инъекции олигопептидов-лигандов S-100. Учитывая, что сроки жизни (полураспада) олигопептидов *in vivo* не превышают минут-десятков минут [9], столь длительные поведенческие эффекты, по-видимому, подразумевают наличие стойких и медленнообратимых метаболических изменений в ЦНС, индуцируемых исследуемыми пептидами.

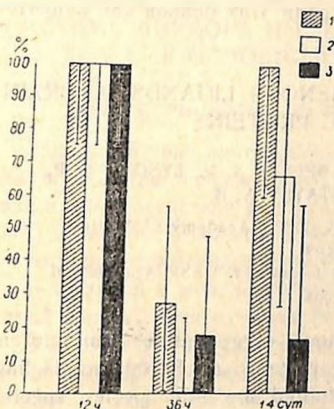


Рис. 1

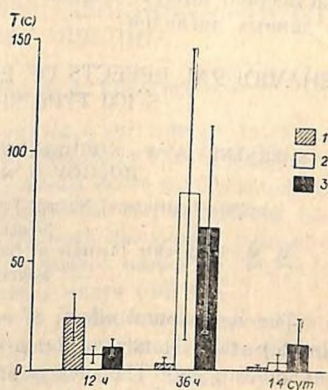


Рис. 2

Рис. 1. Процент животных, совершивших переход из освещенного отделения камеры в затемненное. 1—животные группы П-; 2—животные контрольной группы; 3—животные группы П+

Рис. 2. Общее время заглядывания животных в затемненное отделение камеры. Обозначения те же, что и на рис. 1

Интересно, что эти олигопептиды, не влияя заметно на двигательную и ориентировочно-исследовательскую активность животных (эксперименты в камере I), модифицировали эмоционально окрашенное поведение избегания, обусловленное получением ими отрицательных (болевых) стимулов в камере II.

Пока преждевременно делать какие-либо однозначные заключения о характере изменений поведения животных, индуцируемых олигопептидными лигандами нейроспецифических белков группы S-100. Но в качестве рабочего предположения можно допустить, что лиганды анионной природы (П-), вероятно, подавляют страх перед получением болевого раздражения и, возможно, нарушают процессы хранения и/или воспроизведения навыков. Пептиды-катионы (П+) оказывают, по-видимому, противоположные поведенческие эффекты, усиливая страх и/или восприимчивость к боли, и стимулируют процессы памяти.

Обращает на себя внимание различие в длительности эффектов P^+ и P^- . Последствия введения P^- отмечались на протяжении нескольких суток после введения, в то время как изменения в поведении, обусловленные действием P^+ , сохранялись, по крайней мере, в течение двух недель.

Полученные данные, на наш взгляд, являются свидетельством перспективности поиска и выделения новых «поведенчески» активных олигопептидов на основе их способности к биоспецифическому взаимодействию с теми или иными нейроспецифическими белками и, кроме того, представляют интерес в плане изучения роли этих белков как акцепторов данных лигандов.

BEHAVIOURAL EFFECTS OF ENDOGENOUS LIGANDS OF BRAIN S-100 TYPE SPECIFIC PROTEINS

SHERSTNEV V. V., KOCHETKOV N. V., BELYEV S. V., LYSOVA N. P.,
DOLGOV O. N., POLETAYEV A. B.

Anokhin Institute of Normal Physiology, USSR Academy of Medical
Sciences, Moscow

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, USSR Academy of
Sciences, Moscow

The behavioural effects of endogenous oligopeptides (anionic and cationic)—the ligands of brain-specific proteins of S-100 group—have been investigated. The oligopeptides studied are non species specific, exert biological activity in nanogram doses and affect first of all fear and alarm-related forms of behaviour. It's concluded that use of immobilized brain-specific proteins for affinity sorption and isolation of endogenous oligopeptides is an effective approach for detection and study of new biologically active oligopeptides.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Guillemin R. Science, 202, 4366, 380—402, 1978.
2. Шерстнев В. В., Полетаев А. Б., Долгов О. Н. Успехи физиол. наук, 10, 3, 66—86, 1979.
3. Neizil M. E., Cassaigne M. A., Lacoste A. M. Bul. Soc. Pharm. Bordeaux, 119, 3, 149—182, 1980.
4. Долгов О. Н., Полетаев А. Б., Шерстнев В. В. Успехи физиол. наук, 11, 3, 47—65, 1980.
5. Вартамян Г. А. Физиол. человека, 3, 5, 789—795, 1977.
6. Guttman H. N., Matwishesin G., Weller M.—in: Memory and transfer of information, ed. H. P. Zippel, N. V., Acad. Press, p. 111—117, 1973.
7. Полетаев А. Б., Беляев С. В., Лысова Н. П. Биохимия, 47, 8, 1349—1353, 1982.
8. Van Wiersma G., Tjeerd B., De Wied D. Behav. Biol., 18, 3, 325—333, 1976.
9. Witter A. Biochem. Pharmacol, 24, 22, 2025—2030, 1975.

Институт нормальной физиологии
им. П. К. Анохина, Москва
Институт биорганической химии
им. М. М. Шемякина, Москва

Поступила 18. V 1982

АКТИВНОСТЬ ПРОТЕОЛИЗА В МОЗГУ И КИНИНОВАЯ СИСТЕМА ЛИКВОРА И КРОВИ ПРИ ДЕЙСТВИИ АНТИТЕЛ К ОСНОВНОМУ БЕЛКУ МИЕЛИНА

МЕНДЖЕРИЦКИЙ А. М., ВОВЧЕНКО И. Б., КОЗЛОВА Л. С.

Взаимодействие противомозговых антител с антигенами мозга приводит к развитию повреждения НС [1, 2]. Механизм такого взаимодействия и его последствия для функционирования мозга изучены недостаточно. В модельных опытах действие противомозговых антител на мозг можно осуществить введением соответствующей иммунной сыворотки или ее фракций в желудочки мозга. Такой подход позволяет получить прямой контакт антител с антигенами мозга, минуя ГЭБ [3].

В работах [2, 4, 5] было показано, что интрацистернальное введение собакам противомозговых антител или антител к основному белку миелина (ОБМ) приводит к развитию демиелинизирующего процесса, сопровождающегося нарушением метаболизма мозга. Развитие демиелинизации определяет активация протеолиза, начинающая цепь метаболических нарушений [6]. Комплекс протеолитических ферментов включает ряд физиологически активных систем, в том числе калликреин-кининовую систему (ККС) ликвора и крови, одним из эффектов активации которой является увеличение проницаемости ГЭБ, что существенно для развития процесса аутоенсибилизации к антигенам мозга [7].

В работе изучено состояние ККС ликвора при действии на мозг антител к ОБМ в сопоставлении с изменением активности кислой протеназы в белом веществе головного мозга.

Опыты были поставлены на взрослых беспородных собаках обоего пола массой 10—12 кг. Животным после взятия ликвора из четвертого желудочка (2 мл) вводили 2 мл фракции иммуно-G-глобулина, содержавшего антитела к ОБМ. 1 мл фракции содержал 14 мг белка. Через 48 ч у большинства животных развивались симптомы, сходные с таковыми при экспериментальном аллергическом энцефаломиелите: нистагм, атаксия, паразезы и т. д. У собак с подобными неврологическими симптомами из четвертого желудочка брали ликвор, из бедренной вены—кровь для определения активности компонентов ККС [8]. Белое вещество головного мозга фракционировали на растворимую и обогащенную лизосомами фракции для определения в них активности кислой протеназы (К Ф.3.4.23), используя в качестве субстрата гемоглобин [9].

Контролем служил мозг практически здоровых животных. Для определения контрольного уровня активности компонентов ККС использовали ликвор и кровь животных до введения им антител. Материал обработан статистически с использованием критерия Стьюдента [10].

Таблица 1

Активность компонентов калликреин-кининовой системы в ликворе собак через 48 ч после внутрикостерального введения антител к ОБМ (в мед/мл ликвора)

Показатели	Г р у п п ы ж и в о т н ы х		
	интактные животные	введение иммуноглобулина G из сыворотки интактных собак	введение иммуноглобулина G, содержащего антитела к ОБМ
Калликреин	$1,21 \pm 0,77$ (6)	$11,81 \pm 2,01$ (6) $p < 0,001$	$29,13 \pm 2,30$ (6) $p < 0,001$ $p < 0,001$
Прекалликреин	$30,32 \pm 3,34$ (6)	$27,30 \pm 2,35$ (6) $p < 0,05$	$101,31 \pm 5,27$ (6) $p < 0,001$ $p < 0,001$
Общая эстеразная активность	$62,50 \pm 9,01$ (6)	$86,25 \pm 16,90$ (6) $p < 0,01$	$86,67 \pm 10,34$ (6) $p < 0,01$ $p < 0,05$

Примечание. В табл. 1, 2 в скобках указано число опытов

В ликворе интактных собак активность калликреина практически отсутствовала—1,29 мед/мл, а содержание предшественника—прекалликреина—составляло 30,32 мед/мл (табл. 1). Следовательно, ликвор содержит проферментную систему, способную при ее активации продуцировать брадикинин. В ликворе подопытных собак через 48 ч после интракостерального введения антител к ОБМ активность калликреина возрастала до 29,13 мед/мл, а содержание прекалликреина—в 3,4 раза. Таким образом, прямое введение антител к ОБМ, приводившее к образованию иммунных комплексов, резко активировало ККС ликвора, что подтверждалось определением в нем общей эстеразной активности. Этот показатель даст информацию о состоянии суммы триптических протеаз, в том числе и калликрина. Общая эстеразная активность увеличивалась у подопытных собак в ликворе на 41,4%. Сопоставление степени активации калликреина и общей эстеразной активности в ликворе свидетельствовало о том, что антитела к ОБМ активировали, главным образом, ККС, не влияя на активность других триптических протеаз.

Одновременно была показана активация ККС и в периферической крови. Если у интактных собак активность калликреина в сыворотке крови составляла 10,31 мед/мл, содержание прекалликреина—126,79 мед/мл, то в сыворотке крови подопытных животных активность калликреина возрастала в 4,4 раза и на 70,4% увеличивалось содержание прекалликреина.

Из табл. 2 видно, что в мозгу интактных собак отношения активности кислых пептидгидролаз во фракции, обогащенной лизосомами,

были в 2,7 раза выше, чем в растворимой, что соответствует литературным данным [11].

Через 48 ч после внутрикостерального введения фракции иммуноглобулинов G, содержавшей антитела к ОБМ, в белом веществе мозга собак с неврологической симптоматикой происходило резкое возрастание общей активности кислых протенназ (150,9 мкг тирозина/мг белка вместо 49,9 мкг тирозина/мг белка в мозгу интактных собак). Истинный прирост протеолиза в белом веществе головного мозга при

Таблица 2

Активность кислой протениназы в белом веществе головного мозга собак после внутрикостерального введения антител к ОБМ (в мкг тирозина/мг белка/ч)

Фракции	Г р у п п ы ж и в о т н ы х		
	интактные животные	введение иммуноглобулина G из сыворотки интактных собак	введение иммуноглобулина G, содержащего антитела к ОБМ
Лизосомная	$36,0 \pm 3,7$ (7)	$33,8 \pm 3,0$ (8) $p < 0,05$	$62,0 \pm 7,2$ (6) $p < 0,01$
Растворимая	$13,4 \pm 2,1$ (7)	$37,7 \pm 3,8$ (6) $p < 0,01$	$88,9 \pm 5,8$ (6) $p < 0,001$
Сумма	$49,4 \pm 3,9$	$76,5 \pm 6,3$ $p < 0,01$	$151,9 \pm 7,8$ $p < 0,001$

введении иммуно-G-глобулинов проявлялся в увеличении активности кислой протениназы в растворимой фракции, которая была в 6,6 раза выше, чем в этой же фракции у интактных собак. Во фракции, обогащенной лизосомами, активность фермента возрастала на 72%, и соотношение ее к активности в растворимой фракции составляло 1,45:1. В белом веществе головного мозга интактных собак это соотношение было равно 2,7:1. Его снижение по сравнению с контролем отражало повышение активности фермента во фракции лизосом за счет увеличения их количества в клетках мозга. Подобное утверждение может также основываться на проведенных ранее электронномикроскопических исследованиях ткани мозга после внутрикостерального введения иммуно-G-глобулина, содержавшего антитела к ОБМ [12].

Прямое действие антител к ОБМ, вводимых в мозг, минуя ГЭБ, влечет за собой резкое возрастание протеолитической активности в белом веществе, прилежащем к ликворным путям. Этот эффект связан с образованием иммунных комплексов, обладающих цитотоксическим действием, проявляющимся в активации протеолиза и развивающимся в дальнейшем процессе демиелинизации. Следовательно, иммунные комплексы, образующиеся при введении антител к ОБМ, активируют протеолиз в мозгу и одновременно ККС ликвора и крови, что создает условия для развития аутоиммунной демиелинизации к антигенам мозга и дальнейших структурно-метаболических сдвигов, ведущих к демиелинизации.

EFFECT OF ANTIBODIES TO MYELIN BASIC PROTEIN ON THE PROTEOLYTIC ACTIVITY IN BRAIN AND KALLIKREIN-KININE SYSTEM IN LIQUOR AND SERUM

MENDZHERITSKY A. M., VOVCHENKO I. B., KOZLOVA L. S.

Medical School, Rostov-on-Don

The intracisternal administration of antibodies to myelin basic protein leads to the formation of immune complexes activating intracellular proteolysis in the brain and kallikrein-kinine system in liquor and serum, thus evidently initiating the processes of autosensibilization and demyelination.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Штарк М. Б. Иммунонейрофизиология, Л., Медицина, с. 175, 1978.
2. Менджерицкий А. М., Вовченко И. В., Вилков Г. А., Трапезонцева Р. А. Биохимия животных и человека, Киев, Наукова думка, вып. 4, с. 40—47, 1980.
3. Янкович Б. Д., Ракич Л. Вестн. АМН СССР, 4, 44—51, 1969.
4. Менджерицкий А. М., Вовченко И. Б. Укр. биохим. ж., 50, 5, 586—588, 1978.
5. Киров Р. И., Менджерицкий А. М., Вилков Г. А. Вопросы мед. химии, 28, 2, 49—52, 1982.
6. Einstein E. R., Datal K. B., Csifley I. J. Neurol. Sci., 11, 2, 109—114, 1973.
7. Милютин Л. В., Вилков Г. А., Трапезонцева Р. А. Вопросы мед. химии, 21, 3, 254—258, 1975.
8. Пасхина Т. С., Кринская А. В.—В кн.: Современные методы в биохимии (под ред. В. Н. Ореховича), М., Медицина, с. 157—163, 1977.
9. Лизосомы. Методы исследования (под ред. Дж. Дингла), М., Мир, 1980.
10. Бейли Н. Статистические методы в биологии, М., Мир, 1962.
11. Покровский А. А., Тутельян В. А. Лизосомы, М., Медицина, 1979.
12. Вилков Г. А., Бардахчан Э. А., Вовченко И. Б., Менджерицкий А. М. Ж. невропат. и психиатр. 82, 12, 1781—1784, 1982.

Ростовский медицинский,
институт, ЦНИЛ

Поступила 16. VII 1982

ОБЗОРЫ

УДК 612.82.821.2

ПЕПТИДЫ, ОБУЧЕНИЕ, ПАМЯТЬ
(принцип полифункциональности)

АШМАРИН И. П., КРУГЛИКОВ Р. И.

Анализ литературных данных о биологических эффектах нейропептидов приводит к заключению о том, что одна и та же функция регулируется несколькими пептидами, а один и тот же пептид может участвовать в регуляции нескольких функций. Этот принцип полифункциональности находит свое выражение и в процессах обучения и памяти: формирование, фиксация и воспроизведение временных связей регулируются различными пептидами, один и тот же пептид участвует в регуляции каждой из названных операций.

С быстротой, поразительной даже на фоне общего стремительного развития биохимии, множатся данные о роли регуляторных пептидов в организации всей жизнедеятельности организма [1, 2]. Важное место принадлежит малым и средним пептидам и в деятельности ЦНС. Многочисленные фактические данные приводят к заключению о полифункциональности нейропептидов (НП). Каждый НП участвует в регуляции нескольких функций, а одна и та же функция регулируется несколькими НП. Процессы обучения и памяти в этом отношении не являются исключением—один и тот же НП может участвовать в регуляции различных функциональных и нейрохимических компонентов этих процессов и в различных операциях обучения и памяти—формировании временных связей (следов памяти, энграмм), их фиксации (консолидации) и воспроизведении. Цель настоящего обзора заключается в обосновании этих положений.

Нейрофизиологам и нейрохимикам хорошо известна опасность, которая возникает при попытках оценить, прямое или косвенное влияние оказывает исследуемый фактор на ту или иную функцию мозга. В отношении НП положение особенно осложняется тем, что круг реакций как центральных, так и периферических, связываемых сейчас с НП, очень широк. Из схемы, приведенной на рис. 1, можно составить общее представление об этих связях. НП непосредственно участвуют в формировании ряда ощущений: пищевого насыщения, жажды, сексуальных импульсов и др. Весьма сложное по механизму ощущение удовольствия также формируется с участием НП. Многообразные НП участвуют в восприятии боли и, следовательно, в связанных с болью реакциях по-

ведения. Двигательная активность, сон, зимняя спячка находятся под интенсивным влиянием НП. В представленном перечне есть и пептиды, которые, как считают, прямо участвуют в механизмах памяти—адреноректорикотропный (АКТГ) и меланостимулирующий гормоны (МСГ) и вазопрессин. Очевидно, однако, что выраженным влиянием на память не могут не обладать и многие другие из представленных НП,—слишком тесными являются связи между всеми перечисленными нейробиологическими функциями. Каждая из представленных функций связана с определенным набором из 1—3-х, а иногда и большего числа (десятков) НП. В большинстве случаев (если не во всех) один и те же НП регулируют несколько разных реакций. Рассматривая далее отдельные НП, следует постоянно иметь в виду еще одну важную их особенность: каждый из них, помимо нейробиологических реакций, является одновременно прямым регулятором ряда вегетативных и соматических функций. Это не какое-то побочное действие НП, а обязательный комплекс контролируемых данным НП процессов, в числе которых та или иная реакция, связанная с поведением, выступает не как доминирующая, а как одна из нескольких равноправных функций.

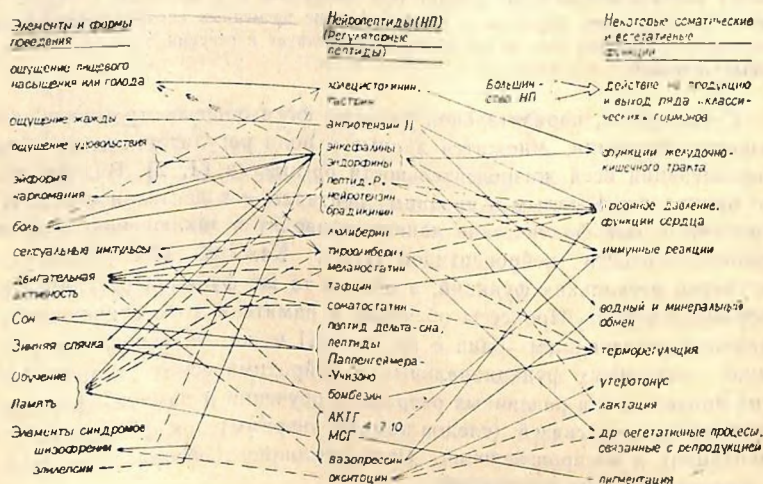


Рис. 1. Некоторые направления действия нейропептидов.

Рассмотрим примеры таких полифункциональных НП, постоянно обращаясь к возможному или установленному влиянию их на обучение и память. Начнем с тех, которые связывают пока с относительно простыми реакциями. При этом необходимо помнить о крайней условности разграничения реакций поведения на простые и сложные, а также о том, что каждый день приносит все новые и новые сведения о функциях каждого НП и об их участии в построении поведения.

Ощущение насыщения, сытости связано, в первую очередь, с холецистокинином (ХЦК) [3]. Этот пептид был ранее обнаружен в желу-

дочно-кишечном тракте в качестве регулятора сокращений желчного пузыря. Сейчас в мозгу, в том числе в высшей его формации—в коре, обнаружены и рецепторы ХЦК и многочисленные нейроны, его образующие. Правда, мозговой ХЦК проще периферического: последний состоит из 33-х аминокислотных остатков, а в мозгу преобладает его С-концевой фрагмент из 8-ми аминокислот (рис. 2). Введение ХЦК в желудочки мозга голодной козы в фантастически малой дозе—0,01 пмк (10^{-14} м или $5 \cdot 10^{-6}$ мкг)—полностью лишает ее аппетита. Вряд ли, однако, это единственная функция ХЦК. Содержащих его нейронов довольно много в коре, и их локализация наводит на мысль о том, что они участвуют в связях коры и подкорковых образований. Сам ХЦК занимает одно из первых мест среди других НП по количеству в мозгу. Наконец, обращает на себя внимание наличие ХЦК в окончатых нейронах ствола мозга, проецирующихся в лимбическую систему, что побуждает ставить вопрос об участии ХЦК в механизмах памяти. Однако, если даже прямое участие не будет выявлено, то косвенное влияние на память неизбежно, хотя бы в той мере, в какой связана с памятью пищевая мотивация.

Много сходного есть в ситуации с двумя другими пептидами, также открытыми ранее в качестве регуляторов желудочно-кишечного тракта,—вазоинтестинального пептида (ВИП) и гастрина (С-концевой тетрапептид последнего, идентичный ХЦК) (рис. 2). Они, их рецепторы и продуцирующие их нейроны, найдены в мозгу, но роль этих пептидов в реакциях поведения пока не установлена столь четко, как в случае ХЦК.

Другой периферический НП—ангиотензин II (рис. 2) является важным регулятором состояния сосудов, особенно почечных. К настоящему времени показано возникновение реакции жажды после внутрижелудочкового введения ангиотензина II в дозах 10^{-12} М (10^{-3} мкг). Регуляция выведения воды в почках и других тканях гармонически увязывается в данном случае с индукцией жажды одним и тем же регулятором [4].

Косвенное влияние ангиотензина II на процессы памяти возможно, опять-таки, в силу его участия в механизмах мотиваций. Заслуживает внимания и другой путь: уровень ангиотензина II тесно связан с уровнем вазопрессина—другого регулятора минерального и водного обмена. В свою очередь вазопрессин, как показано ниже, относится к НП, непосредственно связанным с памятью.

ХЦК, ВИП, гастрин и ангиотензин II—примеры НП, образующихся и на периферии, и в мозгу. В отличие от них НП, стимулирующий сексуальное поведение, так называемый рилизинг-гормон лютеотропина (люлиберин) синтезируется, по-видимому, лишь в мозгу, преимущественно в гипоталамусе (рис. 2). Очень интересно сопоставить две его функции [5, 6]. Первая, известная относительно давно, состоит в регуляции выделения гормона лютеотропина гипофизом; в свою очередь, лютеотропин регулирует образование гормона желтого тела. При этом

люлиберин является высшим звеном многоэтажной системы регуляции важных неповеденческих факторов репродукции животных. Одновременно он же выполняет вторую функцию—прямо стимулирует сексуальное поведение. Люлиберин является одним из НП, близких к широкому практическому использованию в ветеринарии и медицине. Синтезировано большое число его аналогов либо «сверхактивных», либо обладающих обратным действием [6]. Широту связей сексуальных мотиваций с механизмами памяти следует учитывать в исследованиях действия люлиберина на поведение.

Обратимся теперь к обширному семейству пептидов—регуляторов восприятия боли.

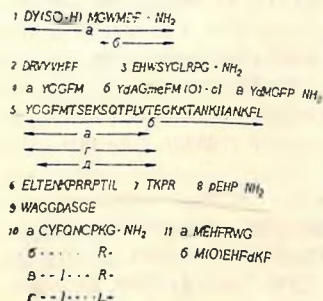


Рис. 2. Структура некоторых регуляторных пептидов и их аналогов. 1, a—холецистокинин-8, 1, б—концевой тетрапептид, общий для холецистокинина и гастрина; 2—ангиотензин II; 3—люлиберин; 4, a—Met-энкефалин, 4, б и 4, a—его высокоактивные аналоги; 5, a—α-эндорфин, 5, б—β-эндорфин, 5, в—γ-эндорфин, 5, д—des Tug-γ-эндорфин (человека); 6—нейротензин; 7—тафин; 8—тиреоплиберин, 9—пептид-δ-сна, 10, a—Lys-вазопрессин, 10, б—Arg-вазопрессин, 10, в—Arg-вазотонин, 10, г—окситонин; 11, a—АКТГ₄₋₁₀, 11, б—высокоактивный аналог Org 27-66

Наиболее изученными пептидами, способными подавлять болевые ощущения, являются опиоидные. В течение последних трех лет резко увеличился их перечень [2]. Известен уже целый ряд неодинаковых по структуре и месту синтеза крупных опиоидных пептидов—эндорфинов, содержащих в качестве основной функциональной группы пентапептид—Met-энкефалин (рис. 2). Открыто также множество новых эндорфинов, содержащих не Met-энкефалиновый, а Leu-энкефалиновый фрагмент. Эти пептиды более стабильны, чем простейшие опиоидные пептиды, то есть сами Met- и Leu-энкефалины, и обладают поэтому дистантным действием. Особенно важно, что в них закодирован одновременно ряд активностей, далеко выходящих за рамки противоболевых. По-видимому, каждый из эндорфинов, образующихся и выделяющихся при тех или иных воздействиях, включает строго определенный комплекс разнообразных функций. Перечислим хотя бы часть таких функций, сопряженных с различными эндорфинами: 1) снятие боли, 2) ощущение удовольствия, переходящее в эйфорическое состояние, 3) снижение подвижности, переходящее при определенных дозах в кататонию, 4) нейролептическое действие, 5) воздействие на некоторые формы памяти и регуляцию целенаправленного поведения. Функции 1—3 и 5 сопряжены с энкефалиновым компонентом эндорфинов, хотя выраженность их может количественно изменяться в зависимости от наличия и структуры других участков. Функция 4 обусловлена последовательностью 5—17 β-эндорфина.

Рассмотрим теперь несколько подробнее активности отдельных опиоидных пептидов. Неоднократно описано обезболивающее действие природных энкефалинов и эндорфинов. Заметим только, что анальгезия, вызываемая некоторыми недавно открытыми эндорфинами, содержащими Leu-энкефалиновую последовательность,—динорфином, например, и синтетическими аналогами энкефалинов, в сотни—тысячи раз превышает таковую для ранее изученных природных опиоидов. Многие из них высокоэффективны не только при внутримозговом, но и при подкожном, внутривенном, внутривенном и других типах периферического введения.

В опытах по самостимуляции крыс самовведением в мозг энкефалинов [4] достоверно установлено быстрое развитие стремления инъектировать себе Leu- и, в меньшей мере, Met-энкефалин (в отличие от их тетрапептидного аналога или плацебо). Не менее важно, что в другом варианте экспериментов—с самораздражением через вживление в мозг электродов в специализированные «зоны удовольствия»—эффект полностью снимался классическим антагонистом опиатов—налоксоном. Это указывает наряду с многими другими ранее полученными данными на участие эндогенных опиоидов в формировании ощущений удовольствия и в феномене привыкания к наркотикам. Здесь вновь просматриваются вероятные связи с процессами запоминания на фоне мощных мотиваций.

Много усилий было предпринято для выявления прямого участия опиоидных пептидов в механизмах памяти. Наиболее яркой иллюстрацией сложности ситуации является открытие противоположного действия на память γ -эндорфина и Des-Tyr- γ -эндорфина, с одной стороны, и α -эндорфина и некоторых других эндорфинов, с другой стороны. Первые ускоряют угасание условного рефлекса пассивного, а по некоторым данным, и активного избегания (с этим, кстати, сопряжено и нейролептическое действие этих соединений). Вторые оказывают обратное действие, по крайней мере, в части тестов. При этом трактовка результатов крайне осложняется подавляющим действием опиоидных пептидов на двигательную активность, на восприятие болевых импульсов и на пищевую мотивацию (последнее не относится лишь к Des-Tyr- γ -эндорфину). Что касается простейших опиоидных пептидов—энкефалинов, то данные об их влиянии на процессы памяти еще более противоречивы. С особой остротой выступает применительно к опиоидным пептидам вопрос об адекватности методических подходов, используемых при оценке их действия на память. Поэтому мы вновь вернемся к обсуждению их эффектов в заключительной части настоящего обзора.

В числе пептидов, подавляющих боль, недавно стали упоминать нейротензин [3]. Этот олигопептид проявляет анальгетическое действие, по крайней мере, при центральном введении, а его топография почти полностью повторяет топографию энкефалинов. Особенно интересно, что его эффект не снимается классическим антагонистом опиатов—налоксоном, и, следовательно, он имеет механизм действия, существенно отличный от опиатов.

Еще один олигонептид, так называемое вещество Р, давно рассматривается как участник процессов передачи болевых импульсов. В ряде случаев он выступает как антагонист энкефалинов и эндорфинов, например, в упоминавшихся экспериментах по самовведению экспериментальным животным энкефалинов [4].

Выше отмечалось уже подавляющее действие опиоидных пептидов на двигательную активность. Уместно в этой связи указать на ряд пептидных регуляторов, обладающих обратным действием, то есть стимулирующих подвижность, и сопоставить этот их эффект с влиянием на память. Они интересны также тем, что связаны с агрессивным поведением экспериментальных животных. Один из них—тафцин [7, 8]—имеет исключительно периферическое происхождение и был впервые открыт и изучен как фактор неспецифического иммунитета. Сейчас установлено, что он является стимулятором двигательной активности в физиологических концентрациях в течение первых 7—15 мин после введения и, кроме того, повышает агрессивность экспериментальных животных. Заметим, однако, что на обучение и память тафцин не действует. Это вновь иллюстрирует известное положение о том, что многие общие стимулирующие воздействия не влияют на процессы запоминания.

Наконец, в числе стимуляторов двигательной активности следует упомянуть рилизинг-гормон тиреотропина—тиреолиберин. В этом случае нет указаний на одновременную стимуляцию агрессивности. Интересно, что подобно люлиберину, рассматривавшемуся выше, этот пептид проявляет свое действие на поведение непосредственно, в то время как другую свою функцию—регулятора активности щитовидной железы—осуществляет опосредованно, действуя на выделение тиреотропина из гипофиза. Тиреолиберин известен также как одно из средств лечения паркинсонизма и общий стимулятор «хорошего настроения» у людей [4]. Имеются данные о некотором стимулирующем действии тиреолиберина на обучение, вероятно, косвенном.

Весьма важным было бы подробное рассмотрение здесь пептидов—регуляторов сна—и как таковых, и как возможных участников процесса консолидации. Однако это область, где пока преобладают противоречивые данные. Так, в отношении ряда описанных в литературе пептидов, полученных из мозга или СМЖ, лишенных сна животных и обладающих как будто бы мощным снотворным действием в малых дозах [2], нет пока широко апробированных сведений о первичной структуре. Лишь недавно получены указания на близость их структуры к мюрамил-пептидам—характерным компонентам оболочек бактерий. Что же касается двух широко изучавшихся вероятных регуляторов сна с установленной структурой—так называемого пептида дельта-сна и вазотомина (рис. 1), то первый, по-видимому, служит фактором, не индуцирующим непосредственно сон, а лишь «предрасполагающим ко сну», а второй—фактором не сна, а снижения двигательной активности [9]. Не исключено, что столь сложный процесс, как сон, требует одновременного участия ряда регуляторов, а в том числе ряда НП.

Интересны первые данные о комплексной регуляции пептидами земной сначки. Полагают, что в этом процессе участвуют бомбезин—пептид, известный, главным образом, способностью снижать температуру тела, опионидные пептиды и упоминавшиеся выше пептиды, непосредственно участвующие в регуляции сна [10].

В наибольшей же мере с механизмами обучения и памяти связаны такие НП, как АКТГ, МСГ, в особенности их фрагмент Met-Glu-His-Phe, а также вазопрессины. Их эффекты мы рассмотрим поэтому более подробно, обратив сначала внимание на методические аспекты изучения их действия.

Одним из наиболее широко используемых доказательств участия НП в процессах обучения и памяти является повышение устойчивости временной связи (энграммы) к угашению под влиянием различных НП. Использование этого теста исходит из предположения о том, что чем прочнее временная связь, тем труднее она поддается угашению. Считается, в частности, что устойчивость к угашению может служить мерой эффективности процесса консолидации. Однако такая оценка вряд ли может считаться достаточно правомерной. Известно, что скорость процесса угашения зависит не только от прочности временной связи, но и от силы внутреннего торможения. При определенных построениях экспериментов с использованием пептидов можно столкнуться с влиянием последних преимущественно на процесс внутреннего торможения, неправомерно приписав этот эффект состоянию временной связи. Известно, помимо этого, что целый ряд данных позволяет видеть в процессе угашения особую форму научения, идентичную по некоторым нейрохимическим и нейрофизиологическим характеристикам процессу выработки условного рефлекса. В таком случае нередко наблюдаемое под влиянием пептидов снижение устойчивости временной связи к угашению может рассматриваться как повышение эффективности процессов обучения и закрепления информации в мозгу. Это в особенности относится к таким экспериментам, в которых нейропептид вводится после первого сеанса угашения. Следует, наконец, учитывать и показанную многими исследователями способность пептидов облегчать воспроизведение временной связи. С этой точки зрения устойчивость временной связи к угашению отражает не прочность последней, а эффективность операции ее воспроизведения. Именно так следует, по-видимому, понимать ранние данные De Wied [11] о замедлении угашения оборонительного условного рефлекса в случае введения питерессина перед каждым сеансом угашения и последующие работы такого же плана [31]. Таким образом, устойчивость временной связи к угашению является интегральным выражением комплекса факторов, что весьма затрудняет или даже исключает возможность однозначной интерпретации результатов, полученных с помощью этого теста. Тем не менее, этот тест благодаря высокой чувствительности находит широкое применение при исследовании действия пептидов на процессы памяти, служа индикато-

ром эффекта и выражением одновременного влияния НП на множество процессов, лежащих в основе интегративной деятельности мозга.

Факты влияния АКТГ₄₋₇ (МСГ) и вазопрессинов на процессы обучения и памяти, наряду с данными об изменениях содержания в головном мозгу НП в ходе обучения [12, 13], прямо указывают на бесспорное их участие в интегративной деятельности мозга и стимулируют исследования, направленные на конкретизацию их роли и выяснение механизмов этого участия.

Накопленные к настоящему времени многочисленные фактические данные, обобщенные в ряде обстоятельных обзоров и монографий [19—33], могут быть резюмированы в виде следующих положений.

1. Упомянутые НП оказывают выраженное влияние на процессы обучения и памяти в дозах, намного меньше тех, которые вызывают другие биологические эффекты.

2. Влияние этих НП на процессы обучения и памяти не связано с их гормональными эффектами, что наиболее убедительно доказывается влиянием на указанные процессы фрагментов пептидных гормонов, совершенно лишенных гормональной активности.

3. Особенности влияния НП на процессы обучения и памяти зависят от рода и особенностей используемых условных рефлексов, пола, возраста и индивидуальных особенностей экспериментальных животных, дозы и способа введения НП.

Среди разнообразных доказательств этой роли особо отметим чрезвычайно интересные факты нарушений обучения и памяти при введении антител к вазопрессину и индукции образования антител к АКТГ₄₋₁₀ [14, 15], а также имевшие в свое время сенсационный характер сообщения об улучшении памяти у людей при введении некоторых НП, в частности вазопрессинов и аналогов АКТГ₄₋₇ [16—18].

Что касается различий в роли дериватов АКТГ и вазопрессинов, то обобщая современное состояние вопроса об участии НП в интегративной деятельности мозга, De Wied и Van Ree [33] указывают, что НП семейства АКТГ/МСГ влияют на мотивацию и внимание. Это находит свое выражение в изменениях собственно выработки и воспроизведения временных связей; НП семейства вазопрессинов, в отличие от этого, участвуют в консолидации временных связей. Исходные указания на разную роль разных НП в процессах обучения и памяти были получены в экспериментах на гипофизэктомизированных животных [11, 34—36].

В упомянутых работах было сообщено, что вызываемые гипофизэктомией нарушения обучения и памяти устраняются введением АКТГ и его фрагментов АКТГ₁₋₂₄, АКТГ₄₋₁₀, α - и β -МСГ, Lys-вазопрессинном (ЛВП) и Des-Gly-Lys-вазопрессинном (ДГ-ЛВП). Как выяснилось, α - и β -МСГ содержат общий с АКТГ фрагмент—АКТГ₄₋₁₀, чем объясняется общность оказываемых этими пептидами «лечебных» эффектов. Что касается эффектов ЛВП и ДГ-ЛВП, то их природа, по-видимому,

ная, чем у АКТГ и α - и β -МСГ. Важнее, однако, другое: восстанавливая процесс выработки условных рефлексов у гипопизэктомированных животных, ЛВП и АКТГ₄₋₁₀ обладают разным последствием. После отмены АКТГ₄₋₁₀, вводившегося перед каждым опытным сеансом при выработке условного рефлекса, количество проявляющихся в опыте условных реакций резко снижалось, то есть последствие было довольно кратковременным. В отличие от этого после отмены ЛВП число проявляющихся в опыте условных реакций оставалось столь же высоким, как и на фоне его введения. Это давало основание полагать, что АКТГ и родственные пептиды влияют преимущественно на выработку условного рефлекса и, следовательно, на факторы, участвующие в этом процессе, а также на воспроизведение выработанных рефлексов, в то время как ЛВП оказывает влияние на фиксацию (консолидацию) временной связи. Дополнительные аргументы в пользу этого представления были получены при изучении особенностей обучения и памяти у крыс с врожденной неспособностью к синтезу ЛВП, страдающих сахарным диабетом (линия Brattleboro). Среди разнообразных нарушений условнорефлекторной деятельности у этих животных наиболее характерной является неспособность к фиксации временных связей. По данным ряда авторов [37], например, условный рефлекс пассивного избегания (УРПИ) у таких животных еще полностью сохранен сразу после выработки, но уже через 3 ч у них возникает глубокая и стабильная амнезия. Это можно истолковать таким образом, что дефицит ЛВП в мозгу не препятствует выработке и кратковременному сохранению УРПИ, но полностью предотвращает его закрепление в долговременной памяти, то есть глубоко нарушает процесс консолидации.

Другим дополнительным обоснованием предположения о разной роли различных НП в процессах обучения и памяти могут служить данные об улучшении воспроизведения выработанных рефлексов под влиянием аналога АКТГ₄₋₉ —препарата Org-2766. Выработка сложного двигательного-пищевого условного рефлекса у старых (110 недель) крыс протекает практически с такой же скоростью, как у молодых (9 недель) животных, однако при проверке сохранения у старых животных количество ошибочных реакций было значительно больше, чем у молодых [24]. В случае же введения Org-2766 перед проверкой сохранения по числу ошибочных реакций старые животные не отличались от молодых. Интересно, что число ошибочных реакций под влиянием Org-2766 достоверно снижалось у молодых животных и достоверно—у старых. В многочисленных исследованиях на интактных животных было показано, что НП семейства АКТГ/МСГ ускоряют выработку оборонительных и двигательного-пищевых УР и замедляют их угашение, если обе эти операции проводятся на фоне введения НП [38—40]. Детальный анализ этих эффектов показал, что они в значительной степени связаны с изменениями мотиваций, направленности внимания, уровня arousal и ряда других физиологических механизмов. Так, в экспериментах на свободно передвигающихся животных было обнаружено, что введение

АКТГ₄₋₁₀ вызывает тахикардию в ситуациях, обычно сопровождающихся брадикардией [41, 42]. Значение этого факта определяется тем, что брадикардия является одним из выражений пассивно-оборонительного состояния, препятствующего выработке активного избегания [43]. Выработка активного избегания связана с переходом от брадикардии к тахикардии, свидетельствующей о развитии активно-оборонительного состояния. Понятно, что вызываемая АКТГ тахикардия должна способствовать выработке активного избегания, что и наблюдается в большинстве случаев.

Другим важным механизмом эффектов АКТГ₄₋₁₀ является вызываемое этим НП учащение тета-ритма гиппокампа и таламических структур при электрической стимуляции ретикулярной формации (РФ) [44]. Оценивая эти данные, Bohus [31] подчеркивает, что поскольку аналогичные изменения частоты тета-ритма наблюдаются при усилении стимуляции РФ, указанный факт свидетельствует о повышении уровня бодрствования, что, как известно, способствует формированию временных связей. Возможно, повышение уровня бодрствования при введении АКТГ, его фрагментов и аналогов во многих случаях лежит в основе ускорения обучения.

Преимущественное влияние АКТГ и родственных пептидов на процессы выработки и воспроизведения условных рефлексов не означает, что эти пептиды не оказывают влияния на процесс консолидации. Известен целый ряд работ, в которых АКТГ или его фрагменты вводились после сеанса обучения, что сказывалось на сохранении рефлексов [38, 45, 46]. Весьма показательна в этом отношении работа Gold и соавт. [45]. Вводя мышам сразу после выработки своеобразной формы УРПИ 0,03—0,3 МЕ АКТГ, авторы через сутки наблюдали улучшение сохранения этого рефлекса; увеличение дозы АКТГ до 3 МЕ, напротив, значительно ухудшало сохранение УРПИ. Одна из принципиальных находок авторов в этой работе состоит в установлении зависимости эффекта гормона от силы обучения. Помимо этого, авторы показали, что увеличение дозы АКТГ может приводить к инверсии эффекта.

Близкие данные получили Flood и соавт. [46], в опытах которых увеличение дозы АКТГ₄₋₁₀ от 0,1 до 3,0 мг/кг, вводившегося мышам сразу после выработки активного или пассивного избегания, вызвало не увеличение, а снижение эффекта, то есть снижение степени улучшения сохранения выработанных рефлексов. Эти наблюдения, нашедшие многократные подтверждения в последующих исследованиях, могут рассматриваться как одна из важных закономерностей действия пептидов на процессы обучения и памяти—зависимость эффектов от дозы и особенностей вырабатываемых рефлексов, в частности от «силы обучения».

Следует подчеркнуть, что в более поздних работах некоторым исследователям не удалось получить четких изменений сохранения выработанных рефлексов и их устойчивости к угашению при введении АКТГ, его фрагментов, аналогов и родственных пептидов после обуче-

ния [24]. Улучшение сохранения УРПИ наблюдалось лишь в случае введения большой дозы—5 мг/кг Ovg—2766 перед обучением [47], что, очевидно, явилось простым следствием улучшения процесса выработки временной связи—закономерность, хорошо известная в физиологии памяти [48, 49]. И все же, констатируя несомненное действие на процессы обучения, нет оснований исключать и возможность влияния пептидов семейства АКТГ/МСГ на процесс консолидации. Не говоря уже о том, что ряду исследователей удавалось наблюдать такого рода эффекты, вызываемые этими НП, изменения функционального состояния мозга при определенных условиях не могут не сказаться на процессе консолидации. Достаточно в связи с этим упомянуть данные Bloch [50, 51], согласно которым электрическая стимуляция ретикулярной формации среднего мозга ускоряет процесс консолидации и делает его более эффективным. Влияние НП семейства АКТГ/МСГ на воспроизведение ранее сформированной временной связи ярче всего выступает в экспериментах, в которых введение НП перед проверкой сохранения временных связей, подвергнутых амнезирующим воздействиям, устраняет амнезию [52—54]. Весьма вероятно, что вызываемое АКТГ повышение устойчивости временных связей к угашению (см. ниже) обусловлено облегчением их воспроизведения. Таким образом, есть все основания полагать, что НП семейства АКТГ/МСГ оказывают влияние на формирование, фиксацию и воспроизведение энграмм, то есть действительно являются полифункциональными. Столь же полифункциональными являются эндогенные опиоиды и вазопрессины. Введение большинства эндогенных опиоидов перед выработкой условных рефлексов активного избегания нарушает их выработку, а при введении сразу после обучения ухудшает их сохранение [55—59]. Напротив, блокада опиоидных рецепторов налоксоном улучшает сохранение временных связей. На основании такого рода фактов даже сформулировано представление о наличии в мозгу физиологического амнезирующего механизма, представленного системой эндогенных опиоидов [59].

Однако описан целый ряд фактов, не укладывающихся в это представление. Так, под влиянием введения Met-энкефалина сразу после выработки УРПИ улучшается его сохранение [60]. Такой же эффект наблюдается при введении α -эндорфина [61]. При этом введение α -эндорфина за 1 ч до проверки сохранения УРПИ улучшает его воспроизведение [61], а введение энкефалинов устраняет амнезию [62], что также может быть связано с улучшением воспроизведения энграммы. Помимо этого, показаны различия в эффектах энкефалинов у хорошо и плохо обучающихся животных и зависимость этих эффектов от состояния моноаминергических систем мозга [63, 64]. описано также повышение устойчивости к угашению ранее выработанных оборонительных временных связей под влиянием Met-энкефалина и α -эндорфина [65—67]. Из приведенных данных следует, что эндогенные опиоиды оказывают влияние на формирование, фиксацию (консолидацию) и воспроизведение временных связей, то есть в сфере их влияния находятся все операции функции памяти.

Что же касается НП семейства вазопрессинов, то устоявшаяся точка зрения, согласно которой они избирательно влияют на процесс консолидации [33], требует определенных уточнений. Дело в том, что имеются прямые доказательства влияния вазопрессинов на выработку условных рефлексов [31, 68] и их воспроизведение после амнезирующих воздействий [69]. Столь характерное для вазопрессинов повышение устойчивости временных связей к угашению является ярким выражением их влияния на различные операции интегративной деятельности мозга, что вновь доказывает полифункциональность и этого семейства НП. Важным и, по-видимому, эффективным способом участия НП в регуляции интегративной деятельности мозга является возможность прямо противоположных воздействий на одну и ту же форму деятельности разных НП одного семейства. Так, α -эндорфин улучшает, а γ -эндорфин ухудшает сохранение временных связей. Вазопрессин резко повышает устойчивость временных связей к угашению и улучшает консолидацию временных связей, окситоцин в этом отношении оказывает прямо противоположное действие. При оценке регулирующей роли НП в процессах обучения и памяти следует также учитывать зависимость вызываемых НП эффектов от индивидуальных особенностей животных, уровня испытываемых ими мотиваций, рода и особенностей используемых условных рефлексов и ряда других факторов. Накапливаются данные о «нормализующем» действии НП, степень которого пропорциональна степени отклонения той или иной функции от оптимального уровня. В исследованиях на людях, например, показано, что у лиц с относительно низкими показателями памяти влияние вазопрессина и аналогов АКТГ₄₋₇ на эту функцию носит более выраженный характер [24, 72].

По данным Кругликова [63], Met-энкефалин улучшает выработку и сохранение условных рефлексов у плохо обучающихся животных и ухудшает эти процессы у хорошо обучающихся животных. Эти исследования расширяют представление о полифункциональности НП, характеризуя еще один важный аспект их биологического действия.

Яркой иллюстрацией полифункциональности лизинвазопрессина могут служить данные [70], согласно которым под влиянием этого пептида улучшается смысловая, но не механическая память и повышается эффективность условнорефлекторной (с использованием апоморфина) терапии хронического алкоголизма. Эти наблюдения представляют исключительный интерес, так как свидетельствуют о возможности использования вазопрессинов (и, вероятно, других НП) для повышения эффективности определенных форм терапии.

Процессы обучения и памяти, таким образом, находятся под контролем разных семейств НП. В связи с этим первоочередной задачей следует, по-видимому, считать изучение взаимодействия НП в процессах обучения и памяти. Можно ожидать, что на этом пути будут вскрыты многие важные механизмы участия НП в интегративной деятельности мозга и подлинная роль их полифункциональности.

PEPTIDES, LEARNING, MEMORY

(polyfunctional principle)

ASHMARIN I. P., KRUGLIKOV R. I.

M. V. Lomonosov State University, Moscow Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, USSR Academy of Sciences, Moscow

The data concerning the versatile biological effects of neuropeptides are considered. According to them one neuropeptide participates in the regulation of numerous functions and one function is regulated by numerous neuropeptides. On this basis an idea is put forward about the polyfunctional principle of neuropeptides action, namely in the processes of learning and memory. The data on the participation of the same neuropeptides in the regulation of various processes, such as formation, fixation and reproduction of temporary connections (memory traces) and involvement of the different neuropeptides in the regulation of the same operation of the memory function are discussed. The dependence of the effect of neuropeptides on learning and memory from their dose, individual properties, functional state of the organism as well as from the peculiarities of the tests used is emphasized.

ЛИТЕРАТУРА

1. Peptides in neurobiology. Ed. H. Gainer. New York, Plenum Press, 1977.
2. Ашмарин И. П. Патол. физиол. эксп. терап., 4, 13, 1982.
3. Snyder S. H. Science, 209, 976, 1980.
4. Neurosciences Research Program Bulletin, MIT Press, London, v. 16, 1980.
5. Peptides, Proc. XVI Amer. Pept. Symp., Ed. E. Gross, J. Meienhofer, Pierce Chem. Comp., Rockford, Illinois, 1979.
6. Morley J. S. Trends Pharmac. Sci., 1, 463, 1980.
7. Андреев С. М., Анохин К. В., Антонова Л. В. ДАН СССР, 253, 498, 1980.
8. Psychopharmacology of aggressiveness, New York, Raven Press, 1979.
9. Титов С. А. ДАН СССР, в печати.
10. Kalter V. G., Folk G. E. Comp. Biochem. Physiol., 63A, 7, 1979.
11. De Wied D.—In: Frontiers in neuroendocrinology. Ed. W. F. Ganong a L. Martini. New York, Oxford University Press, p. 97, 1969.
12. Izquierdo I., Souza D. O., Carrasco M. A. et al. Psychopharmacology, 70, 173, 1980.
13. Izquierdo I., Perry M., Dias R. D., Souza D. O., Ellsabetzky E., Carrasco M., Orsinger O. A., Netto C. A.—In: Endogenous peptides and learning and memory processes. Ed. J. L. Martinez et al. New York, p. 269, 1982.
14. Van Wimersma Greidanus T. B., De Wied D. Behav Biol., 18, 325, 1976.
15. Антонова Л. В., Бурбаева Г. Г., Ашмарин И. П., Каменский А. А. ДАН СССР, 258, 1477, 1981.
16. Legros J. J., Gilot P., Seron X. et al. Lancet, 8054, 41, 1978.
17. Oliveros J. C., Jandall M. K., Temist-Berthier et al. Lancet, 8054, 42, 1978.
18. Anderson L. T., David R., Bonnet K., Dancis J. Life Sci., 24, 905, 1979.
19. Gispén W. H., Wan Ree J. M., De Wied D.—In: Internat. Review of Neurobiology. Ed. J. R. Smythies, R. J. Bradley, Academic Press, 20, 209, 1977.
20. De Wied D. Life Sciences, 20, 195, 1977.
21. De Wied D., Gispén W. H.—In: Peptides in Neurobiology. Ed. H. Gainer, New York—London, Plenum Press, 397 p., 1977.
22. Beckwith B., Dandman C. Neurosciences and Biobehavioral Reviews, 2, 311, 1978.

23. Шерстнев В. В., Полетас А. Б., Долгов О. Н. Успехи физиол. наук, 10, 46, 1979.
24. Rigter H., Crabbe J. C.—In: Vitamins and Hormones, Acad. Press, 37, 154, 1979.
25. Kastin A. J., Olson R. D., Schally A. V., Coy D. H. Life Sciences, 25, 401, 1979.
26. Olson G. A., Olson R. D., Kastin F. J., Coy D. H.—In: Neuroscience Biobehavioural Reviews, 3, 285, 1979.
27. Riley A. L., Zellner D. A., Duncan H. J. Neuroscience and Biobehavioural Reviews, 4, 69, 1980.
28. Судаков К. В., Сидоренко Т. С. Успехи физиол. наук, 12, 131, 1981.
29. Kovacs G. L., Bohus B., Versteeg D. H. G.—In: Progr. Brain Res. Ed. McConnell et al., Elsevier, 53, p. 123, 1980.
30. Осиповский С. А., Полесская М. М. Успехи физиол. наук, 13, 74, 1982.
31. Bohus B. Int. Ment. Health, 9, 3–4, 6, 1982.
32. De Wied D., Jolles J.—In: Physiological Reviews, 62, 976, 1982.
33. De Wied D., Van Ree J. M. Life Sciences, 31, 709, 1982.
34. Gold P. E., McGaugh J. L.—In: Neuropeptide Influences on the Brain. Ed. L. H. Miller et al., New York, Raven Press, p. 127, 1977.
35. Bohus B., Gispen W. H., De Wied D. Neuroendocrinology, 11, 137, 1973.
36. Greven H. M., De Wied D.—In: Drug Effects on Neuroendocrine Regulation, ed. E. Zimmerman et al. (Progr. Brain Res., v. 39) Amsterdam, Elsevier, p. 429, 1973.
37. Van Wimerzma Greidanus T. B., Bohus B., De Wied D.—In: Hormones Homeostasis and the Brain, ed. Gispen W. H. et al. (Progr. Brain Res., v. 42) Amsterdam, Elsevier, 135 p., 1975.
38. Ашмарин Н. П., Каменский А. А., Шелехов С. Л. ДАН СССР, 240, 1245, 1978.
39. Ашмарин Н. П., Антонова Л. В., Титов С. А., Максимов Л. А., Каменский А. А. Ж. высш. нервн. деят., 30, 1196, 1980.
40. Виноградов В. М., Медведев В. И., Гречко А. Т., Бахарев В. Д., Пономарева-Степная М. А. Физиол. ж. СССР, 66, 409, 1980.
41. Bohus B.—In: Hormones, Homeostasis and the Brain. Ed. W. H. Gispen et al. Progr. Brain Res., Amsterdam, Elsevier, v. 42, 275 p. 1975.
42. Bohus B.—In: Hypertension and brain mechanisms. Progr. Brain Res., Amsterdam, Elsevier, 47, 277 p. 1977.
43. Абуладзе Г. В., Чучулашвили Н. А. Сердце, активное избегание и эмоции. Тбилиси, Мецниереба, 1981.
44. Urban I., De Wied D. Exp. Brain Res., 24, 325, 1976.
45. Gold P. E., Van Buskirk R. B. Behav. Biol., 16, 387, 1976.
46. Flood J. F., Jarvik M. E., Bennet E. L., Orme A. E. Pharmacol., Biochem. Behav., 5, suppl. 1, 41, 1976.
47. Martinez Jr. J. L., Vasquez B. J., Jensen R. A., Soumireu-Mourat B., McGaugh J. L. Pharmacol. Biochem. Behav., 10, 145, 1979.
48. Кругликов Р. И.—В кн.: Физиология высшей нервной деятельности, ч. II, М., Наука, с. 34, 1978.
49. Кругликов Р. И. Нейрохимические механизмы обучения и памяти. М., Наука, 1981.
50. Bloch V. Brain Res., 24, 561, 1970.
51. Bloch V.—In: Neural Mechanisms of Learning and Memory. Ed. M. R. Rosenzweig et al. E. L. Bennet, MIT Press, Cambridge, 583 p., 1976.
52. Rigter H., Van Riezen H., De Wied D. Physiol. Behav., 13, 381, 1974.
53. Rigter H., Greven H., Van Riezen H. Neuropharmacology, 16, 545, 1977.
54. Rigter H., Van Riezen H. Physiol. Behav., 14, 563, 1978.
55. Martinez J. L., Rigter H., Van der Gugten J.—In: Endocrinology, Neuroendocrinology, Neuropeptides. Ed. E. Stark et al., London, Pergamon Press, p. 273, 1981.
56. Rigter H., Jensen R., Martinez J. L., Messing R. B., Vasquez B. J., Llang K. C., McGaugh J. L. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 73, 3729, 1980.

57. *Rigter H., Hannan T. J., Messing R. A., Veliquette J., McGaugh J.* Life Sci., 26, 337, 1980.
58. *Izquierdo I., Dias R.* Neuroscience Letters, 22, 189, 1981.
59. *Izquierdo I., Dias R., Perry M. L., Souza D. O., Elisabetsky E., Carrasco M. A.*—In: Neuronal Plasticity and Memory Formation, Ed. C. Ajmone Marsan and, H. Matthies. New-York, Raven Press, 89 p., 1982.
60. *Stein L., Belluzzi J. D.* Federation Proc., 38, 2468, 1979.
61. *Kovacs G. L., Bohus B., De Wied D.* Neuroscience Letters, 22, 79, 1981.
62. *Rigter H.* Science, 200, 85, 1978.
63. *Кругликов Р. И., Гольдберг М. Б., Майзелис М. Я., Заблудовский А. Л.* Изв. АН СССР, сер. биол. и мед. науки, 778 1980.
64. *Кругликов Р. И., Орлова Н. В., Гецова В. М., Мац В. Н.* Нейрохимия, 2, 1, 3—11, 1983.
65. *Bohus B.* Adv. Biol. Psychiat., 5, 7, 1980.
66. *De Wied D., Bohus B., Van Ree J. M., Urban J. J.* Pharm. Exp. Ther., 224, 570, 1978.
67. *De Wied D.* Ann. NY Acad. Sci., 297, 263, 1977.
68. *De Wied D., Bohus B.*—In: Brain Mechanisms in Memory and Learning: From the Single Neuron to Man. Ed. M. A. B. Brazier. New-York, Raven Press 139 p. 1979.
69. *Lande S., Flexner J. B., Flexner L. B.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 558, 1972.
70. *Стрелец В. Б., Арцеулова О. К., Курницкая И. В.*—В кн.: Материалы Всесоюз. симпозиума. Механизмы пластичности мозга при функциональных и патологических воздействиях. Махачкала, т. 2, 128 с., 1982.

Московский государственный
университет им. М. В. Ломоносова,
Институт высшей нервной деятельности
и нейрофизиологии АН СССР, Москва

Поступила 26. I 1983

СОДЕРЖАНИЕ

<i>Корнеева Н. В., Ушаков А. С., Шишкина С. К.</i> Влияние интенсивной двигательной нагрузки на содержание ацетилхолина и холинэстеразную активность в различных отделах нервной системы крыс	241
<i>Сэлл А. В., Краузберг Т. Х., Ярв Я. Л.</i> Исследование кинетики термонинактивации ацетилхолинэстеразы мозга крыс и бутирилхолинэстеразы сыворотки крови лошади	247
<i>Казеннов А. М., Маслова М. Н., Савина Г. В., Шалабодов А. Д.</i> Влияние отравлений крыс фосфорорганическим ингибитором ацетилхолинэстеразы на активность Na^+ , K^+ -АТФазы головного мозга	256
<i>Срапионян Р. М., Саакян С. А., Саакян Ф. М., Галоян А. А.</i> Выделение и характеристика кардиоактивного триптического фрагмента белка-носителя нейроморфона «С»	263
<i>Вахарев В. Д., Саргсян А. С., Михалева И. И.</i> Влияние пептида δ -сна и его аналогов на биоэлектрическую активность головного мозга кроликов	272
<i>Бархударян Н. А., Азарян А. В.</i> Очистка и изучение свойств высокомолекулярной аспарагиновой протеиназы из мозга крупного рогатого скота	280
<i>Майзелис М. Я., Забудовский А. Л., Шихов С. Н.</i> Нарушение синтеза белков при повреждающем действии этанола и антенатальном периоде на развивающийся мозг	288
<i>Эдмондс Х. Л. (мл.), Сытинский И. А., Сильвестер Д. М., Беллин С. И.</i> Корреляция нейрохимических и поведенческих показателей крыс при алкогольной абстиненции	296
<i>Нилова Н. С.</i> Некоторые биохимические характеристики синапсом из головного мозга крыс, лишенных парадоксальной фазы сна	307
Краткие сообщения	
<i>Ковалёв Г. И., Хетев Л.</i> Ингибирование ГАМК и фенибутом K^+ стимулируемого высвобождения ^3H -дофамина из синапсом прилежащего ядра крыс	315
<i>Шерстнев В. В., Кочетков Н. В., Беляев С. В., Лысова Н. П., Долгов О. Н., Поletaев А. Б.</i> Влияние эндогенных олигопептидных лигандов нейроспецифических белков группы S-100 на поведение	319
<i>Менджеричский А. М., Вовченко И. Б., Козлова Л. С.</i> Активность протеолиза в мозгу и спинномозговая система ликвора и крови при действии антител к основному белку миелина	323
Обзоры	
<i>Ашмарин И. П., Кругликов Р. И.</i> Пептиды, обучение, память (принцип полифункциональности)	327

CONTENTS

<i>Korneeva N. V., Ushakov A. S., Shishkina S. K.</i> Effect of intensive locomotory load on the amount of acetylcholine and the activity of acetylcholinesterase in rat CNS	241
<i>Sepp A. V., Krausberk T. H., Järv J. L.</i> Thermal inactivation of acetylcholinesterase from rat brain and butyrylcholinesterase from horse serum . . .	247
<i>Kazenov A. M., Maslova M. N., Savina G. V., Schalabodov A. D.</i> Effect of organophosphorous inhibitor of acetylcholinesterase on the activity of brain Na^+ , K^+ -ATPase	256
<i>Srapionyan R. M., Saakyan S. A., Saakyan F. M., Galoyan A. A.</i> Isolation and characteristics of cardioactive tryptic fragment of neurohormone "C" protein carrier	263
<i>Bakharev V. D., Sargsyan A. S., Mikhaleva I. I.</i> Effect of Delta-Sleep Inducing Peptide and its analogs on the rabbit brain bioelectric activity . .	272
<i>Barkhudaryan N. A., Azaryan A. V.</i> A high molecular weight aspartic proteinase from cattle brain. Purification and properties	280
<i>Maizelis M. Ya., Zabludovsky A. L., Shikhov S. N.</i> Role of protein synthesis disorders in the mechanism of noxious effect of ethanol on the developing brain	288
<i>Edmonds H. L., Jr., Sytinsky I. A., Sylvester D. M., Bellin S. I.</i> Neurochemical and behavioural parameters of ethanol withdrawal reactions in rats .	296
<i>Nilova N. S.</i> On neurochemical characteristics of brain synaptosomes in rats deprived from paradoxical phase of sleep	307
Short communications	
<i>Kovalev G. I., Hetey L.</i> Gaba and phenylbut inhibit potassium-stimulated release of 3H-dopamine from rat brain n. accumbens synaptosomes	315
<i>Sherstnev V. V., Kochetkov N. V., Belyev S. V., Lysova N. P., Dolgov O. N., Poletayev A. B.</i> Behavioural effects of endogenous ligands of brain S-100 type specific proteins	319
<i>Mendzheritsky A. M., Vovchenko I. B., Kozlova L. S.</i> Effect of antibodies to myelin basic protein on the proteolytic activity in brain and kallikrein-kinine system in liquor and serum	323
Reviews	
<i>Ashmarin I. P., Kruglikov R. I.</i> Peptides, learning, memory (polifunctional principle)	327