

НЕЙРОХИМИЯ

ՆԵՅՐՈՔԻՄԻԱ

ТОМ. 2. № 4. 1983

ISSN 0203-493X



АКАДЕМИЯ НАУК СССР
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

Редакционная коллегия

А. А. ГАЛОЯН—главный редактор

Г. В. Априкян, А. В. Арутюнян (зам. главного редактора), Л. С. Арутюнян (отв. секретарь), Я. В. Бедик, 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, В. 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. Этингоф

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР



НЕЙРОХИМИЯ ՆԵՅՐՈՔԻՄԻԱ

ТОМ 2, ВЫП. 4
Октябрь—декабрь

Журнал основан в 1982 году
Выходит 4 раза в год

ИЗДАТЕЛЬСТВО АН АРМЯНСКОЙ ССР
ЕРЕВАН

1983

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

Сдано в набор 6.09.1983 г. Подписано к печати 9.12.1983 г. ВФ 04587.
Бумага № 1, 70×108¹/₁₆. Высокая печать. Печ. лист. 7,25. Усл. печ. лист. 10,15.
Учет.-изд. 7,56. Тираж 745. Заказ 832. Издат. 6052.

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 нейрохимии, рецензии на новые издания и актуальная научная хроника. Объем рукописи (включая резюме, список литературы и иллюстрации) не должен превышать 15 с., напечатанных на машинке через 2 интервала. Объем обзоров не более 20 с., кратких сообщений, рецензий и хроник 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. Подпись 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 typewritten 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 612.884—06 : 612.825

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ НОРАДРЕНЕРГИЧЕСКИХ И СЕРОТОНИНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ ГОЛОВНОГО И СПИННОГО МОЗГА В АНТИНОЦИЦЕПТИВНЫХ МЕХАНИЗМАХ СТРЕССА

БРАГИН Е. О., МАССАРИ Д.*, ПЕРТ А.**, ДУРИНЯН Р. А.

Используя нейрофармакологические методы специфического выключения норадренергических и серотонинергических нейронов головного и спинного мозга, показано, что выключение катехоламинергических нейронов препятствует развитию обезболивания при стрессе: выключение серотонинергических нейронов головного и спинного мозга и нисходящих серотонинергических нейронов спинного мозга не влияет на развитие вызванного стрессом обезболивания.

В последние годы получено значительное количество данных, указывающих на важную роль нисходящих путей спинного мозга в механизмах обезболивания при действии морфина и электрическом раздражении мозга. Особое внимание уделяется серотониновым системам, нисходящим в спинном мозгу. Так, было показано, что электрическое повреждение большого ядра, являющегося источником нисходящих серотониновых путей спинного мозга, вызывает торможение анальгезии после введения морфина [1, 2]. В электрофизиологических исследованиях было обнаружено появление высокой фоновой нейрональной активности в большом ядре шва после внутрибрюшинного введения морфина [3] и его инъекций в серое вещество головного мозга [4]. Другое доказательство участия нисходящих серотониновых путей спинного мозга в механизмах обезболивания—развитие анальгезии при электрической стимуляции большого ядра шва [5]. Важно отметить, что при этом виде стимуляции имело место угнетение активности первичных болевых афферентов в задних рогах спинного мозга [5, 6]. Однако в работе Lorenz [7] были получены данные, ставящие под сомнение участие серотониновых путей при этих видах обезболивания. При электрическом повреждении большого ядра шва в спинном мозгу концентрация серотонина уменьшается незначительно, тогда как уровень норадреналина резко снижается. В последующих работах [8, 9] была продемонстрирована важная роль нисходящих норадренергических путей спинного мозга в морфинной анальгезии. Однако об участии этих систем мозга в механизмах обезболивания при действии таких рефлек-

торных раздражителей, как эмоционально-болевого стресс или акупунктура, сведений нет.

В связи с этим в настоящей работе изучали роль норадренергических и серотонинергических нейронов головного и спинного мозга в антиноцицептивных механизмах вызванного стрессом обезболивания.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на 55 крысах-самцах линии Спрэг-Дейли массой 220—250 г. Состояние стресса вызывали методом неустраиваемого электрокожного раздражения. Для этого животных помещали в камеру, по полу которой проходил прерывистый постоянный ток—2,5 мА, длительность импульса—2 с, 8 имп/мин, продолжительность воздействия—10 мин.

Болевую чувствительность оценивали по величине латентных периодов болевых реакций облизывания лап (РОЛ) после помещения крысы на горячую пластину (55°) и по длительности реакции отведения хвоста (РОХ) при действии на него термического раздражителя (сфокусированный пучок света проекционной лампы мощностью 150 Вт). Латентные периоды измеряли до и после стрессового воздействия.

Выключение норадренергических структур головного и спинного мозга вызывали путем введения 6-оксидофамина (6-ОДА, 300 мкг/10 мкл) в мозговые желудочки с помощью стереотаксической техники [10], так как известно, что 6-ОДА вызывает дегенерацию катехоламинсодержащих нейронов [11]. Выключение нисходящих катехоламинных путей спинного мозга вызывали разрушением норадренергических нейронов боковых ретикулярных ядер (А-1). Для этого с помощью стереотаксической техники по координатам AP—4,4 мм; L±2,0 VD-1,0 вводили 6-ОДА (6 мкг/1,5 мкл). Выключение серотонинергических нейронов головного и спинного мозга вызывали с помощью нейротоксина 5,7-диокситриптамина (5,7-ДОТ), который приводит к дегенеративным изменениям их структуры. Для разрушения нейронов головного и спинного мозга 5,7-ДОТ (250 мкг/100 мкл) вводили в мозговые желудочки. Для специфического повреждения только нисходящих серотонинергических нейронов спинного мозга вводили 5,7-ДОТ (10 мкг/2 мкл) в большое ядро шва (AP-2,5 мм; L-0; VD-1,0 [10]), которое является источником серотонинных структур спинного мозга. Крысам, получавшим 5,7-ДОТ, за 2 ч вводили внутривенно дезимипрамин (15 мг/кг) для предотвращения неспецифического повреждения норадренергических нейронов. В качестве контрольной группы использовали животных, подвергнутых ложной операции, которым вводили в структуры мозга физиологический раствор. Опыты проводили через 10—12 дней после операции. После проведения экспериментов крыс декапитировали и брали мозг для гистологического контроля. Результаты опытов обрабатывали статистически по общепринятым методам.

Результаты и обсуждение

Роль норадренергических нейронов головного и спинного мозга. У контрольных крыс в результате стрессового воздействия достоверно увеличивался латентный период, измеренный с помощью РОЛ, в 4,7 раза сразу после стресса и в 4,2 раза через 5 мин после окончания воздействия (табл. 1). Качественно аналогичные результаты были получены при измерении РОХ. Так, латентный период непосредственно после окончания стрессового воздействия увеличивался по сравнению с исходным в 2, а через 5 мин—в 1,3 раза. В группе крыс, которым в желудочки мозга вводили 6-ОДА, увеличение латентного периода РОЛ наблюдалось сразу же после окончания воздействия и было в 1,6 раза выше ($p < 0,05$), чем до воздействия. Уровень латентного периода РОЛ через 5 мин не отличался от исходного. При измерении латентных периодов с помощью РОХ выяснилось, что они не отличались от исходных, а при анализе их величин, измеренных обоими методами в постстрессовом периоде, установлено, что изучаемые параметры в группе крыс, получавших 6-ОДА, достоверно ниже, чем у ложно оперированных.

Таблица 1

Влияние инъекций 6-оксидофамина (6-ОДА) и 5,7-диокситриптамина (5,7-ДОТ) на величину латентных периодов болевых реакций облизывания лапы (РОЛ) и реакции отведения хвоста (РОХ) до и после стрессового воздействия

	РОЛ (с)			РОХ (с)		
	контроль	после стресса	через 5 мин	контроль	после стресса	через 5 мин
Ложная операция (n=9)	15,7±1,5	74,8±11,1 $p_1 < 0,001$	66,6±13,7 $p_1 < 0,002$	2,9±0,2	5,8±1,2 $p_1 < 0,05$	4,1±0,5 $p_1 < 0,05$
6-ОДА (n=9)	15,3±2,5	25,2±3,5 $p_1 < 0,05$ $p_3 < 0,01$	16,2±2,7 $p_3 < 0,01$	2,8±0,2	2,6±0,2 $p_3 < 0,05$	2,4±0,2 $p_3 < 0,01$
Ложная операция (n=5)	10,4±0,8	61,0±14,6 $p_1 < 0,02$	65,4±15,5 $p_1 < 0,02$	3,4±0,4	8,9±1,4 $p_1 < 0,01$	11,2±0,9 $p_1 < 0,001$
5,7-ДОТ (n=5)	8,9±0,4	65,7±13,9 $p_1 < 0,01$	69,4±17 $p_1 < 0,02$	3,5±0,1	7,2±1,7 $p_2 < 0,05$	8,1±2,1 $p_2 < 0,05$

p_1 —достоверность отличий между исходным уровнем и после стресса для двухсторонней критической области; p_2 —достоверность отличий между исходным уровнем и после стресса для односторонней области; p_3 —достоверность отличий между контрольной и опытной группами

Повреждение норадренергических нейронов спинного мозга. У животных контрольной группы этой серии в постстрессовом периоде отмечалось достоверное увеличение латентных периодов РОЛ и РОХ непосредственно после окончания стресса (табл. 2). Через 5 мин они не отличались от исходных уровней. При сравнении данных параметров у опытной и контрольной групп выяснилось, что степень обезболивания в первой была достоверно ниже, чем в последней.

Повреждение серотонинергических нейронов головного и спинного мозга. Неизбежный шок вызывал достоверное увеличение латентных периодов (РОЛ, РОХ) по сравнению с исходными уровнями в контрольной группе и группе с введением 5,7-ДОТ в желудочки мозга (табл. 1). При сопоставлении изучаемых величин между ними не было обнаружено достоверных отличий.

Повреждение нисходящих серотонинергических путей спинного мозга, берущих начало в большом ядре шва. Как и в предыдущей серии опытов, при введении 5,7-ДОТ в большое ядро шва неизбежный шок вызывал достоверное увеличение латентных периодов в постстрессовом состоянии по сравнению с исходными латентными периодами. При этом отсутствовали достоверные отличия в параметрах между контрольной и опытной группами (табл. 2).

Таблица 2

Влияние инъекций 6-оксидофамина (6-ОДА) в боковые ретикулярные ядра и 5,7-диокситриптамина (5,7-ДОТ) в большое ядро шва на величину латентных периодов болевых реакций

	РОЛ (с)			РОХ (с)		
	контроль	после стресса	через 5 мин	контроль	после стресса	через 5 мин
Ложная операция (n=9)	16,9±1,5	73,3±9,3 $p_1 < 0,001$	72,2±11,7 $p_1 < 0,001$	3,2±0,3	6,8±1,0 $p_1 < 0,001$	4,7±0,5 $p_1 < 0,01$
6-ОДА (n=9)	14,4±1,5	36,0±6,3 $p_1 < 0,01$ $p_3 < 0,01$	22,8±7,8 $p_3 < 0,01$	2,9±0,1	4,0±0,4 $p_1 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	3,0±0,2 $p_3 < 0,05$
5,7-ДОТ (n=9)	16,0±2,1	77,7±8,1 $p_1 < 0,001$	88,5±11,5 $p_1 < 0,001$	3,2±0,2	5,1±0,8 $p_1 < 0,05$	4,1±0,5 $p_1 < 0,05$

Примечание. Обозначения те же, что и в табл. 1

В работе были применены фармакологические методы специфического повреждения нейронов головного и спинного мозга с целью выявления роли катехоламиновых и серотониновых структур в механизмах обезболивания при стрессе. У животных с поврежденными норадренергическими нейронами головного и спинного мозга (после введения 6-ОДА в желудочки мозга) наблюдалось резкое снижение содержания норадреналина в головном (на 60%) и спинном (на 40%) мозгу. При этом уровень серотонина в изучаемых структурах не изменялся [8]. Наши результаты указывают, что при таком повреждении норадренергических нейронов степень постстрессовой анальгезии резко снижена. Для выяснения роли нисходящих нейронов спинного мозга была проведена серия экспериментов с повреждением боковых ретикулярных ядер (А-1), дающих начало этим путям. Ранее было показано, что при инъекциях 6-ОДА в ядра А-1 наблюдалось резкое снижение норадреналина только в задних рогах спинного мозга без изменения в них количества серотонина [8]. Было установлено, что у животных с

поврежденными А-1 ядрами, как и в случае повреждения нейронов головного и спинного мозга (табл. 1), отмечалось резкое торможение вызванной стрессом анальгезии, что указывает на ведущую роль нисходящих норадренергических путей спинного мозга в антиноцицептивных механизмах стресса. Важно отметить, что полученные данные совпадают с результатами, изложенными в опубликованных ранее работах, указывающих на важную роль нисходящих норадренергических систем спинного мозга при морфинном обезболивании.

Ранее было показано, что введение 5,7-ДОТ в желудочки мозга вызывало резкое уменьшение содержания серотонина в головном и спинном мозгу, а введение 5,7-ДОТ в большое ядро шва—только в спинном мозгу [8]. При этом уровень норадреналина в этих структурах не менялся [2, 8]. Однако, несмотря на такое повреждение серотонинергических нейронов головного и спинного мозга, активность ноцицептивных механизмов организма при стрессовом воздействии не изменялась (табл. 1, 2).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о важной роли нисходящих катехоламинных систем спинного мозга в антиноцицептивных механизмах стресса.

INVOLVEMENT OF BRAIN AND SPINAL CORD NORADRENALINERGIC AND SEROTONINERGIC NEURONS IN STRESS-INDUCED ANALGESIA

BRAGIN E. O., MASSARI D.*, PERTH A.**, DURINYAN R. A.

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

*Harvard University, Washington, USA. **National Institute of Psychiatry,
Bethesda, USA

It was shown that stress may induce analgesia in rats. However, the lesion of catecholaminergic neurons in the brain and spinal cord by injection of 6-OHDA (intraventricular or in n. reticularis lateralis) interferes with stress-induced analgesia. The lesion of the central and descending spinal cord serotonergic neurons (intraventricular or in raphe magnus injections of 5,7-DHT) does not affect the stress-induced analgesia.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Proudfit H. K., Anderson E. G. *Brain Res.*, 98, 612—618, 1975.
2. Yaksh T. L., Plant R., Rudy T. L. *Eur. J. Pharmacol.*, 123, 399—408, 1977.
3. Anderson E. G., Basbaum A. I., Fields H. L. *Brain Res.*, 123, 363—368, 1977.
4. Olveras J. L., Redjemi F., Guilbaud G. *Pain*, 1, 139—145, 1975.
5. Fields H. L., Basbaum A. I., Clanton C. H. *Brain Res.*, 126, 441—453, 1977.
6. Belcher G., Ryall R. W., Schaffner R. *Brain Res.*, 151, 307—321, 1978.
7. Lorenz S. A. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 532—555, 1978.
8. Perth A., Massari J., Tizabi Y. In: *Endogeneous and Exogeneous opiate agonists and antagonists* (ed. Way E. L.), Pergamon Press, p. 151—154, 1980.

9. *Takagi H., Shiomi H., Kuratshi Y.* Eur. J. Pharmacol., 54, 99—107, 1979.
10. *Kontg J. F., Klippel R. A.* The Rat Brain a stereotaxic Atlas, 1970.
11. *Kostrzewa R. M., Jakobowitz D. M.* Pharmacol. Reviews, 26, 199—287, 1974.
12. *Baumgarten H. G., Bjorlund A., Lachenmayer L.* Acta Physiol. Scand., 391, 3—19, 1973.

ЦІИИ рефлексотерапии АМН СССР, Москва

Поступила 10. XI 1982

* Говардский университет, Вашингтон (США)

** Национальный институт, Бетесда (США)

УДК 547.964.4:591.481.1:57.083.3

РАДИОИММУНОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЛОКАЛИЗАЦИИ ПЕПТИД δ -СНА-ПОДОБНОГО МАТЕРИАЛА В РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНАХ И ОТДЕЛАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫ

РОЖАНЕЦ В. В., ЮХАНАНОВ Р. Ю., ЧИЖЕВСКАЯ М. А., НАВОЛОЦКАЯ Е. В.

Разработан чувствительный метод радиоиммунологического анализа (РИА) содержания пептид δ -сна (ПДС)-подобного материала в экстрактах органов крысы, позволяющий обнаруживать 3—4 фмоль пептида в пробе. Метод обладает высокой специфичностью: процент крестных реакций с 11 испытанными нейропептидами не превышает 0,1%. С помощью гель-фильтрации и ионообменной хроматографии получены доказательства идентичности иммунореактивного материала экстракта мозга и синтетического ПДС. В отличие от этого иммунореактивность экстрактов печени и почек частично обусловлена наличием каких-то других соединений. Содержание ПДС-подобного материала в экстрактах органов крысы, а также мозга и 9 изученных его отделов, составляет 1—3 фмоль/мг ткани. Показано, что ПДС-подобная иммунореактивность локализуется в основном во фракциях внесинаптических митохондрий и миелина, а не в синапсоммах. На основании собственных и литературных данных обсуждается возможная роль ПДС как внутриклеточного регулятора.

В 1974 году группа швейцарских исследователей опубликовала данные о структуре нанопептида Trp-Ala-Gly-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu, выделенного ими из гемодиализаторов кроликов, подвергнутых гипногенной стимуляции области таламуса. По данным этих авторов, как природный, так и синтетический пептиды при различных способах введения увеличивали амплитуду и продолжительность низкочастотных так называемых дельта-волн на энцефалограмме животных-реципиентов [1]. Соединение получило название Delta Sleep Inducing peptide—пептид δ -сна.

В настоящее время имеется лишь одно сообщение о радиоиммунологическом выявлении ПДС-подобной иммунореактивности (ИР) в экстрактах мозга и некоторых органах крысы [2]; субклеточная локализация этого материала не изучалась.

Целью настоящего исследования явилось радиоиммунологическое изучение содержания ПДС-подобного материала в отделах и субклеточных фракциях головного мозга, а также в различных органах крысы.

Материалы и методы

Получение антител к ПДС. Синтезированный ПДС [3] конъюгировали с овальбумином («Calbiochem», США) с помощью глутарового альдегида («Sigma», США). Реакционная смесь содержала в 1 мг ПДС, 1,0 мг овальбумина, 10^4 имп/мин [^3H]-ПДС* в 200 мкл 0,1 М фосфатного буфера, pH 7,4. Реакцию начинали добавлением 10 мкл 5%-ного глутарового альдегида. После 10 мин инкубации при 25° реакционную смесь наносили на колонку с сефадексом G-15 («Pharmacia», Швеция). Элюцию проводили тем же фосфатным буфером. Фракцию конъюгата определяли по пику радиоактивности, выходящему с V_0 . Для определения количества молекул ПДС, связанных с одной молекулой овальбумина, aliquоту фракции конъюгата анализировали в течение суток против 200 объемов того же буфера. Количество белка в конъюгате определяли, используя в качестве стандарта тот же препарат овальбумина. При типичной конъюгации эта величина составляла 9—10 моль ПДС/моль белка.

Для иммунизации использовали кроликов-самцов швейцарского типа массой 2,5—3,0 кг; всего было использовано 5 животных. Неочищенный конъюгат (0,5 мг белка/0,5 мл буфера) смешивали до получения гомогенной эмульсии с 0,5 мл полного адьюванта Фрейнда («Calbiochem», США). В области обоих подколенных лимфоузлов задних ног вводили по 0,3 мл свежеприготовленной эмульсии. Повторные иммунизации проводили через 1, 4, 10 и 12 месяцев после первой, вводя 0,3 мл свежеприготовленной эмульсии конъюгата в область одного из подколенных лимфоузлов и противоположной лопатки. Отбор крови после иммунизации проводили из ушной вены еженедельно в течение месяца. Определение титра антител к овальбумину и ПДС осуществляли с помощью иммунодиффузии по Ouchterlony и связывания [^3H]-ПДС. Максимальный титр антител к ПДС был достигнут через 2 недели после пятой иммунизации, причем титр антител к овальбумину не превышал 1:100.

Йодирование тирозильных аналогов ПДС. Тирозильные аналоги с замещениями в 6, 7, 8 положениях (Тур-ПДС) йодировали с помощью лактопероксидазы [2]. Реакционная смесь содержала 1 мкМ ^{125}I («Amersham», Англия), 10 мкг пептида, 20 мкг лактопероксидазы («Boehringer», ФРГ), 37 нмоль H_2O_2 в 37 мкл фосфатного буфера, pH 7,4. Реакцию проводили 10 мин при 25° и интенсивном перемешивании. После остановки реакции добавлением 50 мкг $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ смесь наполнили на микроколонку с ДЕАЕ-целлюлозой DE-52 («Whatman», Англия).

Очистка меченых пептидов. Для очистки [^3H]-ПДС и [^{125}I]-Тур⁶.

* Неочищенный препарат [^3H]-ПДС, полученный в Институте молекулярной генетики АН СССР (Москва) с помощью изотопного обмена на пептида, синтезированного в Институте биорганической химии АН СССР (У. А. 0,3 К_п/ммоль), был нам любезно предоставлен Н. Ф. Мясоедовым. Очистку [^3H]-ПДС проводили на ДЕАЕ-целлюлозе, как описано в разделе «Очистка меченых пептидов».

ПДС от продуктов радиолиза и примесей использовали хроматографию в градиенте концентрации аммоний-ацетатного буфера (0,1—0,4 М, рН 6,7). Этот метод позволяет очистить [125 I] Тир⁶-ПДС от исходного пептида (рис. 1). Удельная активность йодированного пептида после очистки почти равна активности использованного изотопа и превышает 1000 К_п/ммоль.

Связывание 125 I-Тир-ПДС с сывороткой. Все растворы для РИА готовили на так называемом РИА-буфере: 0,5% бычьего сывороточного альбумина (БСА) («Reanal», ВНР), 0,05 азида натрия («Sigma», США), в 50 мМ трис-НСI буфере, рН 7,8. Каждая проба содержала по 0,1 мл [125 I]-Тир⁶-ПДС (7×10^3 имп/мин), 0,1 мл раствора ПДС или тестируемого экстракта, 0,2 мл РИА-буфера и 0,1 мл иммунной сыворотки в разведении 1:5000. Таким образом, конечное разведение сы-

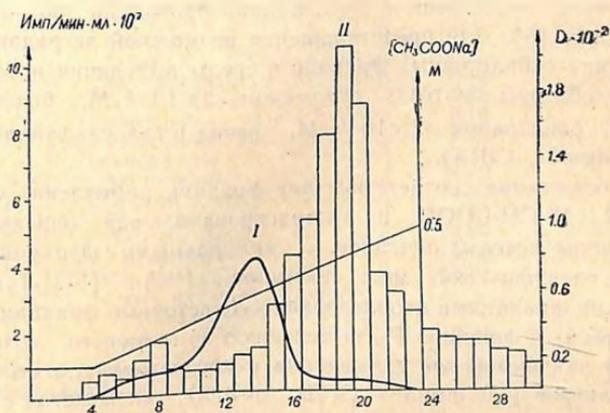


Рис. 1. Очистка 125 I-тирозильных производных ПДС на ДЕАЕ-целлюлозе ДЕ-52 в градиенте концентрации ацетат-аммониевого буфера, рН 6,7 при 25°. Микроколонка 0,5 × 20,0 см, скорость элюции 9 мл/ч. I — позиция пика исходного ПДС, II — позиция пика 125 I

воротки в 0,5 мл инкубационной смеси составляло 1:25000. После 40—42 ч инкубации при 4° антитела осаждали добавлением 0,1 мл 0,1%-ного раствора γ -глобулина (фракция 5, «Calbiochem», США) с последующим добавлением 0,6 мл насыщенного раствора сульфата аммония. Через 30 мин пробы центрифугировали при 3000 г и 4°. Надосадочную жидкость удаляли, радиоактивности осадков определяли с помощью γ -флаконов в сцинтилляционном счетчике «Beckman SL-9000» (США).

Выделение и экстракция ткани. В работе использовали самцов беспородных белых крыс массой 250—300 г. После декапитации животных мозг немедленно извлекали и разделяли на льду на 9 основных областей по Glowinski, Iversen [4]. Кусочки ткани сразу же замораживали в жидком азоте и хранили далее при -70° до суток. Замороженную ткань взвешивали и помещали во флаконы с 0,1 М CH_3COOH , нагретой до 100° (6 мл/1 г ткани), быстро измельчали скальпелем на кусочки массой

не более 50 мг. Через 10 мин инкубации при 100° флаконы охлаждали на льду, гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком и центрифугировали при 20 000 g на холоду. Осадок дважды промывали тем же объемом 0,1 M CH_3COOH , супернатанты объединяли и лиофилизовали. Лиофилизованный материал при необходимости хранили на холоду до 1 недели, далее растворяли в РИА-буфере (2 мл/1 г исходной ткани), центрифугировали 5 мин при 8000 g, супернатант собирали и хранили при -20° до 2 недель. После размораживания непосредственно перед измерением экстракт центрифугировали повторно. Ткани других органов и сыворотку крови экстрагировали аналогично.

Выделение субклеточных фракций мозга. Выделение, а также электронномикроскопический и энзиматический контроль фракций синаптических мембран, синапсомом и митохондрий проводили по описанной ранее методике [5]. Для предотвращения возможной деградации ПДС при выделении субклеточных фракций в среды выделения и осаждения вводили ингибиторы протеаз: пуроминин— 2×10^{-5} M, бензамидин— 4×10^{-5} M, бацитрацин— 2×10^{-3} M, фенолметилсульфанилфторид— 10^{-5} M («Sigma», США).

После осаждения соответствующие фракции немедленно суспендировали в 0,1 M CH_3COOH и экстрагировали, как описано выше.

Связывание меченых пептидов с мембранными фракциями. Для выявления специфических мест связывания [^3H]- и [^{125}I]-Туг⁶-ПДС с мембранными фракциями использовали субклеточные фракции головного мозга крысы и фракцию P₂, выделенную из головного мозга быка. Применяли как измерение связывания с использованном стекловолнистых фильтров («Whatman» GF/B, Англия), так и метод с быстрым центрифугированием и подсчетом радиоактивности проб в осадке, что позволяло использовать от 1—3 до 10—12 мг белка мембранных фракций в 1 мл пробы соответственно. Концентрацию [^3H]-ПДС в инкубационной смеси варьировали от 10^{-5} до 10^{-8} M, концентрации [^{125}I]-Туг⁶-ПДС—от 10^{-7} до 10^{-10} M. Инкубацию проводили как при 4°, так и при 37° от 10 мин до 1. Для защиты меченых пептидов от протеолиза использовали либо набор ингибиторов протеаз, перечисленных выше, либо добавляли в среду инкубации 0,5% БСА («Reanal», ВНР) и 10^{-3} M ЭДТА («Sigma», США). Как показали предварительные опыты, в обоих случаях при инкубации на холоду за 1 ч гидролизуются не более 60—70% от добавленных к пробе 3 имоль [^3H]-ПДС. В качестве буфера в среде инкубации употребляли трис-HCl, 0,05 M, pH 7,4 и натрий-фосфатный или бикарбонатный буферы той же молярности и с тем же pH. Использовали также добавки CaCl_2 и MgCl_2 ($1-2 \times 10^{-3}$ M), NaCl и KCl ($50-100 \times 10^{-3}$ M). Для подавления возможного специфического связывания к пробам добавляли немеченый ПДС в концентрациях $10^{-3}-10^{-6}$ M.

Содержание белка в пробах определяли по модифицированному методу Lowry [6].

Результаты исследований

Проверка чувствительности и специфичности РИА. Наиболее активным конкурентом ПДС за связь с антителами является тирозильное производное пептида с замещением в шестом положении (Tyr⁶-ПДС), которое мы и использовали в работе (табл. 1). Проверка специфичности метода с целым рядом других нейропептидов показала весьма низкий процент перекрестных реакций, как правило, не превышающий 0,01%.

Таблица 1

Специфичность использованной сыворотки по отношению к различным пептидам

Соединение	Перекрестная иммунореактивность, %
ПДС	100
Tyr ⁶ -ПДС	100
Tyr ¹ -ПДС	5
Tyr ⁶ -ПДС	0,2
Ala ³ -ПДС	1
*Ava(2-4)	0,5
Met-энкефалин	0,01
Leu-энкефалин	0,01
α-эндорфин	0,01
γ-эндорфин	0,01
β-эндорфин	0,01
Ангиотензин	0,02
Соматостатин	0,1
Брадикинин	0,01
Инсулин бычий	0,05
Люлиберин	0,02
Кортикотропин ₁₋₂₄	0,01
Смесь аминокислот, имитирующая аминокислотный состав ПДС	0,01

* производное ПДС, в котором фрагмент-Gly³-Gly⁴ заменен на остаток аминокислотной кислоты

Таблица 2

Содержание ПДС-подобного материала в экстрактах головного мозга некоторых грызунов и различных органах крысы

Вид животных и орган	Концентрация, фмоль/мг ткани	Концентрация, фмоль/мг белка*
Суслик крапчатый Головной мозг	0,22±0,04 (7)	
Мышь, линия В 10.К III Головной мозг	2,70±0,08 (12)	11,9±1,8 (10)
Крыса беспородная Головной мозг	1,28±0,20 (10)	
Печень	0,83±0,25 (3)	
Сердце	1,17±0,10 (2)	
Почки	0,65±0,05 (3)	
Легкие	0,88±0,26 (3)	
Мышцы	2,91±1,65 (2)	
Сыворотка крови	—	4,4±1,3 (2)

Примечание. В скобках—число опытов;

* пересчет на мг белка лиофилизованного экстракта.

Чувствительность метода в его обычном варианте позволяет достоверно измерить от 10 до 100 фмоль ПДС-подобной ИР. В специальных случаях, уменьшая количество [¹²⁵I]-Tyr⁶-ПДС и увеличивая время под-

счета радиоактивности, удается повысить чувствительность метода до 3—4 фмоль ПДС-подобной ИР в пробе.

Изучение содержания ПДС-подобной ИР в головном мозгу грызунов и различных органах крысы. Содержание ПДС-подобного материала в головном мозгу исследованных грызунов невелико и составляет 0,22—2,7 фмоль на 1 мг ткани (табл. 2). Содержание ПДС-подобной ИР в экстрактах головного мозга бодрствующих крапчатых сусликов невелико и составляет в среднем 8 и 17% от содержания у мышей и крыс*.

Мы не обнаружили достоверных различий в содержании ПДС-подобной ИР в экстрактах различных органов крысы. Можно утверждать, что столь равномерное распределение ИР не может объясняться примесью крови в органах, так как при пересчете на 1 мг белка содержание ПДС-подобной ИР в сыворотке крови существенно ниже, чем, например, в мозгу.

Хроматографическая идентификация ПДС-подобной ИР экстрактов органов крысы. Необходимым, хотя и недостаточным критерием специфичности выявляемой ИР является коллинеарность калибровочной кривой для исследуемого пептида с соответствующей кривой, полученной для разных концентраций изучаемого экстракта. Кривые, полученные с экстрактами печени и мозга, неколлинеарны (рис. 2). В то же время лишь кривая, полученная с экстрактом мозга, коллинеарна калибровочной кривой, полученной с синтетическим ПДС.

Таблица 3
Распределение ПДС-подобной иммунореактивности по областям головного мозга крысы

Область мозга	Содержание фмоль/мг ткани
Фронтальная кора	1,08±0,11 (3)
Затылочная кора	1,79±0,18 (5)*
Гиппокамп	3,15±1,40 (4)
Таламус	1,02±0,11 (6)
Гипоталамус	1,65±0,09 (3)*
Стриатум	1,36±0,27 (6)
Мозжечок	1,38±0,53 (4)
Средний мозг	1,98±0,25 (4)*
Продолговатый мозг	1,45±0,22

Примечание. В скобках—число животных;

* $p < 0,05$ по сравнению с таламусом

Фракционирование экстракта печени на сефадексе G-25 показало наличие двух пиков ПДС-подобной ИР (I и II на рис. 3), из которых лишь I совпадает с позицией пика, соответствующего синтетическому ПДС. Но при фракционировании экстракта мозга в тех же условиях наблюдался лишь один пик ПДС-подобного материала, совпадавший с позицией ПДС.

* Эти эксперименты выполнены совместно с Л. П. Крамаровой и С. Г. Коласовой, Институт биофизики АН СССР, Пушкино-на-Оке.

Последовательное фракционирование ИР материала экстракта мозга на сефадексах G-25, LH-20 и ДЕАЕ-целлюлозе (ДЕ-52) давало единственный пик ПДС-подобной ИР, всегда совпадавший с позицией пика ПДС (рис. 4).

В совокупности эти данные позволяют утверждать с высокой степенью вероятности, что ИР экстракта мозга крысы обусловлена наличием в нем ПДС, а лечени—не только ПДС, но и какими-то другими соединениями.

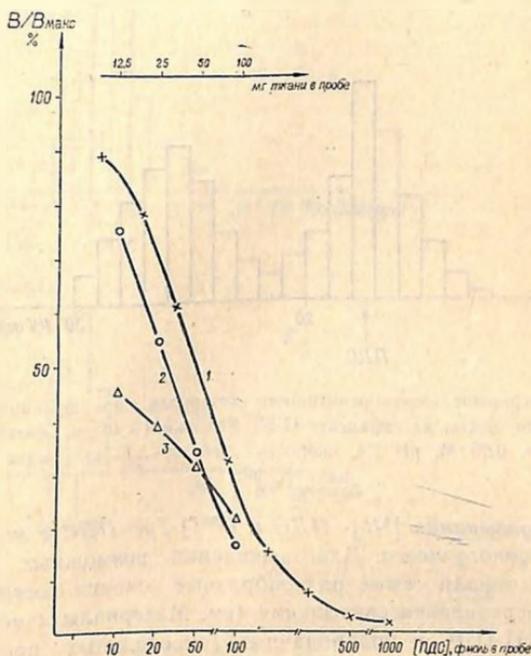


Рис. 2. Типичная калибровочная кривая γ -зависимости количества (^{125}I) -Тугб-ПДС, связанного с сывороткой от содержания синтетического пептида или аликвоты экстрактов тканей (1), 2—экстракт головного мозга; 3—экстракт печени (и почек) крысы. На вставочной шкале вверху приведены навески ткани, соответствующие использованным аликвотам экстрактов

Распределение ПДС-подобной ИР в различных отделах и субклеточных фракциях головного мозга крысы. ПДС-подобная ИР довольно равномерно распределена в различных областях мозга (табл. 3). Наименьшая концентрация ИР найдена в таламусе, где она достоверно ниже, чем в затылочной коре, гипоталамусе и среднем мозгу. Сравнение результатов, приведенных в табл. 2, 3, позволяет заключить, что ни в одном из данных отделов мозга содержание ПДС-подобной ИР не отличается от содержания в целом органе.

Анализ экстрактов субклеточных фракций показал, что ПДС-по-

добная ИР содержится главным образом во внесинаптических митохондриях и миелине, содержание же ее в синаптосомах примерно на порядок ниже, чем в митохондриях (табл. 4). Несмотря на небольшое количество опытов, эти данные позволяют утверждать, что ПДС, по-видимому, не концентрируется в нервных окончаниях и по этому признаку не может быть отнесен к предполагаемым нейротрансмиттерам или нейротрофическим факторам.

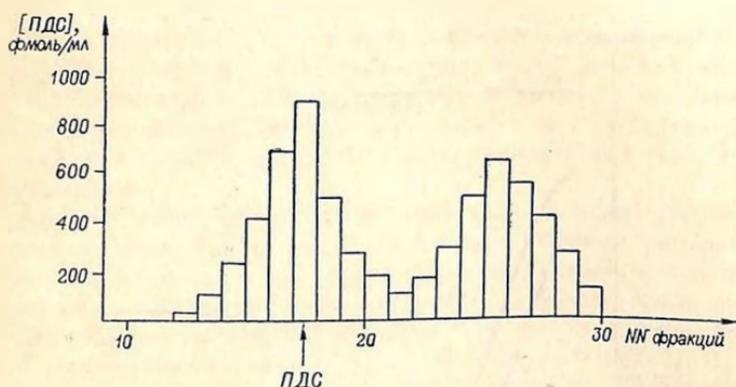


Рис. 3. Содержание иммунореактивного материала при фракционировании экстракта печени на сефадексе G-25. Колонки 1×40 см, элюция триэтил-НСI-буфером, 0,05 М, рН 7,4, скорость элюции—5,5 мл/ч, одна фракция—12 мин

Изучение связывания $[^3H]$ -ПДС и $[^{125}I]$ -Tyr⁶-ПДС с мембранными фракциями головного мозга. Для выявления возможных рецепторов ПДС мы использовали самые разнообразные условия постановки опытов и методы определения связывания (см. Материалы и методы). При применении $[^3H]$ -ПДС и йодированных тирозильных производных с замещениями в 6, 7, 8 положениях нам не удалось обнаружить специфического связывания данных лигандов ни с одной из мембранных фракций головного мозга крупного рогатого скота и крысы.

Обсуждение результатов

Полученные результаты свидетельствуют прежде всего о весьма низком содержании ПДС-подобной ИР в отделах головного мозга и различных органах крыс. Эти величины сравнимы с содержанием бомбензиподобной ИР [7] и в несколько десятков раз ниже, чем содержание энкефалинов и эндорфинов в головном мозгу [8, 9]. Содержание ПДС-подобной ИР в экстрактах головного мозга, по нашим данным, в несколько раз ниже, по сравнению с данными Kastin и соавт. [2]. Это можно объяснить как различием пород и условиями содержания животных, так и более высокой специфичностью использованных нами антител и разной химической структурой меченых антигенов. Распределение ПДС-

подобного материала по регионам мозга довольно равномерно. Имеющиеся отличия, на наш взгляд, не являются существенными для функционирования пептида, так как ни в одной из областей мозга нет значимого превышения концентрации ИР над ее содержанием в целом мозгу. Следует отметить, что наши данные опровергают предположение Katin

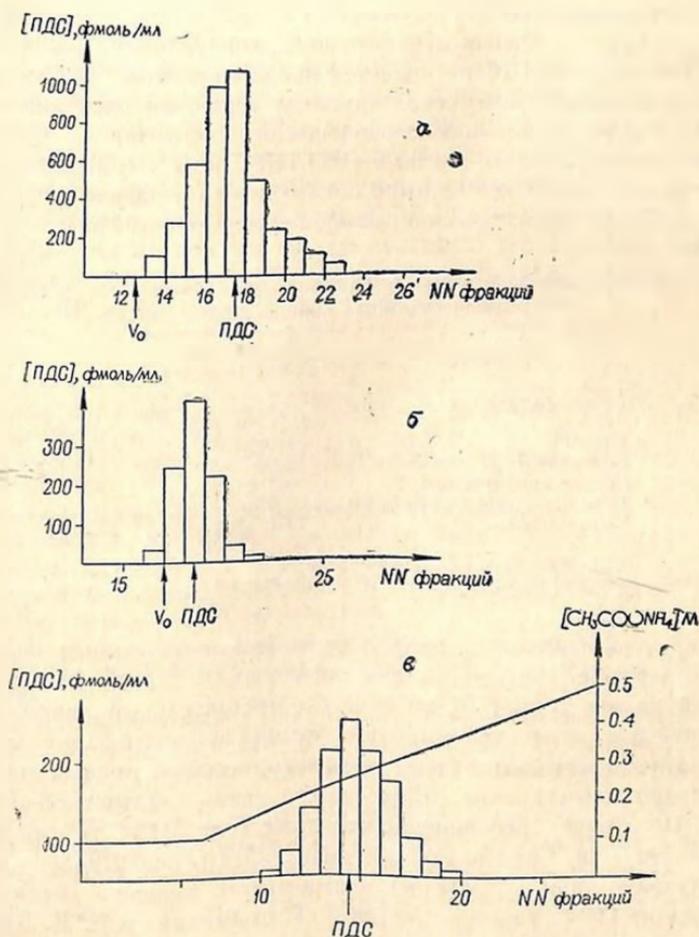


Рис. 4. Последовательное фракционирование экстракта мозга: а—иммунореактивность элюата при хроматографии на сефадексе G-25. Условия фракционирования те же, что и на рис. 3; б—иммунореактивность активных фракций предыдущего фракционирования при рехроматографии на сефадексе LH-20. Колонка 1×40 см, элюция 50%-ным водным метанолом, скорость элюции—4 мл/ч, 1 фракция—16 мин; в—иммунореактивность элюатов при рехроматографии активных фракций предыдущего фракционирования на ДЕАЕ-целлюлозе DE-52 в градиенте концентрации ацетат-аммониевого буфера, pH 6,9. Колонка 1×40 см, скорость элюции—6,4 мл/ч, 1 фракция—16 мин

и соавт. [2] об особой роли таламуса, так как в этой области найдена наименьшая концентрация ПДС-подобной ИР.

Среднее содержание ПДС-подобного материала в головном мозгу крысы не выше, чем в других исследованных органах. Это, однако, не означает, что ПДС не может быть отнесен к нейропептидам, так как значительная часть ИР периферических органов обусловлена отличиями от ПДС соединениями.

По результатам изучения субклеточной локализации данной ИР можно заключить, что ПДС не является предполагаемым нейрогормоном или нейронервным передатчиком, секретируемым нервными окончаниями и действующим далее с помощью специфических рецепторов. Об этом свидетельствует и тот факт, что ни с [^3H]-ПДС, ни с его йодированными тирозильными аналогами не было обнаружено специфических участков связывания на синаптических мембранах головного мозга крысы.

Таблица 4

Распределение ПДС-подобной иммуореактивности по субклеточным фракциям головного мозга крысы

Фракция	Содержание фмоль/мг белка
Ядра	1,20 ± 0,28
Миелин	35,0 ± 5,8
Синаптические мембраны	14,0 ± 3,2
Легкие синапсомы	6,1 ± 1,6
Тяжелые синапсомы*	8,75
Митохондрии	78,0 ± 7,1

Примечание. Количество опытов—2; * одно измерение

В литературе накопилось немало противоречивых данных о физиологическом действии ПДС на разных животных. В одной из последних публикаций на эту тему [10] содержится обстоятельный анализ этих противоречий и их возможных причин. Авторы приходят к выводу, что этот пептид не может быть отнесен к «факторам сна», так как его действие неспецифично и вполне объясняется неким «антистрессорным» эффектом. Но следует подчеркнуть, что даже если ПДС не является «фактором сна», он, безусловно, способен оказать психотропное влияние [11]. Однако лишь в последнее время начато изучение механизма его действия на ЦНС. Так, по данным И. П. Анварина и Е. Л. Доведовой, ПДС в низких концентрациях способен увеличивать моноаминоксидазную (типа А) активность митохондрий головного мозга [12], что согласуется с выявленной нами преимущественной локализацией ПДС-подобной ИР во фракции митохондрий мозга крысы.

Авторы благодарят вице-президента АН СССР акад. Ю. А. Овчинникова, предоставившего возможность для выполнения части данной работы в Институте биорганической химии АН СССР им. М. М. Шемякина, а также чл.-кор. АН СССР В. Т. Иванова за поддержку и плодотворное обсуждение статьи.

REGIONAL DISTRIBUTION OF DELTA-SLEEP INDUCING PEPTIDE (DSIP) LIKE IMMUNOREACTIVITY IN RAT BRAIN AND OTHER ORGANS

ROZHANETS V. V., JUKHANANOV R. Yu., CHIZHEVSKAYA M. A.,
NAVOLOTSKAYA E. V.

Institute of Pharmacology, USSR Academy of Medical Sciences, Moscow

A sensitive and highly specific RIA has been developed to detect DSIP-like immunoreactivity in rat brain different areas and other organs. The method makes it possible to detect 3--4 phentomoles of the peptide/probe. The brain extracts immunoreactivity is indistinguishable from DISP, the one from liver differs from it (established by gel-filtration and ionexchange chromatography). DSIP-like immunoreactivity is localized mainly in the fraction of non-synaptical mitochondria and its amount doesn't differ essentially among 9 brain areas tested. A possible role of DSIP as an intracellular effector is considered.

ЛИТЕРАТУРА

1. Monnier M., Dudier L., Gacher R., Muler P. F., Schoenenberger G. A. *Experientia*, 33, 548--552, 1974.
2. Kastin A. J., Nissen Ch., Schally A. V., Coy D. N. *Brain Res. Bulletin*, 3, 691--695, 1978.
3. Саргсян А. С., Сумская Л. В., Александрова И. Ю., Безруков М. В., Михалева И. И., Иванов В. Т., Балабан П. Н. *Биоорганич. химия*, 7, 1125--1132, 1981.
4. Glaviniski J., Iversen L. L. *J. Neurochemistry*, 13, 655--669, 1966.
5. Родина В. И., Салата Л. В., Рожанец В. В., Поздняков О. М., Глебов Р. Н. *Бюл. экпер. биол. и мед.*, 89, 143--145, 1980.
6. Lies M. B., Rachman S. *Anal. Biochemistry*, 47, 184--192, 1972.
7. Brown M., Allen R., Villareal J., Rivier J., Vale W. *Life Sci.* 23, 2721--2728, 1978.
8. Ross M., Chararossian V., Cox B. M., Goldftin A. *Life Sci.*, 22, 1123--1130, 1978.
9. Gros C., Pradelles P., Rougert C., Bepoldin O., Dray F., Fournie-Zaluski M. C., Roques B. P., Pollard H., Llorens-Cortes C., Schwartz J. C. *J. Neurochemistry*, 31, 29--41, 1978.
10. Tolber J., Borbely A. A. *Waking and Sleeping*, 4, 139--153, 1980.
11. Kaft S., Monnier M., Gallard J. M. *Neuroscie. Lett.*, 169, 13, 169--175, 1979.
12. Ашмарин И. П., Доведова Е. Л. *ДАН СССР*, 252, 1501--1503, 1980.

Институт фармакологии АМН СССР, Москва

Поступила 30. VII 1982

УДК 547.962:541.63

КОНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ГИПОТАЛАМИЧЕСКОГО КАРДИОАКТИВНОГО ГЕКСАПЕПТИДА И ЕГО АЦЕТИЛИРОВАННОГО ПРОИЗВОДНОГО

АВАНОВ А. Я., ЛИПКИНД Г. М.

Выполнен конформационный анализ кардиоактивного гексапептида (Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂), выделенного из гипоталамуса, и его ацетилированного производного, обладающих сходным влиянием на ряд метаболических систем.

Проведено сравнение конформационных состояний их энергетически наиболее благоприятных форм и сделано предположение о возможной причине большей эффективности ацетилгексапептида.

Гексапептид (Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂) и его ацетилированная форма похожи по физиологическому действию, но отличаются по активности. Гексапептид является С-концевым фрагментом гормона люлиберина, фрагменты разной длины которого обладают различной коронной активностью.

Согласно многочисленным данным [1—5], гексапептид и его ацетилированное производное оказывают воздействие на, казалось бы, совершенно независимые, изолированные метаболические процессы.

Физиологические функции молекул должны определяться их пространственным строением. С целью его определения в данной работе проведено исследование оптимальных конформаций гексапептида и ацетилгексапептида.

Методика расчета. Расчет гексапептида проведен с использованием атом-атомных потенциальных функций. Учитывались следующие составляющие энергии: а) взаимодействие между валентно не связанными атомами— $E_{нев}$; б) электростатическое взаимодействие атомов— $E_{эл}$; в) образование водородной связи— $E_{нс}$; г) торсионный вклад— $E_{тор}$

$$E_{об} = E_{нев} + E_{эл} + E_{нс} + E_{тор}$$

Для расчета энергии невалентных взаимодействий использован потенциал Lennard-Jones [6] с параметрами Scott, Scheraga [7]. Геометрические параметры основной цепи аминокислотных остатков аналогичны приведенным в литературе [8]. Геометрические параметры боковых цепей даны в исследовании Scott, Scheraga [7]. Парциальные заряды атомов для расчета электростатической энергии взяты из работы Poland, Scheraga [9]. Электростатическая энергия рассчитывалась

по закону Кулона. Пролинное кольцо предполагалось плоским [10]. Конформационные состояния молекулы исследовали применительно к условиям полярной среды. В связи с этим величина диэлектрической постоянной принята равной 10 [11]. Оценка энергии водородной связи производилась по потенциалу Lennard-Jones с параметрами A_{OH} и B_{OH} , вычисленными по предложенным Poland, Scheraga [9] эмпирическим формулам. Параметры для расчета A_{OH} и B_{OH} подобраны таким образом, чтобы рассчитанная по ним энергия водородной связи соответствовала экспериментальным данным, полученным для водных растворов [12]. Торсионные потенциалы и величины барьеров взяты из работы Scheraga [13].

Поиск минимума потенциальной энергии осуществлялся по первым производным. Помимо общей энергии E_0 рассчитывали энер-

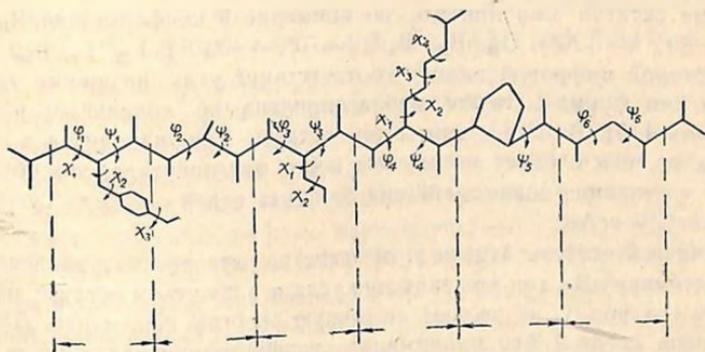


Рис. 1. Схема расчленения ацетилированной формы гексапептида и варьируемые переменные

гии взаимодействий основных (b) и боковых (s) цепей о статков: $b_i - b_j$, $b_i - s_j$ и $s_i - s_j$, а также энергии межостаточных взаимодействий; так, E_2^3 означает энергию взаимодействия второго и третьего остатков. Способ разбienia пептидной цепи и варьируемые переменные приведены на рис. 1, на котором модель молекулы представлена в развернутой конформации (транс), в которой углы $\varphi(N-C^{\alpha})$ и $\psi(C^{\alpha}-C^{\beta})$ равны 180° . Расчет углов находится в согласии с международной номенклатурой [14].

Учитывая сравнительную простоту молекулы, на первом этапе был рассчитан ацетилтетрапептид $CH_3CO-Tyr-Gly-Leu-Arg$, в котором фиксирован в определенной конформации остаток Arg (см. ниже), а затем весь гексапептид с учетом возможных конформаций конечного дипептида $Pro-Gly-NH_2$ и 12 конформаций Arg в формах В и L.

$CH_3CO-Tyr-Gly-Leu-Arg$. Исходные конформации (нулевые приближения аминокислотных остатков взяты из расчетов соответствующих метиламидов-N-ацетил- α -аминокислот [15—17]. Для остатка Gly учитывались 4 оптимальные формы: R ($\varphi=100^\circ$, $\psi=125^\circ$), В ($\varphi=75^\circ$, $\psi=240^\circ$), L ($\varphi=260^\circ$, $\psi=230^\circ$), P ($\varphi=270^\circ$, $\psi=102^\circ$) [20].

Конформации остатка Туг, кроме углов вращения основной цепи, задаются также углами вращения боковой цепи χ_1 и χ_2 . Угол χ_1 может принимать значения 60° , 180° и 300° , а χ_2 — только 90° [16]. Для остатка Туг формы R и В предпочтительнее формы L. Так, энергия конформации L остатка Туг для любых значений χ_1 уступает лучшей конформации Туг 1,5—3,0 ккал/моль. Более того, в рассматриваемом фрагменте остаток Туг в состоянии L не участвует в каких-нибудь дополнительных взаимодействиях, которые могли бы благоприятствовать реализации этой формы. Таким образом, для остатка Туг учитывается 6 конформационных состояний. Если допустимые углы вращения 60° , 180° и -60° в боковой цепи обозначить идентификаторами 1, 2, 3 соответственно, то эти конформации можно записать так: R_1, R_2, R_3 ($\varphi=65^\circ, \psi=130^\circ$), B_1, B_2, B_3 ($\varphi=60^\circ, \psi=340^\circ$). Отметим, что значения 180° и 300° для χ_1 предпочтительнее, чем 60° [16].

Для остатка Leu принято во внимание 9 конформеров: R_{22}, R_{32}, R_{33} ($\varphi=80^\circ, \psi=120^\circ$), B_{22}, B_{32}, B_{33} ($\varphi=70^\circ, \psi=310^\circ$), L_{22}, L_{32}, L_{33} ($250^\circ, 240^\circ$). Второй цифровой индекс соответствует углу вращения χ_2 . Для остатка Leu форма L также неблагоприятна по локальным взаимодействиям [15]. Вместе с тем, если остаток Leu находится в состоянии L, то, как следует из расчета всего олигопептида, это обуславливает улучшение взаимодействия боковых цепей остатков Туг с Leu, а также Gly с Arg.

Концевой остаток Arg на этом этапе расчета рассматривался только в состоянии «В», так как значения угла φ в концевом остатке, определяющие его форму, не влияют на общую энергию фрагмента. Для боковой цепи остатка Arg принималась конфигурация транс ($\chi_1 = 180^\circ$), то есть остаток Arg был представлен конформером B_{2222} .

Прежде, чем перейти к рассмотрению взаимодействий на дипептидных звеньях, отметим, что конформации дипептидов распадаются на две формы: свернутые (RR, RB, LL, LP, BL, BP, PB, PR) и развернутые (BB, BR, RL, RP, LB, LR, PL, PP) [21]. Эти формы обозначаются, соответственно, символами «f» и «e».

Анализ взаимодействий на ди- и трипептидных фрагментах показывает, что на фрагментах Туг-Gly и Gly-Leu существенный вклад в общую энергию вносят взаимодействия боковых цепей Туг и Leu с основной цепью Gly, то есть вклады s_1-b_2 и $b_2-\varepsilon_3$. Так, в случае энергии взаимодействия остатков Туг с Gly (E_1^2) $\sim 85\%$ ее значения приходится на парциальную составляющую s_1-b_2 , то есть она, главным образом, определяется ориентацией боковой цепи Туг и достигает минимального значения при $\chi_1 = 180^\circ$, когда боковая цепь направлена к С-концу основной цепи. Для звена Туг-Gly наиболее выгодна форма RR, для которой E_1^2 на ~ 2 ккал/моль ниже по сравнению с формами BP, BR, RB и BB.

В зависимости от формы дипептида Gly-Leu и ориентации боковой цепи Leu величина вклада E_2^3 колеблется от $-1,8$ до $-0,8$ ккал/моль. Ясно, что $E_2^3 = -1,8$ для конформации BB_{33} , когда боковая цепь Leu с $\chi_1 = 300^\circ$ ориентирована в сторону Gly, а $E_2^3 = -0,8$ для конформации

RR₂₂ с боковой цепью остатка Leu ($\chi_1 = 180^\circ$), не ориентированной в сторону Gly. Отсутствие боковой цепи у остатка Gly также не способствует возникновению дополнительных взаимодействий, столь характерных между боковыми цепями формы RR. Промежуточной по энергии для динептидного звена Gly-Leu является конформация RR₃₃ с $E_1^3 = -1,2$ ккал/моль.

В случае взаимодействия остатков Tug и Leu энергия E_1^3 зависит не только от их формы и взаимной ориентации их боковых цепей, но и от конформации промежуточного остатка Gly. В зависимости от конформации остатка Gly в это взаимодействие существенный вклад может вносить одна из 4 составляющих энергии ($b_1-s_3, s_1-b_3, s_1-s_3, b_1-b_3$). Например, s_1-s_3 существенно для развернутых форм eef и eee, поскольку боковые цепи Tug и Leu в этом случае расположены по одну сторону от основной цепи и разделенные только одним остатком достаточно хорошо взаимодействуют друг с другом; так, для формы BBRE₁³ = -4,3; BBV-E₁³ = -3,8 BKL-E₁³ = -3,3; RPL-E₁³ = -3,7, RLB-E₁³ = -3,1. Взаимодействие b_1-s_3 характерно для формы fef и fee при взаимно благоприятной ориентации боковых цепей Tug и Leu. В зависимости от ориентации боковых цепей остатков энергии межостаточных взаимодействий различаются в пределах конформаций одной формы. В табл. 1 приведены самые низкоэнергетические конформации в пределах каждой формы и энергии взаимодействия остатков Tug с Gly (E₁³), Gly с Leu (E₂³) и Tug и Leu (E₃³). Для ацетилтетрапептида выгодными являются ориентации боковой цепи Tug при $\chi_1 = 180^\circ$ и 300° . Напротив, для тетрапептида в большинстве случаев для χ остатка Tug предпочтительно значение 180° . Это понятно, так как в случае $\chi_1 = 300^\circ$ его боковая цепь была бы ориентирована в сторону, противоположную от молекулы, не вступая с ней в стабилизирующие контакты.

Таблица 1

Возможные формы и конформации ацетилтетрапептида в пределах 4 ккал/моль

Форма	Конформация	E ₀₆	E ₁ ²	E ₂ ²	E ₁ ³	Форма	Конформация	E ₀₆	E ₁ ²	E ₂ ²	E ₁ ³
eef	B ₂ BR ₂₂ B	-13,1	-3,1	-1,0	-3,3	fff	B ₂ PR ₂₃ B	-14,2	-2,7	-1,1	-1,7
	R ₂ LR ₂₂ B	-10,7	-1,9	-1,0	-2,6		R ₂ RR ₂₃ B	-11,8	-1,5	-1,0	-1,2
eee	B ₃ BB ₃₃ B	-12,8	-1,4	-1,7	-3,8	ffe	B ₂ PB ₃₃ B	-13,0	-2,5	-1,7	-1,8
	B ₃ RL ₃₃ B	-10,5	-1,3	-0,9	-3,2		B ₁ LL ₃₃ B	-12,8	-1,7	-0,7	-0,6
	R ₃ LB ₃₃ B	-10,4	-0,8	-1,6	-3,1		R ₃ BL ₃₂ B	-10,6	-1,0	-0,8	-1,3
	R ₃ PL ₃₃ B	-10,7	-1,0	-1,0	-3,7		R ₂ RB ₃₂ B	-12,0	-1,9	-2,0	-0,8
efe	B ₃ PL ₃₃ B	-10,7	-1,0	-1,0	-3,7	fee	B ₂ PL ₃₃ B	-11,9	-2,4	-1,0	-3,1
	R ₃ BL ₃₂ B	-12,1	-1,4	-0,5	1,3		B ₂ LB ₃₃ B	-11,8	-2,3	-1,6	-2,3
	B ₃ RR ₃₃ B	-13,3	-1,2	-1,7	-1,1		R ₂ BB ₃₃ B	-12,7	-2,0	-1,8	-2,6
	R ₃ PB ₃₃ B	-14,0	1,0	1,6	-1,9		R ₂ RL ₃₃ B	-10,3	-1,9	-0,7	-2,0
eff	R ₃ LL ₃₃ B	-12,0	-0,7	0,7	-0,6	fef	R ₂ BR ₃₃ B	-13,3	-2,0	-1,7	-2,7
	B ₃ RR ₂₂ B	-13,7	2,1	-0,9	-1,7		B ₂ LR ₃₃ B	-12,0	-2,4	-1,3	-2,3
	R ₃ PR ₂₂ B	-12,7	0,8	-1,2	1,3						

Как уже отмечено выше, остаток Arg был зафиксирован в одной из конформаций, поэтому его роль на этом этапе выяснена неполностью. Однако, как показывает анализ, взаимодействия с его участием могут быть существенными. Так, для некоторых форм efc особенно выде-

ляется взаимодействие Arg с Tyr (E_1^4): для формы BBL $E_1^4 = -4,4$; RPB— $E_1^4 = -4,4$; BRB— $E_1^4 = -3,9$ ккал/моль. В этих контактах доминирует взаимодействие боковых цепей s_1-s_4 .

Как по энергии, так и по числу низкоэнергетических форм наиболее предпочтительными оказались свернутые формы. В тех формах, в обозначении которых преобладает символ \bar{i} , общая энергия лучше, но равномерно распределена по парциальным составляющим. В развернутых формах, в обозначении которых преобладает символ e , дополнительные взаимодействия более ясно выражены. В спиральной форме обычно доминируют взаимодействия между соседними остатками. Эти замечания, возможно, кроме формы \bar{iii} , не универсальны. Они зависят от конкретной аминокислотной последовательности.

Итак, на первом этапе расчета выделены конформации всех 8 возможных форм, которые и будут учтены в дальнейшем при анализе гексапептидного фрагмента. Эти конформации представлены в табл. 1.

Таблица 2
Возможные формы и конформации ацетилгексапептида в пределах 6 ккал/моль.

Форма	Конформация	E_{06}	Форма	Конформация	E_{06}
eefee	$B_2BR_{23}B_{323}RP$	-21,1	eefef	$B_2BR_{23}B_{323}RB$	-21,8
ceeee	$B_2BB_{13}B_{331}RP$	-22,4	eecef	$B_2BB_{13}B_{331}RR$	-20,7
	$B_2BR_{22}L_{323}RP$	-22,1		$B_2BR_{22}L_{323}RR$	-23,0
				$B_2BR_{22}L_{323}RB$	-21,4
eefee	$B_1BL_{32}B_{323}BR$	-15,7	eefef	$B_1BL_{32}B_{323}RR$	-18,3
eiefef	$B_1RR_{22}B_{212}BR$	-20,7	eiefef	$B_1RR_{22}B_{212}RR$	-21,2
ffeee	$B_2PR_{23}L_{323}RP$	-24,5	ffef	$B_2PR_{23}L_{323}RB$	-25,1
	$B_2PR_{23}L_{323}BR$	-22,3		$B_2PR_{23}L_{323}RR$	-24,0
feeee	$R_2BB_{33}B_{331}RP$	-20,8	fecef	$R_2BB_{33}B_{331}RR$	-20,7
				$R_2BB_{33}B_{331}RB$	-21,4
fefee	$R_2BR_{33}B_{323}RP$	-20,2	fefef	$R_2BR_{33}B_{323}RB$	-21,9
				$R_2BR_{33}B_{323}RR$	-20,1
fffee	$R_2RR_{33}B_{2133}BB$	-24,6	ffief	$R_2RR_{33}B_{2133}BL$	-26,1
	$B_2PR_{23}B_{2133}BB$	-24,0		$B_2PR_{23}B_{2133}BL$	-25,4
	$R_2RR_{33}B_{323}RP$	-23,7		$B_1PR_{22}B_{2121}BP$	-24,9
	$R_2RR_{33}B_{2123}BR$	-23,4		$R_2RR_{33}B_{323}RB$	-24,0
	$B_2PR_{23}B_{2133}BR$	-22,4		$B_1PR_{22}B_{323}RB$	-23,2
				$R_2RR_{33}B_{323}RR$	-22,4
				$B_1PR_{22}B_{331}RR$	-21,9

$CH_3CO-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2$. Как известно, остаток Pro не только сам является конформационно жестким [13, 18], но и значительно ограничивает подвижность предшествующего ему остатка, поэтому для такой пары остатков предпочтительными оказываются развернутые формы [19]—e. С учетом этого для остатка Arg выбраны конформации только форм В и L. Если принять во внимание две формы С-концевого дипептида Pro-Gly—e (BB) и f (RB), то для всей молекулы с учетом 8 отобранных для тетрапептидного фрагмента форм рассмотрена 16. В свою очередь их можно разбить на 2 группы (табл. 2), энергетически самых выгодных конформаций в пределах 6 ккал/моль. Из их сравнения видно, что некоторым преимуществом обладают фор-

мы, в обозначении которых последним приходится символ *f*, то есть при условии свернутых форм концевого дипептида. Схематическое изображение основной цепи этих 8 форм приведено на рис. 2.

В табл. 3 показано распределение 16 возможных конформаций по энергии. Видно, что по обоим показателям наиболее выгодными оказались 4 формы *ffice*, *fffef* и *ffeee*. Эти формы на тетрапептидном фрагменте соответствуют формам *fff* и *ffe*, которые также были наиболее предпочтительны по обоим показателям; в то же время формы *efe* и *efi* становятся энергетически менее выгодными.

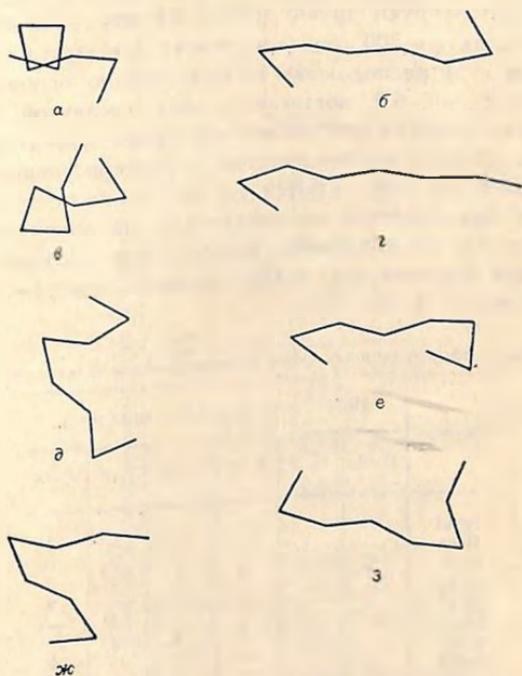


Рис. 2. Формы конформационных состояний ацетилгексапептида:
a—*fffef*, *б*—*ffeee*, *в*—*effef*, *з*—*eeef*, *д*—*fefef*, *е*—*ffef*, *ж*—*cefef*, *з*—*ceef*.

Таким образом, для гексапептидного фрагмента предпочтительными оказываются свернутые формы. При этом определяющее значение имеет взаимодействие E_4^5 — между остатками Tu_4 и Pro_5 , именно между их боковыми цепями— S_1-S_5 . Однако оно реализуется, когда звено, разделяющее эти остатки Gly-Leu, находится в форме *RV* или *RR*. Выигрыш по энергии составляет 4 ккал/моль по сравнению с формой *PR*: такое сильное взаимодействие возникает благодаря расположению колец Tu_4 и Pro_5 друг над другом на расстоянии ван-дер-ваальсовых радиусов. Ясно, что оно возможно между столь удаленными остатками только для свернутых форм *fffef*, *ffice*, *ffef* и *ffeee*. Рассмотрим дополнительные

взаимодействия, в которые вступают остатки Arg, Pro и Gly. В зависимости от конформации основной цепи и ориентации боковых цепей контакты могут быть классифицированы по энергии на эффективные, средние и неэффективные. Так, если и конформация основной цепи, и ориентация боковых цепей неблагоприятны для рассматриваемых остатков, их взаимодействие будет неэффективным. Например, для звена Leu-Arg конформация $V_{33}V_{3311}$ приводит к энергии взаимодействия между остатками Leu и Arg $E_3^4 = -4,2$. Для данного взаимодействия это значение энергии довольно высокое по следующим причинам: а) при форме основной цепи VV боковые цепи расположены по разные стороны от основной и плохо контактируют друг с другом, б) при такой ориентации боковых цепей, когда $\chi_1 = 300^\circ$, они «догоняют» друг друга и дают плохие контакты, даже если расположены по одну сторону основной цепи. Минимум энергии $E_3^4 = -6,8$ достигается для свернутой конформации $R_{22}V_{3311}$, которая удовлетворяет обоим критериям эффективного взаимодействия. Для среднего взаимодействия, характеризующегося промежуточной величиной энергии, имеются две возможности: 1) конформация основной цепи благоприятна, но неблагоприятна ориентация боковых цепей, как в случае конформации $R_{33}V_{3323}$, для которой $E_3^4 = -5,1$, 2) конформация основной цепи неблагоприятна при удачной ориентации боковых цепей.

Таблица 3
Распределение конформационных форм гексапептидного фрагмента по энергии

Форма	Интервалы энергии в ккал/моль					
	0-1	1-2	2-3	3-4	4-5	5-6
feef	—	—	—	—	1	1
fi fee	—	1	6	6	9	6
iffef	2	4	9	4	4	2
feeee	—	—	—	—	—	—
ifeef	1	2	3	4	3	1
ffeee	—	2	1	4	2	—
fefef	—	—	—	—	—	2
fefef	—	—	—	—	—	1
cefef	—	—	—	—	1	1
eefee	—	—	—	—	1	1
eeef	—	—	—	3	2	1
eeeee	—	—	—	2	1	—
effef	—	—	1	2	2	2
cifef	—	—	—	—	4	—
cifeef	—	—	—	—	—	—
cfeef	—	—	—	—	—	—

Когда анализируются взаимодействия остатков с боковыми цепями, возникает проблема конкуренции отдельных энергетических вкладов: если улучшается взаимодействие с соседним остатком справа, то ухудшается взаимодействие с остатком слева и наоборот. Например, для энергии взаимодействия Arg с Pro $E_4^5 = -6,0$ энергия взаимодействия Leu с Arg $E_3^4 = -1,9$, а при $E_4^5 = -0,8$ $E_3^4 = -6,5$ ккал/моль. Взаимодей-

Таблица 1

Отобранные конформации ацетилгексанпептида

Конформация	Tyr				Gly		Leu				Arg						Pro	Gly			E, δ
	φ	ψ	χ ₁	χ ₂	φ	ψ	φ	ψ	χ ₂	χ ₂	φ	ψ	χ ₁	χ ₂	χ ₃	χ ₄	ψ	φ	ψ		
R ₂ RR ₃₃ B ₂₁₃₃ BL	-129	-54	183	88	-48	-39	-87	-50	299	345	-127	86	179	69	275	289	111	83	59	-26,1	
B ₂ PR ₂₃ B ₂₁₃₃ BL	-157	151	182	86	76	-70	-83	-49	182	321	-119	91	180	71	271	269	117	86	60	-25,4	
B ₁ PR ₂₂ B ₂₁₂₁ BP	-160	166	60	91	76	-72	-91	-52	176	215	-113	142	182	67	173	77	114	75	-70	-21,9	
R ₂ RR ₃₃ B ₂₁₃₃ BB	-129	-55	182	83	-49	-39	-84	-51	299	346	-127	87	181	70	273	289	116	-77	66	-24,6	
B ₂ PR ₂₃ B ₂₁₃₃ BB	-158	151	182	86	76	-73	-85	-51	182	321	-122	91	180	71	272	289	116	-77	66	-24,0	
R ₂ RR ₃₃ B ₃₃₂₂ RP	-128	-55	185	88	-47	-39	-84	-50	297	343	-133	95	298	290	183	281	-48	76	-71	-23,7	

концевых остатков Pro и Gly малосущественны, но также зависят от формы этого дипептида. Так, при одной и той же развернутой форме основной цепи предпочтительнее форма RP с энергией $E_3^6 = -1,7$, но не BR ($E_3^6 = -0,9$).

Таким образом, в пределах 5 ккал/моль наиболее представительными низкоэнергетическими конформациями оказываются принадлежащие к 4 формам: $iiifei$, $iffee$, $ifees$ и $iffee$. Учитывая то обстоятельство, что остаток Arg чрезвычайно редко встречается в белках в форме L, можно остановиться на 2 формах $iiifei$ и $iffee$ и предложить несколько возможных их представителей (табл. 4), лучшим из которых является конформация формы $iiifei-R_2RR_{33}B_{2133}BL$. Эта конформация характеризуется эффективными взаимодействиями остатков Arg с Pro и Gly, Tyr с Arg и Pro.

Различие между гексапептидом и его ацетилированным производным в конформационном отношении сводится к тому же, чем тетрапептид отличается от ацетилтетрапептида, то есть если в случае гексапептида для остатка Tyr предпочтительно значение $\chi_1 = 180^\circ$, то в случае ацетилгексапептида возможны два значения $\chi_1: 180^\circ$ и 300° . Не имея существенного значения для конформационных особенностей нативных молекул, это различие может сказаться на векторных характеристиках процессов, в которых они принимают участие, особенно если учесть, что от выбора χ_1 остатка Tyr может зависеть ориентация ацетильной группы, а следовательно, и ее роль в рецепторно-акцепторном взаимодействии.

CONFORMATIONAL ANALYSIS OF HYPOTHALAMIC CARDIOACTIVE HEXAPEPTIDE AND ITS ACETYL DERIVATIVE

AVANOV A. J., LIPKIND G. M.

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

N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, USSR Academy
of Sciences, Moscow

A comparison of the conformational states of these two energetically optimal forms is carried out, and a supposition about the possible reason of acetylhexapeptide being more effective is discussed.

ЛИТЕРАТУРА

1. Галоян А. А., Хумарян Н. Г., Ханазадян А. Х. ДАН АрмССР, 65, 5, 1977.
2. Хумарян Н. Г., Ханазадян А. Х., Баев В. В., Галоян А. А. Ж. exper. и клинич. мед., 18, 5, 1968.
3. Галоян А. А., Абелян Ж. Г., Баев В. В., Тер-Татевосян Л. П., Парсадян Г. К. Вопросы мед. химии, 3, 285, 1979.
4. Галоян А. А., Кириковская А. С., Манджикян С. ДАН АрмССР, X, 189, 1975.
5. Галоян А. А. Вопросы биохимии мозга, Изд-во АН АрмССР, Ереван, XIII, 9, 1979.
6. Lennard-Jones J. Physica, 4, 941, 1937.
7. Scott R. A., Scheraga H. A. J. Chem. Phys., 45, 2091, 1966.
8. Громов Э. П. Канонические формы фрагментов олигопептидных молекул. Расчет циклодексапептида антаминада. Канд. дис., М., 1976.
9. Poland D., Scheraga H. A. Biochemistry, 6, 3791, 1967.

10. Ponnuswamy P. K., Mc Guire R. F., Scheraga H. A. *Int. J. Peptide and Protein Res.*, 5, 73, 1973.
11. Липкинд Г. М., Архипова С. Ф., Попов Е. М. *Ж. структ. химии*, 11, 121, 1970.
12. Klotz T. M., Fransen I. S. J. *Amer. Chem. Soc.*, 84, 3161, 1962.
13. Scheraga H. A. *Adv. Phys. Org. Chem.*, 6, 103, 1968.
14. IURAC—IUB Commission on Biochemical nomenclature. Recommendation. *Biochem-et biophys. acta*, 229, 1, 1971.
15. Максумов Н. С., Архипова С. Ф., Липкинд Г. М., Попов Е. М. *Химия природных соединений*, 2, 211, 1975.
16. Липкинд Г. М., Архипова С. Ф., Попов Е. М. *Изв. АН СССР, Сер. хим.* 2, 315, 1970.
17. Жоров Б. С., Попов Е. М., Говырин Б. А. *Мол. биол.*, 9, 710, 1975.
18. Попов Е. М., Липкинд Г. М., Архипова С. Ф., Дашевский В. Г. *Мол. биол.*, 2, 622, 1968.
19. Shimmel P. R., Flory P. J. *J. Mol. Biol.* 34, 105, 1968.
20. Липкинд Г. М., Архипова С. Ф., Попов Е. М., *Мол. биол.*, 4, 331, 1970.
21. Мельников П. И., Ахмедов Н. А., Липкинд Г. М., Попов Е. М. *Биоорг. химия*, 2, 28, 1976.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван
 Институт органической химии
 им. Н. Д. Зелинского АН СССР, Москва

Поступила 16. XI 1982

УДК 612.826+591.147.4+577.17

СЕРОТОНИН В ГИПОТАЛАМИЧЕСКОМ МЕХАНИЗМЕ РЕГУЛЯЦИИ СЕКРЕЦИИ ПРОЛАКТИНА И МОЛОКА

АЛИЕВ М. Г., РАГИМОВА Ш. А.

Изучен серотонинергический механизм гипоталамической регуляции образования пролактина и секреции молока с помощью предшественников серотонина 1-триптофана, dl-5-окситриптофана и блокатора синтеза серотонина dl-п-хлорамфетамин. Выявлено, что повышение обмена серотонина в гипоталамусе под действием его предшественников сопровождается снижением концентрации катехоламинов в этой области. При этом повышается содержание пролактина в аденогипофизе и крови, а также количество секретированного молока. Обратная картина выявлена при применении п-хлорамфетамин, то есть при блокировании синтеза серотонина. Стимулирующее действие серотонина на образование и секрецию пролактина, возможно, осуществляется через подавление дофаминергической активности гипоталамуса. Рассматривается значение гипоталамического серотонина в регуляции процесса секреции молока.

Среди многочисленных нейромедиаторов и нейромодуляторов мозга, имеющих отношение к центральной регуляции секреции пролактина, основными являются катехоламины и серотонин. Дофамин обеспечивает тоническое подавление секреции пролактина, непосредственно влияя на пролактинсекретирующие клетки аденогипофиза [1, 2]. Серотонин оказывает стимулирующее действие на выброс пролактина в определенных физиологических условиях, в особенности при сосании. Так, например, блокирование его синтеза подавляет выброс пролактина в кровь в ответ на сосание [3]. На основании многочисленных исследований создано представление о том, что серотонин прямого влияния на аденогипофиз не оказывает [4—6]. Следовательно, в стимулирующем действии серотонина на выброс пролактина требуется включение какого-то промежуточного гипоталамического звена. Выяснению действия гипоталамического серотонина в механизме образования и секреции пролактина посвящена данная работа.

Материалы и методы

В связи с поставленной задачей создавались экспериментальные модели повышенного и пониженного содержания серотонина в мозгу, в частности в гипоталамусе лактирующих белых крыс. Было проведено 3 серии опытов с применением предшественников серотонина: 1-триптофана (150 мг/кг, перорально), dl-5-окситриптофана (30 мг/кг, в/б) и блока-

тора синтеза серотонина: dl-п-хлорамфетамингидрохлорида (5 мг/кг, в/б, 2 раза, через 5 дней). Препараты вводили в течение 10 дней. Крыс декапитировали на 5- и 10-й день введения препаратов. Кровь для определения пролактина в сыворотке брали при декапитации. Содержание катехоламинов—дофамина и норадреналина—и оксиацетов—серотонина и 5-оксииндолилуксусной кислоты (5-ОИУК)—в гипоталамусе определяли флуориметрически на спектрофлуориметре «Hitachi» [7]. Концентрацию пролактина в аденогипофизе определяли микрометодом электрофореза в ПААГ с последующей спектрофотометрией на СФ-16 [8], а уровень пролактина в сыворотке крови устанавливали радиоиммунологически на автоматическом гаммаспектрометре «Packard» с тетапипом. Количество секретированного молока определяли методом отсадки крысят на 6 ч, по разнице их массы до и после 30-минутного сосания. Полученные данные обработаны статистически [9].

Результаты и обсуждение

Используя предшественники серотонина или блокатор его синтеза, удалось воздействовать на метаболизм серотонина в гипоталамусе (таблица). Эти сдвиги сохранились на всем протяжении опыта, хотя изменения некоторых показателей были более заметны на 10-й день введения препарата, нежели на 5-й.

Пероральное введение l-триптофана значительно увеличивало в гипоталамусе содержание серотонина и его метаболита—5-ОИУК. По сравнению с контролем под действием триптофана концентрация серотонина в гипоталамусе повысилась на 70,8—96,9%, а содержание 5-ОИУК на 28,0—51,1% соответственно на 5- и 10-й день применения препарата. При этом была достоверно снижена концентрация дофамина на 5-й, а норадреналина на 10-й день введения препарата.

Указанные сдвиги в метаболизме серотонина и катехоламинов под действием триптофана отразились на уровне содержания пролактина в аденогипофизе. По сравнению с контрольными у крыс опытной группы, получавших триптофан, содержание пролактина в аденогипофизе увеличивалось на 44 и 70% соответственно на 5- и 10-й день применения препарата (рис. 1), а уровень выброса пролактина в кровь возрастал в среднем до 145,7% (рис. 2). Увеличение образования и секреции пролактина способствовало стимуляции секреции молока, повышающейся под действием l-триптофана по сравнению с контрольной группой на 29,2 и 79,9% на 5- и 10-й день введения препарата соответственно (рис. 3).

Во второй серии опытов применяли другой предшественник серотонина—dl-5-окситриптофан и получили результаты, аналогичные первой серии, в метаболизме моноаминов в гипоталамусе, образовании и секреции пролактина. Характерно, что на 5-й день применения 5-окситриптофана сдвиги в изучаемых показателях проявляются более заметно по сравнению с применением триптофана, что вполне естественно, так как путь синтеза серотонина от него более короткий, нежели син-

тез серотонина от 1-триптофана. Под действием 5-окситриптофана в гипоталамусе достоверно увеличилось содержание серотонина—на 77,6 и 71% и 5-ОИУК на 96,6 и 58,7% по сравнению с контролем соответственно на 5- и 10-й день опыта. В этих же условиях достоверно снизилась концентрация дофамина на 5-й и норадреналина на 10-й день введения препарата.

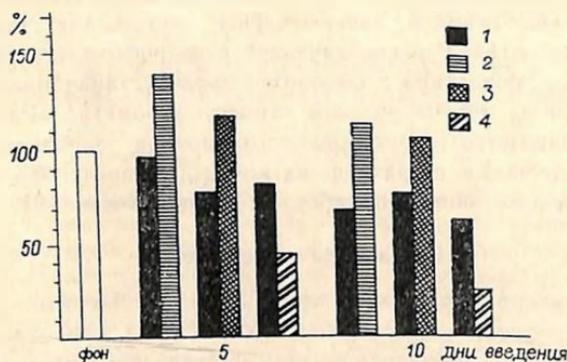


Рис. 1. Изменение содержания пролактина в аденогипофизе под влиянием различных препаратов: 1—контроль, 2—1-триптофан, 3—dl-5-окситриптофан, 4—dl-п-хлорамфетамин

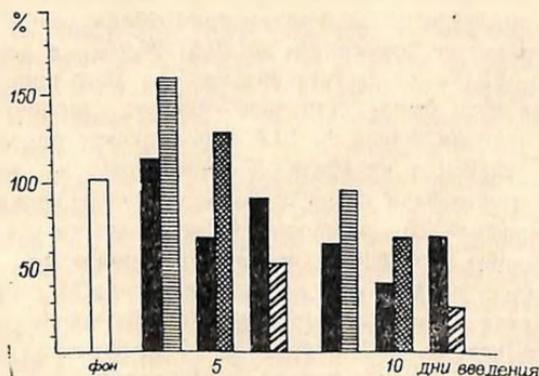


Рис. 2. Изменение содержания пролактина в крови под влиянием различных препаратов (обозначения те же, что и на рис. 1)

Резкое увеличение содержания серотонина и заметное снижение концентрации катехоламинов в гипоталамусе оказали стимулирующее влияние на образование пролактина в аденогипофизе и секрецию его в кровь. Повысилось содержание пролактина в аденогипофизе на 51,4 и 37,9% (рис. 1), а его уровень в крови поднялся на 92,9 и 68,2% (рис. 2) по сравнению с контрольной группой животных соответственно на 5- и 10-й дни опыта. Повышение синтеза и секреции пролактина под

Таблица

Влияние l-триптофана, dl-5-окситриптофана и dl-п-хлорамфетамина на содержание моноаминов в гипоталамусе ($\mu\text{г}/\text{г}$)

Моноамины гипоталамуса	5-й день введения				10-й день введения			
	контроль	l-триптофан	5-окситриптофан	dl-п-хлорамфетамин	контроль	l-триптофан	5-окситриптофан	dl-п-хлорамфетамин
Серотонин	844 \pm 41	1442 \pm 94 $p < 0,001$	1500 \pm 142 $p < 0,001$	458 \pm 18 $p < 0,001$	831 \pm 47	1636 \pm 216 $p < 0,01$	1421 \pm 83 $p < 0,001$	520 \pm 14 $p < 0,001$
5-ОИУК	533 \pm 15	682 \pm 31 $p < 0,001$	1048 \pm 38 $p < 0,001$	348 \pm 36 $p < 0,001$	304 \pm 16	459 \pm 0 $p < 0,01$	482 \pm 60 $p < 0,02$	225 \pm 21 $p < 0,01$
Дофамин	562 \pm 38	448 \pm 18 $p < 0,02$	379 \pm 59 $p < 0,02$	1102 \pm 123 $p < 0,001$	608 \pm 30	547 \pm 40 $p < 0,5$	550 \pm 19 $p < 0,2$	1095 \pm 110 $p < 0,01$
Норадреналин	514 \pm 61	474 \pm 21 $p < 0,5$	405 \pm 75 $p < 0,2$	1034 \pm 105 $p < 0,01$	601 \pm 66	225 \pm 24 $p < 0,01$	332 \pm 53 $p < 0,05$	1076 \pm 142 $p < 0,02$

Примечание. p—достоверность различий показателей с контролем

действием 5-окситриптофана оказало стимулирующее влияние на секрецию молока, которая за опытный период повысилась в среднем на 36,3% по сравнению с контролем (рис. 3).

Следовательно, применение предшественников серотонина, повышая содержание последнего в гипоталамусе, заметно снижает в нем концентрацию катехоламинов, что способствует резкому усилению синтеза и секреции пролактина, а это, в свою очередь, стимулирует секрецию молока.

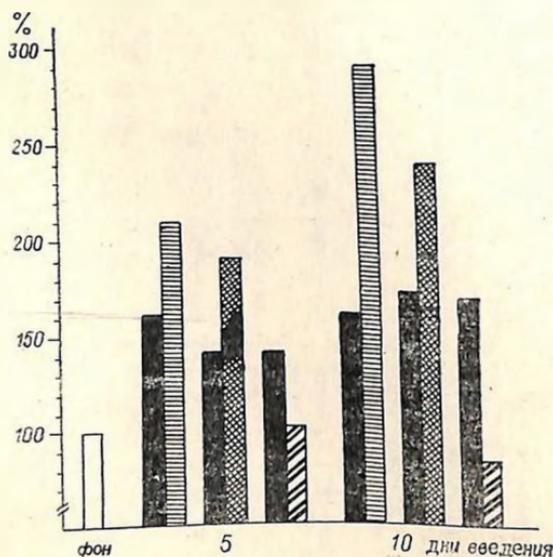


Рис. 3. Влияние 1-триптофана, dl-5-окситриптофана и dl-п-хлорамфетамина на количество секретированного молока (обозначения те же, что и на рис. 1)

В отличие от первых двух серий в третьей применили блокатор синтеза серотонина dl-п-хлорамфетамин. При этом отмечалось достоверное снижение в гипоталамусе концентрации серотонина—на 45,8 и 37,4% и 5-ОИУК—на 34,7 и 25,9% по сравнению с контролем соответственно на 5- и 10-й день опыта. Одновременно в гипоталамусе подопытных крыс значительно повышалась концентрация дофамина и норадреналина—в среднем на 88 и 84,5% соответственно (таблица), что тормозило синтез и секрецию пролактина. Содержание пролактина в аденогипофизе под действием dl-п-хлорамфетамина снижалось на 44,7% на 5-й день опыта, а на 10-й эта разница с контролем была еще большей—61,7% (рис. 1). Выброс пролактина в кровь подавлялся на 45,3 и 64,1% соответственно на 5-й и 10-й дни опыта (рис. 2), что привело к заметному снижению под действием dl-п-хлорамфетамина секреции молока (рис. 3).

Источником гипоталамического серотонина, стимулирующего секрецию пролактина, являются серотонинергические нейроны дорсальных и центральных верхних ядер шва, аксоны которых иннервируют гипоталамус [10, 11]. Высокая концентрация серотонина обнаружена в аркуатных, супрахиазматических и преамиллярных ядрах гипоталамуса [12]. От аркуатного ядра начинается тубероинфундибулярный дофаминергический (ТИД) путь, состоящий из коротких нейронов, терминали которых расположены в наружном слое срединного возвышения и тесно контактируют с капиллярами гипофизарных портальных сосудов [13].

В наших опытах длительная фармакологическая активация серотонинсодержащих структур гипоталамуса, выражающаяся в увеличении концентрации серотонина и его метаболита 5-ОИУК, сопровождалась значительным снижением содержания дофамина и норадреналина в этой области, тогда как при угнетении d¹-п-хлорамфетаминном синтеза серотонина, одновременно со спадом концентрации серотонина и 5-ОИУК, наблюдался подъем уровня катехоламинов в гипоталамусе (таблица).

Аналогичная закономерность обнаруживалась нами ранее при применении веществ, блокирующих рецепторы дофамина—при этом снижении концентрации катехоламинов в гипоталамусе приводило к повышению уровня серотонина [14].

Такие противоположные изменения в обмене серотонина и катехоламинов в гипоталамусе с учетом морфофункциональной взаимозависимости соответствующих структур можно объяснить механизмом реципрокных взаимоотношений между катехоламинергическими и серотонинергическими системами мозга, благодаря чему снижение активности одной системы сопровождается повышением активности другой и наоборот [15].

Важность серотониновой иннервации гипоталамуса в регуляции секреции пролактина у лактирующих животных показана экспериментами, в которых определялось содержание серотонина в различных областях мозга во время сосания. Через несколько минут после начала сосательного стимула параллельно с резким повышением концентрации пролактина в плазме увеличивался обмен серотонина в гипоталамусе и оставался повышенным на всем протяжении сосания. При этом в других областях мозга концентрация серотонина не изменялась [16], и наоборот, ингибирование биосинтеза серотонина п-хлорфенилаланином способствовало блокаде подъема пролактина в крови в ответ на сосание [3]. Установлено уменьшение высвобождения дофамина в сосуды ножки гипофиза в период сосания и показано, что концентрация дофамина в гипофизарной портальной крови значительно снижалась во время стимуляции нервного ствола молочной железы; при этом концентрация пролактина в крови увеличивалась почти 7-кратно [17]. Интересны факты, полученные некоторыми исследователями, о том, что исключение дофаминергического звена путем подавления синтеза доф-

амина или блокирования его рецепторов предотвращало действие центрального серотонина в активировании секреции пролактина [18].

Суммируя и сопоставляя литературные данные с нашими исследованиями, можно заключить, что повышение активности серотонинергических нервных структур гипоталамуса (во время сосания, во сне или фармакологически) в силу реципрокных взаимоотношений снижает дофаминергическую активность гипоталамуса; таким образом, снимается (или уменьшается) тормозящее влияние дофамина на пролактинсекретирующие клетки аденогипофиза, что приводит к быстрому уменьшению гипофизарных запасов пролактина с выбросом его в кровь.

Сведений о влиянии серотонина на синтез пролактина в литературе нами не обнаружено. Косвенным показателем уровня биосинтеза пролактина является его содержание в аденогипофизе с учетом выброса в кровь. Хроническая серотонинергическая стимуляция способствовала значительному увеличению пролактина в аденогипофизе (рис. 1). Учитывая роль серотонинергического звена в выбросе пролактина в кровь и то, что серотонин сам оказывает [4, 6], можно полагать, что такое повышение является вторичным и происходит в ответ на хроническое увеличение выброса пролактина в кровь. Это подтверждают и опыты с применением dl-п-хлорамфетамин, когда подавление активности серотонинергического звена уменьшает секрецию пролактина, способствуя перестройке пролактинсекретирующих клеток на более низкий уровень синтеза гормона (рис. 1).

Выявлена прямая зависимость между интенсивностью обмена мозгового серотонина и количеством секретированного молока (рис. 3). Подобная взаимосвязь осуществляется, по крайней мере, двумя путями: секрецией пролактина и выбросом окситоцина, действующих на разные этапы цикла молокообразования—секрецию молока и молокоотдачу. Немедленный выброс пролактина и окситоцина в ответ на сосание—общепризнанный факт. Торможение синтеза серотонина п-хлорфенилаланином блокирует выброс в ответ на сосание не только пролактина, но и окситоцина [19, 20], из чего можно заключить, что серотониновое звено необходимо для рефлексов, усиливающих секрецию как пролактина, так и окситоцина.

Таким образом, комплексный механизм нейроэндокринных изменений в ответ на сосание может быть представлен следующим образом:



Сосательные стимулы (импульсы) через определенные восходящие нейрональные пути в спинном мозгу передаются на серотонинергиче-

ские нейроны ядер шва, иннервирующие гипоталамус; здесь происходит торможение тубероинфундибулярных дофаминовых нейронов с выбросом гипофизарного пролактина в кровь и активация нейросекреторных клеток, продуцирующих окситоцин, с быстрым подъемом его содержания в крови. Последний обеспечивает процесс молокоотдачи, а циркулирующий в крови пролактин, попадая в ткань молочной железы, участвует в запуске нового цикла молокообразования.

INVOLVEMENT OF SEROTONIN IN HYPOTHALAMIC CONTROL OF PROLACTIN AND MILK SECRETION

ALIEV M. H., RAGIMOVA, SH. A.

A. I. Karayev Institute of Physiology, Azerbaijan Academy of Sciences, Baku

The precursors of serotonin-L-tryptophan and DL-5-hydroxytryptophan and the blocator of serotonin synthesis-DL-p-chloramphetamine have used to study the hypothalamic regulation of prolactin and milk secretion.

The metabolism of serotonin in hypothalamus is enhanced due to the application of serotonin precursors and is accompanied by a drop in the level of catecholamines in the area, increase in prolactin concentration both in adenohipophysys and in blood and elevated milk secretion. In the case of p-chloramphetamine the situation is reverse.

It's suggested that the stimulating effect of serotonin on the formation and secretion of prolactin is mediated by suppression of dopaminergic activity in hypothalamus. The role of hypothalamic serotonin in the regulation of milk secretion is discussed.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Ben-Jonathan N. J. *Reprod. Fert.*, 58, 2, 501—512, 1980.
2. Goldsmith P. C., Cronin M. J. *J. Histochem. Cytochem.*, 27, 1205—1207, 1979.
3. Kordon C., Blake C. A., Terkel J., Sawyer C. *Neuroendocrinology*, 13, 213—223, 1973.
4. Birge C. A., Jacobs L. S., Hammer C. T., Daughaday W. H. *Endocrinology*, 86, 120—130, 1970.
5. Kambert J. A., Mical R. S., Porter J. C. *Endocrinology*, 88, 1288—1293, 1971.
6. Lamberts S. W. J., MacLeod R. M. *Endocrinology*, 103, 287—295, 1978.
7. Коган М. Б., Нечаев Н. В. *Лаб. дело*, 5, 301—303, 1979.
8. Курц М., Надь И., Бароняи П. *Проблемы эндокринологии*, XV, 6, 63—39, 1969.
9. Рокицкий П. Ф. *Биологическая статистика*, Минск, Изд-во Высшая школа, 1973.
10. Advois J. P., Simpkins J., W., Bennett J., Meites J. *Life Sci.*, 24, 4, 359—366, 1979.
11. Weiner R. J., Ganong W. F. *Physiol. Rev.*, 58, 4, 914, 1978.
12. Saavedra J. M. *Federation Proc.*, 36, 2134—2141, 1977.
13. Fuxe K., Hokfelt T. *Acta Physiol. Scand.*, 66, 245—246, 1966.
14. Алуца М. Г., Исмаилов Ю. С. *Изв. АН АзССР, Серия биол. наук.*, 1, 99—103, 1981.
15. Громова Е. А. *Эмоциональная память и её механизмы*, М., Наука, 1980.
16. Mena F., Enjalbert A., Carbonell L., Priam M., Kordon C. *Endocrinology*, 99, 445—452, 1976.

17. *Greef W. J. de, Plotsky P. M., Neill J. D.* Neuroendocrinology, 32, 4, 229—233, 1981.
18. *Krulich L., Coppings R. J.* Neuroendocrinology, 30, 3, 133—138, 1980.
19. *Richard Ph., Moss F.* Biol. cell. process. neurosecret. hypothalam. Colloq. Bordeaux, Paris., 1977, p. 63—78, 1978.
20. *Moss F., Richard Ph.* Neuroendocrinology, 28, 138—144, 1979.

Институт физиологии
им. А. И. Караева АН АзССР, Баку

Поступила 7. IX 1982

УДК 577.153+577.150.5+612.017.1+612.843

ИММУНОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛКОВОГО ИНГИБИТОРА 3,5'-cGMP ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ НАРУЖНЫХ СЕГМЕНТОВ ПАЛОЧЕК СЕТЧАТКИ

ДУМЛЕР И. Л.

Получены моноспецифические антитела к белковому ингибитору 3,5' cGMP фосфодиэстеразы (ФДЭ) наружных сегментов палочек сетчатки (НСП). Оценка специфичности полученных антител проведена по результатам двойной радиальной иммунодиффузии в агаровом геле. Очищенная фракция иммуноглобулинов (IgG) из полученной антисыворотки снимала тормозящее действие ингибитора на ФДЭ и оказывала на фермент активирующий эффект. Действие IgG на ФДЭ в присутствии ингибитора не изменялось при добавлении в инкубационную смесь других белковых модуляторов. Проведена очистка ингибитора методом иммуноаффинной хроматографии на колонке с CNBr-активированной сефарозой 4В, сопряженной с IgG.

Ранее в сетчатке быка был обнаружен новый белок, являющийся ингибитором ФДЭ циклических нуклеотидов (КФ 3. 1. 4. 17) [1, 2]. В дальнейшем было показано, что он сосредоточен непосредственно в фоторецепторных мембранах и относительно прочно связан с ферментом [3], однако при определенных условиях эксперимента может быть отделен от последнего [4].

В настоящее время полагают, что белковый ингибитор играет решающую роль в процессе фотоиндуцированной активации ФДЭ: освещение приводит к снятию его ингибирующего действия [5]. Ингибиторный белок является компонентом белкового комплекса, в состав которого входят и GTP-связывающие белки, передающие сигнал с родопсина на ФДЭ [5, 6]. Механизм взаимодействия GTP-связывающих белков с ингибитором и последнего с ФДЭ неясен; нет единого мнения и в отношении свойств и величины молекулярной массы ингибитора [7, 8], а также его специфичности для ткани сетчатки и роли в процессе активации аденилатциклазы [9].

Удобным и перспективным подходом для решения этих вопросов может быть иммунохимический анализ ингибиторного белка. Попытка получения и характеристики моноспецифических антител к белковому ингибитору ФДЭ составила задачу настоящей работы.

Материалы и методы

Белковый ингибитор выделяли из термостабильной фракции очищенного препарата ФДЭ [4], подвергая ее препаративному электрофо-

резу в блоке ПААГ. Иммунизацию (были использованы 3 кролика) проводили очищенным препаратом ингибитора, вводя подкожно в область спины в 15—20 точек 0,5 мг антигена (в 1 мл 10 мМ трис-НСl буфера, рН 8,0) и 1 мл полного адьюванта Фрейнда. Через три недели кроликов иммунизировали повторно; каждое животное получало по 0,025 мг ингибитора уже без адьюванта. Поддерживающие иммунизации (каждый раз по 0,025 мг антигена) проводили несколько раз в течение пяти месяцев. Кровь отбирали из ушной вены порциями по 20—30 мл. За 5—7 дней до отбора крови животным вводили по 0,025 мг ингибитора.

Иммунные сыворотки получали общепринятым способом [10], разливали их порциями по 1 мл и хранили при температуре—10°, либо при 4° в присутствии консерванта (0,02%-ный азид натрия). В качестве контроля служили преиммунные сыворотки тех же животных.

Очистку фракций IgG осуществляли осаждением сульфатом аммония и последующей хроматографией на колонке с ДЭАЭ-сефадексом А-50 [10]. Иммунодиффузию проводили по Ouchterlony [11], используя 1,5%-ный агаровый гель, содержащий 0,15 М NaCl и 0,02%-ный NaN_3 .

Для приготовления сефарозы 4В, сопряженной с антителами, 1 мл (8,5 мг) очищенной фракции IgG диализовали в течение 24 ч против 0,1 М NaHCO_3 , рН 8,3, содержащего 0,5 М NaCl. Подготовленную стандартным способом CNBr-активированную сефарозу 4В перемешивали с комнатной температуре, затем в течение 16 ч при 4°. После этого суспензию центрифугировали (2000 г, 5 мин) и дважды промывали буфер-блокады оставшихся активных групп сефарозу ресуспензировали в 1 М растворе моноэтаноламина, рН 9,0, и перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре. Для удаления избытка блокирующего агента и адсорбированного белка сефарозу попеременно промывали (по три раза) десятью объемами 0,1 М ацетатного буфера, содержащего 0,5 М NaCl, и буфера указанного выше состава.

Хроматографию на сефарозе 4В, сопряженной с IgG, проводили, используя колонку (0,5×5 см), уравновешенную тем же буфером. После внесения исследуемой пробы удаляли несвязавшиеся белки элюцией 40 мл буферного раствора. Затем элюировали специфически связанные с IgG белки 20 мл 0,1 М глицил-НСl буфера, рН 2,8. Выходящие с последним буфером фракции сразу же нейтрализовали до рН 8,0.

Электрофорез в блоке ПААГ проводили по методу Laemmli [12]. Получение фракций НСП, экстрактов из них и препаратов ФДЭ, определение ее активности, содержания белка и P_i осуществляли, как описано ранее [3, 4].

Результаты и обсуждение

Оценка специфичности полученной иммунной сыворотки была проведена по результатам двойной радиальной иммунодиффузии в агаро-

вом геле (рис. 1). Очевидно, что в широком интервале разведений антисыворотки (1:100—1:1000) выявлялась единственная полоса преципитации, что свидетельствовало об иммунохимической гомогенности используемого антигена и моноспецифичности образовавшихся антител.

В дальнейшем была проведена очистка фракции IgG из полученной антисыворотки. Чистоту выделяемых в процессе очистки фракций контролировали с помощью электрофореза в блоке ПААГ, содержащего 0,1%-ный додецилсульфат натрия. В результате был получен практически гомогенный препарат IgG, содержавший тяжелые и легкие цепи γ -глобулина, который был использован для проверки его влияния на ак-

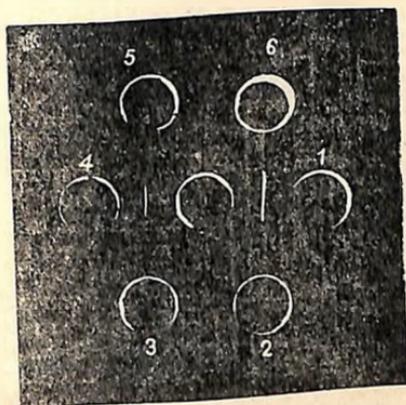


Рис. 1. Иммунодиффузия в агаровом геле препарата антисыворотки. В центре—10 мкл (10 мкг) антигена; 1—5—последовательные двукратные разведения антисыворотки, начиная с 1:128; 6—контроль

тивность ФДЭ. Возрастающие количества IgG инкубировали в 20 мМ трис-HCl буфере, pH 8,0, со стандартным количеством препарата ингибитора (2 мкг) в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем добавляли препарат ФДЭ, инкубировали 15 мин, после чего проводили определение его активности. Количество добавляемого к ферменту ингибитора было подобрано таким образом, чтобы величина оказываемого на ФДЭ ингибирования составляла 50%.

Из представленных на рис. 2 данных очевидно, что фракция IgG снимала тормозящее действие ингибитора и оказывала на ФДЭ активирующий эффект (исходная активность ФДЭ до добавления ингибитора—0,45 ед. опт. плотности). Наблюдаемая зависимость была прямой и линейной с насыщением при концентрации добавляемого IgG свыше 30 мкг в пробе. В том же диапазоне концентраций очищенная преи-мунная сыворотка не оказывала какого-либо влияния на фермент.

Эти данные являются еще одним доказательством специфичности полученных антител по отношению к белку-ингибитору. Наблюдаемая при добавлении IgG активация ФДЭ может быть объяснена взаимодействием антител не только с добавляемым в пробы антигеном, но и с эн-

догенным ингибитором, содержащимся в используемом препарате фермента. Полученные результаты подтверждают представление о том, что ФДЭ в НСП находится в частично заблокированном состоянии [4].

Известно, что активность ФДЭ разных тканей находится под контролем иных, отличных по ряду свойств от ингибитора, модуляторных белков [13]. Могут ли эти белки, в частности кальмодулин (схема выделения которого подобна схеме выделения ингибитора) и тропонин I, оказывающий также тормозящий эффект на ФДЭ [14], взаимодействовать с антителами, выработанными к ингибитору?

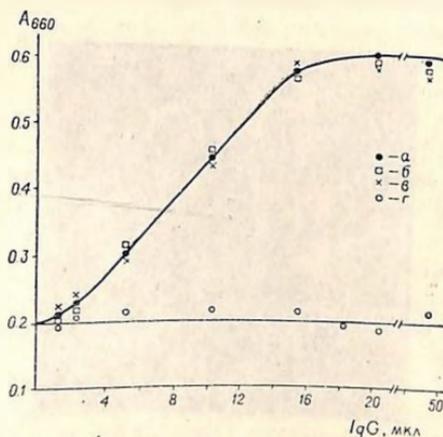


Рис. 2. Влияние IgG на активность ФДЭ; а—в пробы добавлен ингибитор (2 мкг); б—в пробы добавлен ингибитор (2 мкг) и тропонин I (10 мкг); в—в пробы добавлен ингибитор (2 мкг) и кальмодулин (10 мкг); г—контроль (вместо IgG добавлена преципитационная сыворотка). По оси ординат—активность ФДЭ в ед. опт. плотности при 660 нм; по оси абсцисс—содержание IgG в пробе, мкл

Для ответа на этот вопрос в ряд проб одновременно с ингибитором и IgG добавляли кальмодулин и тропонин I (рис. 2). Оказалось, что добавление этих белков не влияло на эффект, оказываемый на ФДЭ фракцией IgG, что свидетельствует об отсутствии конкурентных взаимоотношений между кальмодулином, тропонином I и ингибитором при связывании последним антител.

Для дополнительной проверки специфичности полученных антител проводили аффинную хроматографию на колонке с CNBr-активированной сефарозой 4В, сопряженной с IgG, экстракта НСП, содержащего ФДЭ, ингибитор и ряд других белков. Из результатов, представленных на рис. 3, а, следует, что с колонки элюировались два основных пика белка. Первый пик соответствовал несорбированному белку, второй мог быть элюирован при pH 2.8; он содержал белки, специфически связанные с IgG. Фракции, соответствующие каждому из пиков, объединяли и проверяли их влияние на активность ФДЭ. Предварительно фракции выдерживали 3 мин при 90°, что позволяло инактивировать

фермент, элюируемый с колонки, и не влияло на активность ингибитора, учитывая его термостабильность [1, 2]. Очевидно (рис. 3, б), что фракция несорбировавшихся на колонке белков не изменяла активность ФДЭ, в то время как специфически связавшаяся фракция обуславливала почти полное ингибирование активности фермента. Следует полагать, что эта фракция содержит чистый ингибиторный белок, оказывающий на ФДЭ присущий ему эффект.

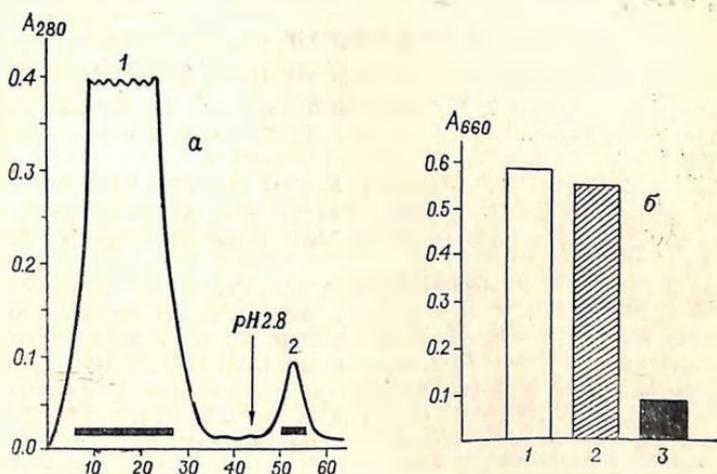


Рис. 3. Хроматография водорастворимого экстракта белков НСП на колонке с CNBr-активированной сефарозой 4В, сопряженной с IgG. а—профиль элюции белков на колонке. По оси ординат—выход белка в ед. опт. плотности при 280 нм. По оси абсцисс—номера фракций. Стрелкой указано начало элюции глициновым буфером (рН 2,8); б—влияние фракций, элюированных с колонки, на активность ФДЭ. По оси ординат—активность ФДЭ в ед. опт. плотности при 660 нм. 1—контроль; 2—добавлена фракция несорбировавшихся на колонке белков (пик 1); 3—добавлена фракция белков, специфически связавшихся на колонке (пик 2)

Полученные в настоящей работе данные свидетельствуют о возможности получения моноспецифических антител к белку-ингибитору ФДЭ, которые могут быть использованы для изучения свойств, локализации и функциональной значимости ингибиторного белка.

IMMUNOCHEMICAL CHARACTERISTIC OF PROTEIN INHIBITOR OF CYCLIC GMP PHOSPHODIESTERASE FROM RETINA RODS' OUTER SEGMENTS

DUMLER I. L.

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

The monoclonal antibodies to the protein inhibitor of cyclic GMP phosphodiesterase of retina rods' outer segments have been obtained. The specificity of this antibodies was determined by means of double

immunodiffusion technique. The purified fraction of immunoglobulins G from antisera removed the inhibitory action of the protein inhibitor and moreover activated the enzyme. The effect of immunoglobulins G on the phosphodiesterase did not change after addition of other protein modulators to the incubation media. The purification of the protein inhibitor was performed by immunoaffinity chromatography on the column with CNBr-activated Sepharose 4B coupled with immunoglobulins G.

ЛИТЕРАТУРА

1. Думлер И. Л., Этингоф Р. Н. ДАН СССР, 213. 1197—1201, 1973.
2. Dumler I. L., Etingof R. N. Biochim. et Biophys. Acta, 429, 474—484, 1976.
3. Etingof R. N., Furaev V. V., Dumler I. L. FEBS 12 Meeting Dresden, 54, 71—80, 1978.
4. Думлер И. Л., Фураев В. В., Этингоф Р. Н. ДАН СССР, 253, 1504—1508, 1980.
5. Sitaramaya A., Virmaux N., Mandel P. Exp. Eye Res., 25, 163—169, 1977.
6. Fung B. R., Hurley J. B., Stryer L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 152—156, 1981.
7. Baehr W., Devlin M. J., Applebury M. L. J. Biol. Chem., 254, 11669—11677, 1979.
8. Stryer L., Hurley J. B., Fung B. K. Trends Biochem. Sci., 6, 245—247, 1981.
9. Bitensky M. W., Wheeler M. A., Rasenick M. M., Yamazaki A., Stein P. J., Halliday K. R., Wheeler G. A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 3408—3412, 1982.
10. Харбоу Н., Ингильд А.—В кн.: Руководство по количественному иммуноэлектрофорезу (под ред. Н. Аксельсена, Я. Крелля, Б. Векке), М., Мир, с. 200—203, 1977.
11. Ouchterlony O. Acta Path. Scand., 32, 231—240, 1953.
12. Laemmli U. K. Nature, 227, 680—685, 1970.
13. Scharff O. Cell Calcium, 2, 1, 28, 1981.
14. Фураев В. В., Думлер И. Л., Казимирский А. Н., Этингоф Р. Н. ДАН СССР, 243, 247—250, 1978.

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

Поступила 1. IV 1983

УДК 547.963

РАСТВОРИМЫЕ МЕТАЛЛОПРОТЕИНЫ МОЗГА. V. МЕДЬСОДЕРЖАЩИЕ БЕЛКИ ИЗ БЕЛОГО ВЕЩЕСТВА ГОЛОВНОГО МОЗГА*

ШАРОЯН С. Г., НАЛБАНДЯН Р. М.

Из экстракта белого вещества головного мозга крупного рогатого скота выделено пять кислых медьсодержащих фракций с М 10, 18, 45, 150 и 500 кД. Три из них, относящиеся к сильно кислым белкам (М 10, 18 и 45 кД), получены в электрофоретически гомогенном состоянии. Для них определено содержание меди и зарегистрирован сигнал ЭПР. Помимо этих белков в слабо кислой фракции экстракта ткани мозга содержатся также Cu, Zn-супероксиддисмутаза (М 32 кД). В основных фракциях экстракта мозга медь не обнаруживается.

Многочисленными исследованиями установлено наличие в мозгу нескольких медьсодержащих белковых фракций [1—3], одна из которых имела крайне кислые свойства и была очищена до электрофоретически гомогенного состояния. Как оказалось, эта фракция представляет собой белок, состоящий из одной полипептидной цепи и содержащий один атом меди [3]. Подробно были изучены его магнитные свойства и реакции с катехоламинами [4, 5]. В то же время данные относительно других медьсодержащих белков мозга крайне ограничены. Изучение физико-химических свойств этих белков лимитируется отсутствием препаративных методов их получения. Основная задача исследования состояла в разработке удобного метода получения медьсодержащих белков из экстрактов мозга.

Материалы и методы

Белки выделяли из ацетонно-эфирного порошка белого вещества мозга крупного рогатого скота, который получали по методу Шароян и соавт. [6]. В работе использовали ДЕАЕ-целлюлозу фирмы «Whatman», сефадексы G-50, G-75, G-100, G-200 и сефарозу 6B фирмы «Pharmacia», реактивы для электрофореза фирмы «Reanal», тетраэтилтирамдисульфид (дисульфирам) фирмы «Sigma», синий декстран фирмы «Fogak». В качестве стандартных белков при гель-фильтрации применяли цитохром с из коры надпочечников, каталазу и церулоплазмин, выделенные в лаборатории физической химии белков Института биохимии

* Первые четыре сообщения этой серии были опубликованы в сборнике «Вопросы биохимии мозга», Изд-во АН АрмССР, Ереван.

АН АрмССР, ферритин фирмы «Serva». Остальные реактивы были отечественного производства марок хч и чда.

Величину молекулярной массы белков оценивали методом гель-фильтрации. Гомогенность белковых фракций контролировали электрофорезом в 7%-ном ПААГ [7]. Содержание белка определяли по методу Lowry и соавт. [8] и по поглощению растворов при 280 нм, а меди—с помощью дисульфирама согласно методу Matsuba и соавт. [9]. Спектры поглощения белковых растворов регистрировали на спектрофотометрах «Model-26» и «Acta MIV» фирмы «Beckman». Большинство элюционных диаграмм получено с помощью проточной кюветы анализатора «Uvicord S» фирмы «LKB» с длиной оптического пути 0,25 см и фильтром при 276 нм. Спектры ЭПР в виде первой производной регистрировали в 3-мм трубках из плавленого кварца при температуре—160° на приборе «E-4» фирмы «Varian».

Результаты и обсуждение

Для экстракции белков порошок белого вещества мозга суспендировали в 0,01 М ацетатном буфере, pH 6,0, из расчета 20 мл буфера на 1 г порошка. Суспензию гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера-Эльвехейма, гомогенат перемешивали в течение 5 ч на холоду и центрифугировали 80 мин при 6000 g. Прозрачный налосадочный раствор наносили на колонку с ДЕ-52 целлюлозой, уравновешенной 0,03 М ацетатным буфером, pH 6,0. Колонку промывали 200 мл порциями исходного и 0,05 М ацетатного буфера. Кислые белки элюировали 0,6 М буфером. Элюат диализовали против 0,1 М фосфатного буфера, pH 7,5 и подвергали гель-хроматографии через колонку с сефадексом G-75 (средний) (3,5×70 см), уравновешенную 0,1 М KCl и 0,01 М фосфатным буфером, pH 7,5. Из элюционной диаграммы, приведенной на рис. 1, видно разделение белковой смеси на 3 основные фракции: высокомолекулярную (ВМ), среднемолекулярную (СМ) и низкомолекулярную (НМ). Все три фракции концентрировали отдельно на ДЕ-52 целлюлозе, белковую фракцию элюировали 0,6 М буфером. Элюаты диализовали против 0,1 М фосфатного буфера и снова подвергали гель-хроматографии: ВМ фракцию—через колонку с сефадексом G-200 (3×70 см), СМ и НМ фракции—через колонку с сефадексом G-75 (сверхтонкий) (1,8×52 см). Все колонки были уравновешены 0,1 М KCl и 0,01 М фосфатным буфером, pH 7,5. Соответствующие элюционные диаграммы приведены на рис. 2, а, в, с. Дальнейшей очистке подвергались только медьсодержащие фракции, помеченные на рис. 2 стрелками.

Для дальнейшей очистки фракции 1 (рис. 2, а) дважды применяли гель-хроматографию через колонку с сефарозой 6В, уравновешенную 0,1 М KCl и 0,01 М фосфатным буфером. Конечная элюционная диаграмма представлена на рис. 3. Гель-фильтрация стандартных белков через те же колонки позволила оценить величину М фракции 1, равную примерно 500 кД. Описанная процедура не приводит к получению электрофоретически гомогенного препарата.

Фракцию 2 очищали вначале гель-фильтрацией через колонку с сефадексом G-100 (сверхтонкий), (1,8×50 см), уравновешенную 0,1 М КСl и 0,01 М фосфатным буфером. рН 7,5. На элюционной диаграмме (рис. 4) указаны примерные величины молекулярной массы, соответствующие трем полученным фракциям. Анализ белковой фракции с М 45 кД показал, что она медь не содержит. Остальные две фракции были объединены и подвергнуты гель-фильтрации через колонку с сефадексом G-200 (сверхтонкий), (1,8×52 см), уравновешенную 0,1 М КСl и 0,01 М фосфатным буфером. Как видно из элюционной диаграммы (рис. 5), выявляются две электрофоретически неомогенные медьсодержащие фракции с М 150 и 80 кД.

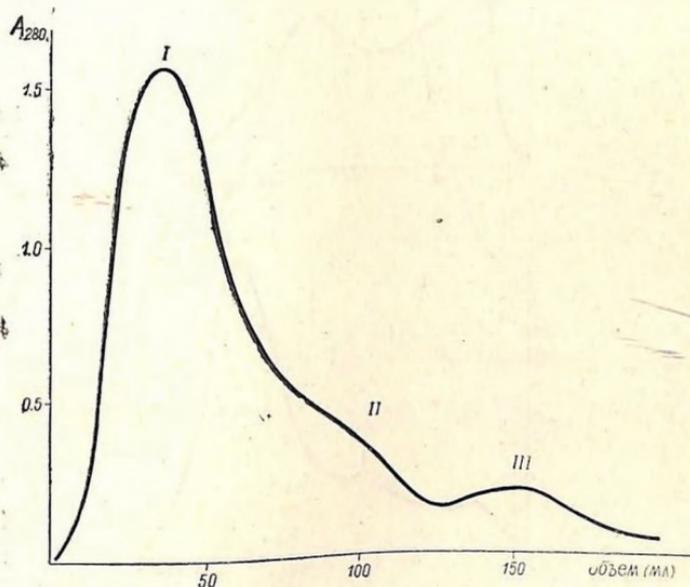


Рис. 1. Элюционная диаграмма при гель-фильтрации 0,6 М элюата через сефадекс G-75 (средний). I—высокомолекулярная фракция (ВМ), II—среднемолекулярная фракция (СМ), III—низкомолекулярная фракция (НМ)

Фракции 1 и 2 содержат слабокислые белки с изоэлектрической точкой между 5 и 6, поэтому при их очистке использовали фосфатный буфер с рН 7,5. Для очистки же фракций 3, 4 и 5, как правило, применяли ацетатный буфер, рН 6,0.

Как показал анализ СМ фракции, основную часть в ней составляет описанный ранее [10] никкисодержащий белок (рис. 2, в). Дальнейшую очистку медьсодержащей фракции 3, полученной из СМ фракции, проводили с помощью гель-хроматографии через сефадекс G-75 (сверхтонкий) и ионообменной хроматографии на ДЕАЕ-целлюлозе. Для очистки от менее кислых белков колонку с ДЕАЕ-целлюлозой промыва-

ли порциями буфера с последовательно возрастающей ионной силой вплоть до 0,15 М ацетатного буфера, рН 6,0. Многократное повторение отмеченных процедур приводило к получению электрофоретически гомогенного белка с M 45 кД, который при электрофорезе движется вместе с маркером, что указывает на его сильно кислые свойства. Содержание меди в белке составляет 0,4% или 3 атома меди на молекулу белка.

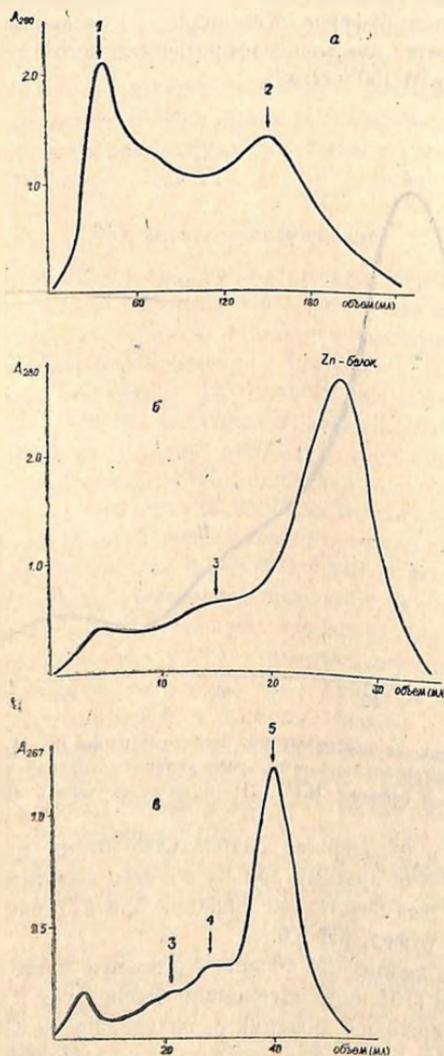


Рис. 2. Элюционные диаграммы при гель-фильтрации через сефадекс G-200 (средний) ВМ а), СМ (в) и НМ (с) фракций—через сефадекс G-75 (сверхтонкий)

Из НМ фракции получается медьсодержащая фракция (также отмеченная на рис. 2, с цифрой 3), которая по величине M и содержанию меди идентична фракции 3, выделенной из СМ фракции. Выход фракции 3 из СМ фракции (5 мг/1 кг массы сырой ткани) существенно отличается от выхода аналогичной фракции из НМ фракции (1 мг), то

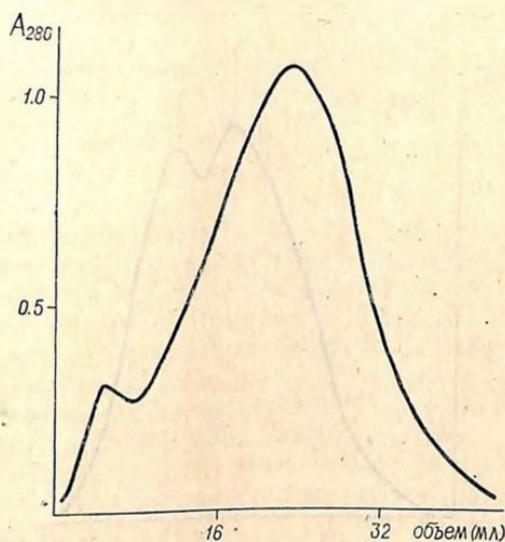


Рис. 3. Элюционная диаграмма при гель-фильтрации фракции 1 через сефарозу 6В

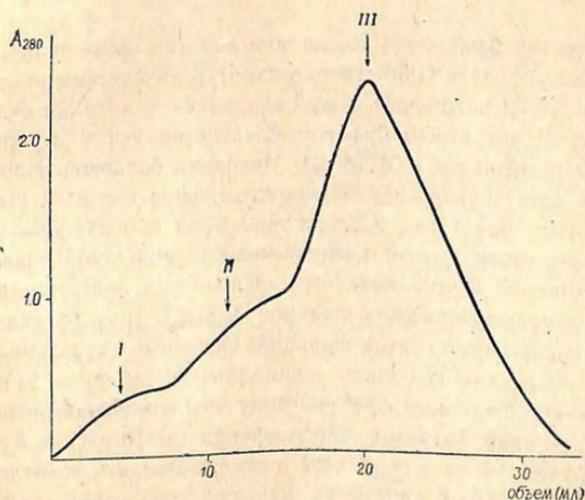


Рис. 4. Элюционная диаграмма при гель-фильтрации фракции 2 через сефадекс G-100 (сверхтонкий). I— $M > 100$ кД, II— $M = 80$ кД, III— $M = 15$ кД.

есть основная часть этого белка представлена в СМ фракции и лишь незначительная его доля в силу комплексных взаимодействий с более низкомолекулярными фракциями обнаруживается в ИМ фракции.

При очистке ИМ фракции получают три различные медьсодержащие фракции (рис. 2, с). Одна из них (фракция 5) оказалась описанным нами ранее нейрокупреном [3]—крайне кислым белком с M около 10 кД, содержащим один атом меди на молекулу.

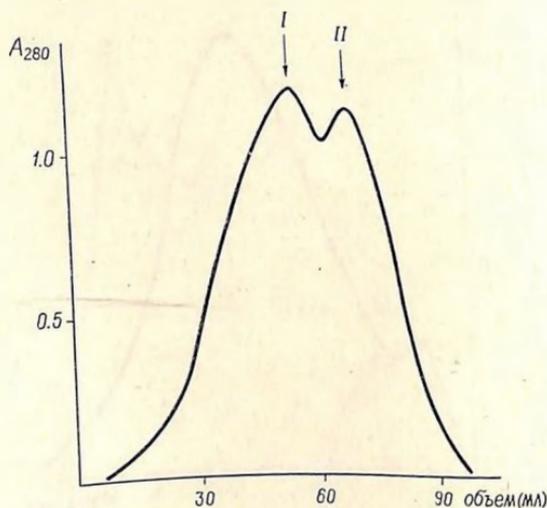


Рис. 5. Элюионная диаграмма при гель-фильтрации фракции 2 через сефадекс G-200 (сверхтонкий). I— $M=150$ кД, II— $M=80$ кД.

Для очистки фракции 4 также многократно применяли гель-фильтрацию через сефадекс G-50 (сверхтонкий) и анионообменную хроматографию на ДЕ-52 целлюлозе. После промывания колонки с ДЕАЕ-целлюлозой 0,1 М ацетатным буфером удалось получить электрофоретически гомогенный белок с M 18 кД. Миграция белковой полосы вместе с маркером при анионообменной хроматографии свидетельствует о его сильно кислых свойствах. Содержание меди в белке оказалось равным 0,4%, что соответствует 1 атому меди на молекулу белка.

Симметричная форма конечных элюионных диаграмм и электрофореграммы медьсодержащих фракций 3, 4 и 5 (рис. 6) указывают на высокую степень очистки этих фракций. Основные характеристики описанных медьсодержащих белков приведены в таблице. Три из пяти медьсодержащих белковых фракций получены в электрофоретически гомогенном состоянии. Помимо нейрокупрена (M 10 кД) в экстракте из белого вещества мозга содержатся также более высокомолекулярные медьсодержащие белки. Одним из вопросов, требующих дальнейшего изучения, является возможность образования агрегированных форм

медьсодержащих белков. Эта проблема может быть разрешена путем сравнения аминокислотных составов полученных белков.

Таблица

Характеристика пяти медьсодержащих фракций из головного мозга

Фракция	М (кД)	Электрофоретическая гомогенность	Содержание меди		Содержание белка в 1 кг сырой ткани (мг)
			%	число атомов на молекулу	
1	500	не гомоген.	не определяли		не определяли
2	150				
3	45	гомогенный	0,4	3	6
4	18		0,4	1	2
5	10		0,7	1	20

В трех электрофоретически гомогенных белках обнаружен сигнал ЭПР, принадлежащий к типу 2 [11] и свидетельствующий о том, что медь в этих белках (М 10, 18 и 45 кД) находится в двухвалентном парамагнитном состоянии. Подробное изучение физико-химических свойств этих фракций, дальнейшая очистка более высокомолекулярных фракций (М 150 и 500 кД) и их последующее исследование позволят высказать обоснованные предположения об их возможной биологической функции. В настоящее время неясно, аналогичны ли полученные нами медьсодержащие белки из мозга крупного рогатого скота медьсодержащим фракциям из печени и других тканей крысы, описанным Norton, Heaton [12].

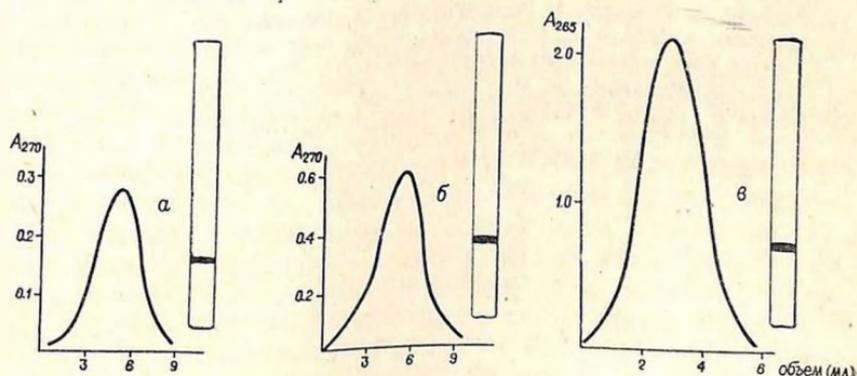


Рис. 6. Элюиционные диаграммы и электрофореграммы медьсодержащих фракций 3 (а), 4 (б) и 5 (в) на последней стадии очистки

Таким образом, все полученные нами медьсодержащие белки мозга принадлежат к кислым белкам. Слабо кислые фракции, как оказалось, также содержат медьсодержащие белки, в частности фермент супероксиддисмутазу [9]. Ни одной медьсодержащей белковой фракции не было выявлено среди основных белков экстракта мозга.

SOLUBLE METALLOPROTEINS OF BRAIN. COPPER-CONTAINING PROTEINS FROM WHITE MATTER OF BRAIN

SHAROYAN S. G., NALBANDYAN R. M.

Institute of Biochemistry, Armenian SSR Academy of Sciences, Yerevan

Five acidic copper-containing protein fractions with M 10, 18, 45, 150 and 500 kDa were purified from the extract of bovine brain white matter (the first three ones in electrophoretically homogeneous state). EPR-spectra and copper content of these fractions were assayed. Besides them there is a cuprozinc superoxide dismutase in the weakly acidic fraction. No copper was found in the basic protein fractions.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Porter H., Folch J. Arch. Neurol. Psychiatry, 77, 8-16, 1957.
2. Fushimi H., Hamison Ch., Ravin H. J. Biochem., 69, 1011-1053, 1971.
3. Sharoyan S., Shaljian A., Nalbandyan R., Buntatian H. Biochim. Biophys. Acta, 493, 478-487, 1977.
4. Шароян С. Г., Шалджян А., Налбандян Р. М., Бунятян Г. Х. Вопросы биохимии мозга, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 12, с. 81-91, 1977.
5. Gasparov V., Nalbandyan R., Buntatian H. FEBS Lett., 97, 37-39, 1979.
6. Шароян С. Г., Шалджян А., Налбандян Р. М., Бунятян Г. Х. Вопросы биохимии мозга, Ереван Изд-во АН АрмССР, 11, с. 105-115, 1976.
7. Davits B. Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 404-427, 1964.
8. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. J. Biol. Chem., 193, 265-275, 1951.
9. Matsuba Y., Takahashi Y. Anal. Biochem, 36, 182-191, 1970.
10. Шалджян А., Шароян С. Г., Налбандян Р. М., Бунятян Г. Х. Вопросы биохимии мозга, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 14, с. 5-14, 1980.
11. Malkin R., Malmstrom B. Adv. enzymol., 33, 177-244, 1970.
12. Norton D., Heaton F. Biochem. Soc. Trans., s. 425-427, 1977.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Поступила 8. 1 1983

УДК 612.821.7:612.82:577.1

ВКЛЮЧЕНИЕ ¹⁴C-ЛЕЙЦИНА В БЕЛКИ МЕМБРАН СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЙ МОЗГА КРЫС ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМАХ КИСЛОРОДНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

ШЕРСТНЕВ К. Б., СУЛЕЙМАНОВ А. К., КРИЧЕВСКАЯ А. А.

Изложены результаты определения включения ¹⁴C-лейцина в белки мембран и содержания белков с различными молекулярными массами в мембранах субклеточных фракций мозга крыс при действии повышенного давления кислорода. Установлено ингибирование включения метки в белки мембран синапсом в острой форме кислородной интоксикации, которое сопровождается резким уменьшением содержания белков мембран синапсом с величиной M от 12 до 17 кД. Действие низких давлений кислорода вызывает достоверное увеличение включения ¹⁴C-лейцина во все исследованные мембраны субклеточных фракций. Полученные данные могут служить одним из обоснований применения низких давлений кислорода в медицинской практике.

На действие факторов внешней среды, по силе превышающих оптимальные условия обитания, организм отвечает универсальной реакцией усиления свободнорадикальных процессов, перекисного окисления липидов и увеличения SH-групп белков [1]. Одним из непосредственных последствий этого является изменение свойств биологических мембран. Гипербарооксигенация (ГБО), которая в последние годы широко используется в медицинской практике [2] и многих областях народного хозяйства, представляет собой экстремальный фактор среды. Ее действие на все живые организмы проявляется, прежде всего, в значительном усилении реакций, которые ведут к образованию активных форм кислорода, генерации свободных радикалов и усилению перекисного окисления липидов, модификации активности ферментов [1, 3]. Сила действия ГБО определяется величиной давления кислорода и продолжительностью действия. Реакция на ГБО зависит от вида животного, возраста и физиологического состояния организма. ГБО ниже 0,5 МПа вызывает так называемую общетоксическую форму интоксикации, при которой на фоне глубокого нарушения метаболизма непосредственная гибель животного наступает от отека легких, остановки сердца. ГБО выше 0,4 МПа приводит к быстрому развитию неврологической формы интоксикации, которая характеризуется развитием судорог центрального происхождения [3, 4]. Если сеанс ГБО прерывают до достижения терминального состояния, то до 70% животных выживает, однако нарушения метаболизма продолжают и нормализация наступает только через 30—45 дней [5].

Развитие кислородной интоксикации сопровождается нарушением функций всех типов биологических мембран: изменением проницаемости мембран эритроцитов и лизосом [6, 7], изменением активности Na^+ , $-\text{K}^+$ -АТФазы, моноаминоксидазы [8, 18] и др. В то же время не изучено, какие модификации структурных компонентов мембран ответственны за изменение их функций при ГБО.

В данной работе представлены материалы по фракционному составу и обменваемости белков мембран субклеточных фракций больших полушарий головного мозга крыс. Изучали действие ГБО 0,3 МПа в течение 2 ч (общетоксическая форма кислородной интоксикации) и ГБО 0,7 МПа до наступления судорог.

Материалы и методы

Опыты проводили на белых крысах массой 120—140 г. При исследовании обменваемости белков мембран животным вводили внутривенно D-L- ^{14}C -лейцин до помещения в барокамеру. Исследовали животных в состоянии судорожного приступа, вызванного действием 0,7 МПа кислорода (среднее время 30 ± 10 мин) (1); находящихся в условиях нормоксии спустя 2 ч после судорожного приступа (2) и подвергшихся действию 0,3 МПа кислорода в течение 2 ч (3). Контрольным животным ^{14}C -лейцин вводили одновременно с соответствующей подопытной группой. Первой группе—за 60 мин до помещения в барокамеру, второй и третьей—непосредственно перед компрессией.

Субклеточные фракции ткани мозга получали методом ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы [9]. Полученные фракции подвергали гипосмотическому шоку в 0,001 М натрий-фосфатном буфере, pH 7,0 и трижды отмывали в том же буфере при 100000 g в течение 20 мин. Часть полученного материала осаждали с помощью додецилсульфата натрия [10]. Электрофореграммы денситометрировали на денситометрической приставке к электрофореграммы денситометрической области спектра «Spectol» (ГДР). На электрофореграммах подсчитывали число фракций и определяли величины их молекулярных масс по стандартной кривой, полученной с помощью белков с известными молекулярными массами. Денситограммы разделяли на зоны, соответствующие определенным значениям M, и определяли относительное содержание белка в зонах гравиметрическим методом.

Для определения включения ^{14}C -лейцина в белки мембран из препаратов мембран органическими растворителями удаляли липиды мажних фильтрах в толуольном сцинтиляторе на жидкостном сцинтилляционном счетчике СБС-2. Статистическую обработку результатов проводили по Стьюденту-Фишеру.

Результаты и обсуждение

Полученные нами данные включения ^{14}C -лейцина в белки мембран субклеточных фракций мозга интактных животных соответствуют данным литературы. Максимум включения ^{14}C -лейцина приходится на мембраны микросом; мембраны митохондрий и синапсом занимают промежуточное положение, и наиболее низким включением характеризуется миелин [12, 13].

Таблица 1
Включение ^{14}C -лейцина в белки мембран субклеточных фракций мозга крыс при разных режимах ГБО (в % к контролю)

Режим ГБО	Миелин	Микросомы	Митохондрии	Синапсомы
Контроль	100%	100%	100%	100%
0,7 МПа	100%	94,7%	100%	74,5%
	n=6	n=8	n=8	n=7
		$p > 0,05$		$p < 0,05$
0,7 МПа +2 ч	77,6%	100%	100%	87,7%
	n=14	n=14	n=15	n=15
	$p < 0,01$			$p < 0,05$
0,3 МПа/2 ч	122,7%	145,7%	130,6%	127,3%
	n=6	n=13	n=18	n=13
	$p < 0,05$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$

Действие на животных 0,7 МПа кислорода вызывает снижение включения ^{14}C -лейцина в белки мембран синапсом (табл. 1), что является, по-видимому, следствием резкого нарушения метаболизма мембран нервных окончаний при судорогах, вызванных ГБО. Ингибирование включения радиоактивных аминокислот в белки синапсом характерно и для судорожных приступов, вызванных электрошоком [14]. Через 2 ч после действия 0,7 МПа кислорода включение ^{14}C -лейцина в мембраны синапсом приближается к уровню контроля, но остается ниже на 12,3%. Включение ^{14}C -лейцина в мембраны миелина уменьшается на 22,4% только через 2 ч после действия 0,7 МПа. В то же время включение метки в мембраны микросом и митохондрий остается практически без изменений в состоянии судорог и через 2 ч после них. Приближение включения ^{14}C -лейцина в мембраны синапсом к контрольному уровню через 2 ч после судорог свидетельствует о тенденции к нормализации процесса нарушения обмена белков, тогда как в мембранах миелина изменения белкового компонента нарастают. Такой характер нарушения метаболизма белков мембран различных субфракций ткани мозга при действии высоких давлений кислорода связан, по-видимому, с различной структурной и функциональной организацией мембран миелина, синапсом, микросом и митохондрий.

С целью выявления возможных структурных нарушений в мембранах при действии 0,7 МПа кислорода мы провели диск-электрофорез белков мембран субклеточных фракций в присутствии додецилсульфата натрия. Данные, приведенные в табл. 2, свидетельствуют о значи-

тельном (почти в три раза) снижении относительного содержания белков мембран синапсом с М от 12 до 17 кД и некотором увеличении содержания белков с М от 25 до 84 кД. В мембранах других субклеточных фракций статистически достоверных изменений не обнаружено. Причиной нарушений могут быть межмолекулярные сшивки белков мембран продуктами перекисного окисления липидов в мембранах, интенсивность которого значительно возрастает при ГБО. Эти результаты указывают на достаточно глубокие нарушения в составе белков мембран синапсом, что, в свою очередь, не может не отразиться на их функциях.

Таблица 2

Содержание белков с различной величиной М (в % к сумме) в мембранах субклеточных фракций мозга крыс при действии 0,7 МПа кислорода

Зоны	1	2	3	4	5
М	280— 84 кД	84— 40 кД	40— 25 кД	25— 17 кД	17— 12 кД
	М и е л и н				
Контроль	7,63	12,74	20,87	24,55	34,21
Опыт	5,18	14,77	25,99	21,74	32,32
	М и к р о с о м ы				
Контроль	13,70	25,60	28,49	22,04	10,16
Опыт	12,45	25,74	31,62	22,61	7,10
	М и т о х о н д р и и				
Контроль	14,48	27,03	25,20	20,65	12,64
Опыт	10,79	25,09	26,64	23,79	13,68
	С и н а п т о с о м ы				
Контроль	9,72	18,97	25,60	24,96	20,83
Опыт	10,80	25,89	31,86	24,11	7,84
		p<0,05	p<0,01		p<0,001

Данные исследований по включению меченых аминокислот в белки разных тканей и органов при низких давлениях кислорода противоречивы: так у Choу и сотр. [15] давление в 0,1—0,3 МПа кислорода усиливает включение ³Н-лейцина в белки мозга печени и плазмы крови. Однако, по данным Ford и сотр. [16] и Гершеновича и Кричевской [17], низкие давления стимулируют включение радиоактивных аминокислот в белки мозга, печени и почек. В опытах при действии на животных 0,3 МПа кислорода в течение 2 ч (табл. 1) мы наблюдали значительное увеличение включения радиоактивной метки в белки мембран субклеточных фракций мозга. Максимальное увеличение включения ¹⁴С-лейцина установлено для мембран микросом, минимальное—для мембран миеллина. Ингибирование включения метки в острой форме кислородной интоксикации связано с многосторонними нарушениями метаболизма: усилением процессов перекисного окисления липидов мозга, нарушением проницаемости мембран и активацией процессов

протеолиза, модификацией активности ряда ферментов [3]. Установлено, например, что во время судорожного приступа активность Na^+ , K^+ -АТФазы снижается на 50%, а при низких давлениях ее активность возрастает на 34% [18].

Полученные результаты свидетельствуют в пользу концепции о разной направленности реакции организма на высокие и относительно низкие концентрации кислорода, превышающие нормальную. Это может быть одним из обоснований использования низких давлений кислорода в медицинской практике.

INCORPORATION OF ^{14}C -LEUCINE INTO RAT BRAIN MEMBRANE PROTEINS AT DIFFERENT REGIMES OF HYPERBAROXYGENATION

SHERSTNEV K. B., SULEIMANOV A. K., KRICHIEVSKAYA A. A.
Rostov-on-Don State University, Institute of Biology Rostov-on-Don

It has been found that incorporation of ^{14}C -leucine into synaptosomes' membrane proteins is inhibited at the acute stage of oxygen intoxication and accompanied by a sharp depletion of proteins with M 12—17 kDa in synaptosomal membranes. The application of low pressure oxygen increases the incorporation of ^{14}C -leucine into the subcellular fractions' membranes. These data point to the usefulness of low pressure oxygen in medicine.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Кричевская А. А., Лукаш А. И., Броницкая Э. Г. Биохимические механизмы кислородной интоксикации. Ростов-на-Дону, Изд-во РГУ, с. 11—18, 1980.
2. Ефун С. Н.—В кн.: Тез. VII Международного конгресса по гипербарической медицине, М., с. 210, 1981.
3. Зальцман Г. Л., Кучук Г. А., Гургенидзе А. Г. Основы гипербарической физиологии, Л., Медицина, с. 319, 1979.
4. Жиронкин А. Г. Кислород. Физиологическое и токсическое действие, Л., Наука, с. 172, 1972.
5. Эмирбекова А. А. Космич. биол. и авиакосмич. мед., 12, 2, 86—88, 1978.
6. Лукаш А. И., Внуков В. В., Шерстнева Н. Я. Космич. биол. и авиакосмич. мед., 2, 47—51, 1979.
7. Лукаш А. И., Чихачев А. С., Карташева Л. Д. Укр. биохим. ж., 47, 728—733, 1975.
8. Горошинская И. А., Броницкая Э. Г. Вопросы мед. химии, 22, 621—625, 1976.
9. Gray C. G., Whittaker V. B. J. of Anatomy, 96, 79—88, 1962.
10. Weber K., Osborn M. J. Biol. Chem., 244, 4406—4412, 1969.
11. Wherrett J. R., Towser D. B. J. Neurochem., 18, 1027—1042, 1971.
12. Паладин А. В., Белик Я. В., Полякова Н. М. Белки головного мозга и их обмен. Киев, Наукова думка, с. 316, 1979.
13. Rodrigenz G., Alberici M., De Robertis E. Brain Res., 31, 179—184, 1971.
14. Vesco C., Gluditta A. J. Neurochem., 15, 81—85, 1968.
15. Chou O. G., Ford D. H., Rhines R. K. Acta neurol. scand., 48, 3, 359—330, 1972.
16. Ford D. H., Rhines R. K. J. Neurol. Sci., 19, 4, 483—490, 1973.
17. Гершенович Э. С., Кричевская А. А. ДАН СССР, 103, 449—451, 1956.
18. Шерстнева Н. Я., Броницкая Э. Г. Укр. биохим. ж., 48, 417—420, 1976.

Кафедра биохимии и биотехнологии РГУ,
НИИ биологии, Ростов-на-Дону

Поступила 5. X 1982

УДК 612.453.018+612.432.018:612.82.015.13—08

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ЛИЗОСОМНЫХ ФЕРМЕНТОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ ИЗМЕНЕНИЯХ УРОВНЯ ГОРМОНОВ ГИПОФИЗАРНО-НАДПОЧЕЧНИКОВОЙ СИСТЕМЫ

КАЛИНСКАЯ Л. Н., КОНОНЕНКО В. Я.

Изучена активность кислой протеиназы и фосфатазы в гомогенатах и субклеточных фракциях, выделенных из коры больших полушарий, гипоталамуса, гипокампа и полосатого тела крыс после адrenaлэктомии и введения гидрокортизона интактным и адrenaлэктомированным крысам.

Показано, что характер изменений активности обоих лизосомных ферментов после введения гидрокортизона интактным крысам различен для коры больших полушарий и лимбических структур мозга и в значительной мере зависит от продолжительности действия гормона на организм.

После адrenaлэктомии отмечается активация лизосомных ферментов. Во всех изученных отделах мозга установлено повышение свободной, неседиментируемой и снижение связанной активности кислой протеиназы, а также повышение неседиментируемой активности кислой фосфатазы. Введение гидрокортизона адrenaлэктомированным крысам оказывает стабилизирующее действие на кислотную протеиназу мозга, снижая ее выход из лизосом.

В решении ряда актуальных вопросов нейроэндокринологии, особенно в выяснении механизма действия гормонов на головной мозг, большое значение приобретают нейрохимические исследования, в частности изучение взаимодействия гормонов с лизосомным аппаратом нервных клеток, который играет важную роль в метаболической адаптации мозга к различным химическим факторам [1, 2].

Ранее было показано, что активность лизосомных ферментов ряда тканей и их высвобождение из лизосом могут регулироваться гормонами [3, 4], а взаимодействие кортикостероидов с лизосомными ферментами рассматривается как одна из важных сторон механизма их действия на клетки, в частности на клетки печени и лимфоидной ткани [5, 6]. Влияние же кортикостероидов на лизосомные ферменты в нервных клетках изучено мало. Из лизосомных ферментов нервных структур особый интерес представляют протеолитические ферменты, с функционированием которых связаны как образование, так и инактивация многих биологически активных пептидов [7, 8].

Одной из основных лизосомных протеиназ мозга является кислая протеиназа (каталсин D, КФ 3.4.23.5), отличающаяся широким спектром действия и играющая важную роль в метаболизме различных

белков и пептидов, в том числе кортикотропина, β -липотропина, β -эндорфина, соматостатина, люлиберина, ангиотензиногена, вещества P и других пептидов [8—11].

В задачу настоящей работы входило изучение активности кислой протениназы и маркерного фермента лизосом—кислой фосфатазы (КФ 3. 1. 3. 2) в отдельных образованиях головного мозга крыс при моделировании у них различных функциональных состояний гипофизарно-надпочечниковой системы.

Материалы и методы

Эксперименты были проведены на крысах-самцах линии Вистар массой 170—200 г. Повышение уровня кортикостероидов в организме вызывали однократным внутримышечным введением гидрокортизона (фирмы «Геден Рихтер») в дозе 5 мг/100 г массы животного. Крыс декапитировали через 1 и 4 ч после введения гормона; контрольным животным вводили физиологический раствор в соответствующем объеме. Недостаток кортикостероидов вызывали двусторонним удалением надпочечных желез. Исследования проводили на 7—8 сутки после адреналэктомии. В этот период у крыс отмечалось усиление секреции кортиколиберина и стимуляция кортикотропной функции гипофиза [12]. В качестве контроля в этой серии опытов служили ложнопериованные крысы. Активность ферментов определяли также у адреналэктомированных крыс, которым за 4 ч до декапитации вводили гидрокортизон в дозе 5 мг/100 г массы.

Активность ферментов лизосом исследовали в коре больших полушарий мозга, а также в лимбических структурах (гиппокамы, гипоталамус и полосатое тело), тесно связанных с регуляцией системы гипофиз—кора надпочечников. Навески тканей гомогенизировали в 0,25 М растворе сахарозы, приготовленном на 0,01 М трис-HCl буфере, pH 7,4. Гомогенаты центрифугировали при 1000 g 10 мин. Осадок дважды промывали 0,25 М сахарозой, и из объединенных супернатантов центрифугированном при 12000 g в течение 20 мин получали фракцию, в которой вместе с митохондриями осаждались лизосомы. Полученный осадок дважды промывали 0,25 М сахарозой и использовали в качестве лизосомной фракции [13]. Активность кислой фосфатазы и протениназы в лизосомной фракции составляла около 60% от общей активности этих ферментов в гомогенате.

Общую активность кислой протениназы определяли в лизосомной фракции или в гомогенате ткани мозга после предварительной инкубации (30 мин, 4°) с тритоном X-100 в конечной концентрации 0,1%. Свободную активность кислой протениназы определяли в суспензии лизосом или в гомогенате в условиях, обеспечивающих максимальную сохранность лизосом,—инкубирование с субстратом при 37° в течение 10 мин и pH 5,0 [14]. Связанную активность кислой протениназы рассчитывали по разнице между общей и свободной активностями.

Общую активность кислой фосфатазы определяли без тритона

X-100, поскольку в малых концентрациях (0,01—0,09%) данный детергент незначительно повышал активность фермента, а при более высоких концентрациях (0,1—0,5%) оказывал ингибирующее влияние на активность кислой фосфатазы. Одинаковая общая (после обработки тритоном X-100) и свободная активности кислой фосфатазы в мозгу крысы выявлены в работе Вукоји [15]. Ингибирующее влияние тритона X-100 на другие лизосомные ферменты отмечено Покровским, Тутельном [14], а также Сергеевым и сотр. [16]. Неседиментируемую активность лизосомных ферментов определяли в постмитохондриальной надосадочной фракции.

Активность кислой протениназы определяли по методу Anson [17] и выражали в нмоль тирозина, отщепленного от гемоглобина за 1 мин инкубации при 37° и pH 5,0 на 1 мг сырой ткани.

Активность кислой фосфатазы находили по методу, предложенному Покровским и Щербачевой [18] и выражали в нмоль *p*-нитрофенола, который высвобождался при расщеплении *p*-нитрофенилфосфата натрия за 1 мин инкубации при 37° и pH 5,0 на 1 мг сырой ткани.

Полученные данные обрабатывали методом вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента [19].

Результаты и обсуждение

Проведенными исследованиями установлено, что активность изученных лизосомных ферментов в структурах головного мозга может изменяться в зависимости от статуса гормонов гипофизарно-надпочечниковой системы в организме крысы.

Как видно из данных, приведенных в табл. 1 и 2, изменения активности исследуемых ферментов в отдельных структурах мозга при введении животным гидрокортизона зависят от времени, прошедшего после введения гормона, и характеризуются топографическими особенностями.

Различные по направленности изменения активности кислой протениназы и фосфатазы выявлены в коре больших полушарий мозга. Стабилизирующий эффект гидрокортизона на кислую протениназу коры мозга обнаружен через 1 ч после введения гормона: связанная активность фермента в лизосомной фракции при этом повышается, а неседиментируемая—снижается (табл. 1). В противоположность этому неседиментируемая активность кислой фосфатазы повышалась (табл. 2). Через 4 ч после введения гидрокортизона связанная активность кислой протениназы в лизосомной фракции снижалась при одновременном повышении неседиментируемой активности (табл. 1), что свидетельствовало о повышении проницаемости лизосом коры мозга для этого фермента и его активации. Неседиментируемая активность кислой фосфатазы, напротив, снижалась, а активность фермента в лизосомной фракции коры мозга повышалась (табл. 2).

Через 1 ч после введения гидрокортизона intactным животным существенных изменений активности кислой протениназы в гипоталаму-

Таблица 1

Протенназная активность мозга крыс через 1 и 4 ч после однократного введения гидрокортизона (нмоль тирозина/мин/1 мг ткани, $n=5$)

Условия опыта	1 ч		4 ч	
	контроль	гидро-кортизон	контроль	гидро-кортизон
Кора больших полушарий мозга				
Свободная активность	$0,62 \pm 0,05$	$0,64 \pm 0,06$	$0,78 \pm 0,03$	$0,69 \pm 0,04$
Связанная активность	$0,69 \pm 0,02$	$0,99 \pm 0,08^*$	$0,83 \pm 0,06$	$0,58 \pm 0,06^*$
Неседиментируемая активность	$0,36 \pm 0,03$	$0,20 \pm 0,02^*$	$0,30 \pm 0,02$	$0,43 \pm 0,02^*$
Гипоталамус				
Свободная активность	$0,66 \pm 0,05$	$0,68 \pm 0,04$	$0,68 \pm 0,04$	$0,56 \pm 0,02^*$
Связанная активность	$0,99 \pm 0,07$	$1,07 \pm 0,07$	$0,94 \pm 0,05$	$1,26 \pm 0,06^*$
Неседиментируемая активность	$0,35 \pm 0,03$	$0,36 \pm 0,03$	$0,40 \pm 0,04$	$0,36 \pm 0,03$
Гиппокамп				
Свободная активность	$0,60 \pm 0,04$	$0,55 \pm 0,03$	$0,57 \pm 0,04$	$0,65 \pm 0,04$
Связанная активность	$0,55 \pm 0,10$	$0,47 \pm 0,05$	$0,54 \pm 0,03$	$0,47 \pm 0,05$
Неседиментируемая активность	$0,34 \pm 0,04$	$0,33 \pm 0,03$	$0,30 \pm 0,03$	$0,35 \pm 0,02$
Полосатое тело				
Свободная активность	$0,50 \pm 0,03$	$0,52 \pm 0,02$	$0,50 \pm 0,03$	$0,41 \pm 0,02^*$
Связанная активность	$0,69 \pm 0,09$	$0,75 \pm 0,05$	$0,62 \pm 0,04$	$0,83 \pm 0,08^*$
Неседиментируемая активность	$0,34 \pm 0,03$	$0,30 \pm 0,02$	$0,28 \pm 0,03$	$0,29 \pm 0,03$

* $p \leq 0,05$ по сравнению с контролем

се, гиппокампе и полосатом теле не отмечалось (табл. 1), но при этом наблюдалось повышение неседиментируемой активности кислой фосфатазы в гипоталамусе и гиппокампе крыс (табл. 2). Иными оказались изменения активности лизосомных ферментов в лимбических структурах мозга через 4 ч после введения гормона. При этом наблюдалось повышение связанной и снижение свободной активности кислой протенназы в лизосомной фракции гипоталамуса и полосатого тела крыс (табл. 1); активность же кислой фосфатазы в лимбических структурах при этом не была изменена (табл. 2). Обнаруженные сдвиги активности исследуемых ферментов, свидетельствующие об определенной избирательности изменений проницаемости мембран лизосом для отдельных ферментов, указывают на сложность биохимических процессов, происходящих в лизосомах мозга при нагрузке животных гидрокортизоном.

Одной из причин неоднотипных изменений активности ферментов лизосом под влиянием химических факторов, включая и гормоны, является различная внутрилизосомная организация кислых гидролаз и

прочность связывания их с мембранами [3, 14, 16]. Доказательством может служить обнаруженное в наших опытах различное влияние тритона X-100 на общую активность кислой протенназы и фосфатазы в исследуемых отделах мозга (см. методы исследований) и неодинаковая степень солюбилизации этих ферментов под влиянием детергента. При использовании тритона X-100 в концентрации 0,05% легче солюбилизируется кислая фосфатаза (85,6—93,3%), труднее—кислая протенназа (64,1—71,8% от общей активности ферментов лизосомной фракции исследуемых отделов мозга).

Таблица 2

Фосфатазная активность мозга крыс через 1 и 4 ч после однократного введения гидрокортизона (1моль п-нитрофенола/млн/1мг ткани, $n=5$)

Условия опыта	1 ч		4 ч	
	контроль	гидрокортизон	контроль	гидрокортизон
Кора больших полушарий мозга				
Общая активность Неседиментируемая активность	1,69±0,07	1,73±0,11	1,62±0,05	1,89±0,07*
	0,39±0,01	0,44±0,01*	0,45±0,02	0,40±0,01*
Гипоталамус				
Общая активность Неседиментируемая активность	1,89±0,12	1,85±0,14	1,77±0,13	1,60±0,09
	0,35±0,02	0,44±0,01*	0,39±0,02	0,40±0,02
Гиппокамп				
Общая активность Неседиментируемая активность	1,56±0,11	1,61±0,09	1,56±0,11	1,53±0,09
	0,44±0,01	0,49±0,01*	0,47±0,02	0,49±0,01
Полосатое тело				
Общая активность Неседиментируемая активность	1,61±0,09	1,46±0,08	1,63±0,12	1,49±0,06
	0,45±0,01	0,45±0,02	0,42±0,02	0,44±0,01

* $p \leq 0,05$ по сравнению с контролем

Изменения активности лизосомных ферментов в коре больших полушарий мозга, обусловленные гидрокортизоном, носили выраженный двухфазный характер. Подобные изменения активности кислых гидролаз—фосфатазы, ДНКазы и РНКазы—после однократного введения гидрокортизона были выявлены в тимусе и селезенке [5]. Ранее был показан двухфазный характер изменений синтеза белка и нуклеиновых кислот в лимфоидной ткани животных, которым вводили гидрокортизон [20]. По-видимому, способность глюкокортикоидов вызывать изменения активности лизосомных ферментов может быть одной из причин того, что целому ряду исследователей не удалось обнаружить четкого стабилизирующего действия этих гормонов на мембраны лизосом различных тканей в условиях *in vivo*, как это имело место

в опытах *in vitro* [6, 21, 22]. Через 4 ч после однократного введения животным глюкокортикоидов повышались активности лизосомных ферментов было установлено в различных тканях: кислых нуклеаз—в лимфоидной ткани [5] и в мозгу [23], катепсина А и D и кислой фосфатазы—в печени [24].

В опытах показано, что гидрокортизон может оказывать как стабилизирующее, так и лабильное действие на ферменты лизосом нервной ткани в зависимости от продолжительности его действия. По-видимому, влияние глюкокортикоидов на лизосомы *in vivo* складывалось из двух эффектов—прямого, связанного с их непосредственным действием на мембраны, а также опосредованного рядом вторичных передатчиков, которыми могут служить циклические нуклеотиды, гистоны и липопротеиды [4, 25, 26].

Как показали дальнейшие исследования, адrenaлэктомию сопровождалась активацией лизосомного аппарата в нервной ткани. В коре больших полушарий мозга, гипоталамусе, гипокампе и полосатом теле крыс наблюдалось повышение свободной активности кислой протениназы в гомогенатах, а также неседиментируемой активности фермента (табл. 3). Повышение общей активности фермента в гомогенате имело место только в гипокампе (с $1,65 \pm 0,03$ нмоль тирозина в контроле до $1,85 \pm 0,08$ нмоль после адrenaлэктомии, $p < 0,05$). Наиболее выраженное повышение неседиментируемой активности кислой протениназы было выявлено в гипоталамусе—с 18,2% от общей активности гомогената в контроле до 38,6% после адrenaлэктомии, в других отделах мозга—с 15,9—22,0% от общей активности гомогената в контроле до 25,5—26,5% после адrenaлэктомии. Связанная активность кислой протениназы в гомогенатах после удаления надпочечников снижалась во всех исследованных отделах мозга (табл. 3).

В условиях экспериментального гипокортицизма отмечалось также повышение неседиментируемой активности кислой фосфатазы в коре больших полушарий мозга, гипокампе и полосатом теле. Общая активность фермента в гомогенатах данных отделов мозга после адrenaлэктомии не изменялась (табл. 4).

Повышение свободной и неседиментируемой активности лизосомных ферментов свидетельствовало о лабильности лизосомных мембран после адrenaлэктомии, что благоприятствовало выходу ферментов из органелл и повышало доступность субстратов для лизосомных ферментов. Снижение стабильности лизосом при пониженной функции коры надпочечников было установлено ранее для печени [27].

Однократное введение гидрокортизона оказывало стабилизирующее действие на кислую протениназу мозга у адrenaлэктомированных крыс, снижая выход ферментов из лизосом. Неседиментируемая активность фермента, повышенная после адrenaлэктомии, под влиянием гидрокортизона снижалась, приближаясь к контрольному уровню. Достоверные изменения были установлены в лимбических структурах мозга—гипоталамусе, гипокампе и полосатом теле. В коре больших

полушарий мозга однократное введение гидрокортизона адrenaлэктомированным крысам приводило к снижению свободной активности кислой протенназы, повышенной после адrenaлэктомии (табл. 3).

По-видимому, однократного введения гидрокортизона недостаточно для нормализации свободной и связанной активностей кислой протенназы в лимбических структурах мозга адrenaлэктомированных крыс (табл. 3), оно не оказывало стабилизирующего действия на активность кислой фосфатазы мозга адrenaлэктомированных крыс — неседиментируемая активность фермента оставалась выше ее уровня в контроле. Вероятно, это связано с повышением общей активности кислой фосфатазы в гомогенатах мозга после введения гидрокортизона адrenaлэктомированным крысам (табл. 4).

Таблица 3

Протеиназная активность мозга крыс после адrenaлэктомии и введения адrenaлэктомированным крысам гидрокортизона (имоль тирозина/мин/мг ткани, $n=4-7$)

Условия опыта	Контроль	Адrenaлэктомия	Адrenaлэктомия + гидрокортизон
Кора больших полушарий мозга			
Свободная активность	$0,81 \pm 0,01$	$1,06 \pm 0,04^*$	$0,94 \pm 0,02^{**}$
Связанная активность	$0,88 \pm 0,03$	$0,61 \pm 0,04^*$	$0,67 \pm 0,02$
Неседиментируемая активность	$0,31 \pm 0,01$	$0,43 \pm 0,02^*$	$0,37 \pm 0,02$
Гипоталамус			
Свободная активность	$0,79 \pm 0,01$	$1,68 \pm 0,01^*$	$1,81 \pm 0,08$
Связанная активность	$1,29 \pm 0,06$	$0,49 \pm 0,07^*$	$0,35 \pm 0,04$
Неседиментируемая активность	$0,37 \pm 0,01$	$0,87 \pm 0,03^*$	$0,56 \pm 0,03^{**}$
Гиппокамп			
Свободная активность	$0,89 \pm 0,03$	$1,67 \pm 0,06^*$	$1,46 \pm 0,08$
Связанная активность	$0,70 \pm 0,02$	$0,29 \pm 0,03^*$	$0,34 \pm 0,03$
Неседиментируемая активность	$0,36 \pm 0,01$	$0,49 \pm 0,02^*$	$0,38 \pm 0,02^{**}$
Полосатое тело			
Свободная активность	$0,76 \pm 0,02$	$1,26 \pm 0,02^*$	$1,16 \pm 0,05$
Связанная активность	$0,98 \pm 0,01$	$0,44 \pm 0,01^*$	$0,47 \pm 0,02$
Неседиментируемая активность	$0,27 \pm 0,01$	$0,42 \pm 0,01$	$0,25 \pm 0,02^{**}$

Примечание. * $p < 0,05$ по сравнению с контролем; ** $p < 0,05$ по сравнению с адrenaлэктомией

Таким образом, в изменении активности ферментных систем лизосом мозга при избытке и недостатке кортикостероидов в организме важная роль принадлежала нарушениям проницаемости мембран, на что указывали изменения соотношения между свободной, связанной с мембранами и неседиментируемой активностями ферментов.

Определяющим моментом в характере изменений активности лизосомных ферментов мозга в ответ на введение гидрокортизона является

продолжительность действия гормона на нервные клетки, а также функционально-метаболический фон, на котором проявляется действие гормона. Так, характер изменений активности лизосомных ферментов при однократном введении гидрокортизона интактным крысам отличается от такового у адреналэктомированных животных. Через 4 ч после введения гидрокортизона интактным крысам было выявлено повышение неседиментируемой активности кислой протенназы коры мозга—то есть гормон, надо полагать, оказывал лабильзирующее действие на фермент. Вместе с тем через 4 ч после введения гидрокортизона адреналэктомированным крысам наблюдалось стабилизирующее действие гормона на кислую протенназу коры мозга, что проявлялось в снижении неседиментируемой активности фермента.

Как указывалось выше, кислая протенназа мозга принимает активное участие в образовании и инактивации ряда гормонов и других нейропептидов.

Таблица 4

Фосфатазная активность мозга крыс после адреналэктоми и введения адреналэктомированным крысам гидрокортизона (шмоль п-нитрофенола/мин/1 мг ткани, n=4—5)

Условия опыта	Контроль	Адреналэк- томия	Адреналэк- томия + гид- рокортизон
Кора больших полушарий мозга			
Общая активность Неседиментируемая активность	2,54±0,05	2,64±0,16	3,34±0,19**
	0,48±0,02	0,58±0,02*	0,62±0,02
Гипоталамус			
Общая активность Неседиментируемая активность	2,85±0,07	3,02±0,07	3,69±0,14**
	0,53±0,02	0,55±0,05	0,60±0,02
Гиппокамп			
Общая активность Неседиментируемая активность	2,71±0,12	2,69±0,02	3,34±0,17**
	0,50±0,02	0,60±0,02*	0,69±0,05
Полосатое тело			
Общая активность Неседиментируемая активность	2,45±0,07	2,30±0,09	3,07±0,05**
	0,50±0,02	0,60±0,02*	0,53±0,03

Примечание. *p<0,05 по сравнению контролем; **p<0,05 по сравнению с адреналэктомией

В настоящее время радиоиммунологическими методами установлена внегипофизарная локализация β-лишотропина, эндорфинов, АКГГ [28, 29], ангиотензиногена [30] и других биологически активных пептидов в различных участках мозга, включая и изученные в данной работе кору больших полушарий и лимбические структуры мозга.

В литературе имеются указания на возможность функциональной взаимосвязи между кортикостероидами и различными нейропепти-

дами [31]. Так, при нарушении гормонального равновесия в системе гипоталамус—гипофиз—кора надпочечников у больных болезнью и синдромом Иценко—Кушинга, а также у животных после адrenaлэктомии или введения кортикостероидов, в гипофизе и мозгу наблюдаются изменения содержания β -липотропина, β -эндорфина, энкефалинов, кортиколиберина, АКГГ, ангиотензиногена и других пептидов [12, 32—35].

Следовательно, полученные в настоящем исследовании результаты свидетельствуют о возможном вовлечении ферментов лизосомного аппарата клеток головного мозга, особенно его лимбических структур, в нейрорхимические механизмы влияния гормонов коры надпочечников на обмен биологически активных пептидов в ЦНС, а также об их значении в реализации обратных связей в гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковом комплексе.

RAT BRAIN LYSOSOMAL ENZYMES AND ADRENAL HORMONES LEVELS

KALINSKAYA L. N., KONONENKO V. Y.

Institute of Endocrinology and Metabolism, Ukrainian SSR
Academy of Sciences, Kiev

The activities of acid proteinase and phosphatase have been studied in homogenates and subcellular fractions of rat cerebral cortex, hypothalamus, hippocampus and striatum after adrenalectomy and hydrocortisone administration to intact and adrenalectomized rats.

It has been shown that after hydrocortisone administration to intact rats the changes in the activities of both lysosomal enzymes in the cerebral cortex differ from those in limbic structures and depend significantly on the duration of the hormone action.

Following adrenalectomy there is an activation of lysosomal enzymes. In all brain areas studied an increase in a free nonsedimentated acid proteinase and a decrease in its bound activity as well as an increase in non-sedimentated activity of acid phosphatase have been registered. Hydrocortisone administration to adrenalectomized rats decreases acid proteinase release from lysosomes.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Mc Ilwain H. *Essays Biochem.*, 7, 127—158, 1971.
2. Колиссаренко В. П., Конюненко В. И. *Вестн. АМН СССР*, 7, 37—43, 1980.
3. De Duve C., de Barse T., Poole B., Trouet A., Tulkens P., Van Hoof F. *Biochem. Pharmacol.*, 23, 18, 2495—2531, 1974.
4. Szego C. M. *Recent Prog. Horm. Res.*, 30, 171—233, 1974.
5. Сергеев П. В., Кольчинская Т. А. *Пробл. эндокринолог.*, 19, 4, 96—100, 1973.
6. Chertow B. S., Buchanan W. E., Mayron M. S., Schwartz Th. B. *Endocrinology*, 92, 3, 722—727, 1973.
7. Bauer K.—In: *Brain and Pituitary Peptides. Ferring Symp.* Munich, p. 213—222, 1979.
8. Galoyan A. A., Akopyan T. N., Karapetyan R. O., Arutunyan A. A., Oganisssyan

- A. I.—In: Endorphins' 78, Int. Workshop Conf., Budapest, 1978, p. 37—59, Budapest, 1978.
9. Арутюнян А. А., Акопян Т. Н., Оганисян А. И., Галфаян В. Т., Галоян А. А. Вопросы биохимии мозга, 14, с. 51—57, 1980.
 10. Morris B. J., Reid I. A. Endocrinology, 103, 4, 1289—1296, 1978.
 11. Marks N., Subar A., Benuck M., Neural Peptides and Neuronal Commun. Proc. 2nd Symp., Gardone, 1, 1979, New York, p. 205—217, 1980.
 12. Buckingham J. C. J. Physiol., 290, 2, 331—342, 1979.
 13. Нечаева Г. А. Биохимия, 37, 3, 515—519, 1972.
 16. Сергеев П. В., Дунаев В. Г., Ницога В. Д. Фармакол. и токсикол., 41, 4, 445—450, 1978.
 15. Wykoff M. H. Health Phys., 23, 1, 115—116, 1972.
 16. Сергеев П. В., Дунаев В. Г., Ницога В. Д. Фармакол. и токсикол., 41, 4, 445—450, 1978.
 17. Anson M. L. J. Gen. Physiol., 22, 79—89, 1938.
 18. Покровский А. А., Шербакова А. И.—В кн.: Современные методы в биохимии (под ред. Ореховича В. Н.), М., Наука, с. 44—46, 1968.
 19. Ойвин Н. А. Патол. физиол. и эксперим. терапия, 4, 76—85, 1960.
 20. Kidson C. Nature, 213, 779—792, 1967.
 21. Clarke C., Wills E. D. J. Steroid Biochemistry, 9, 135—139, 1978.
 22. Калинин Л. Н. Автореф. канд. дис., Киев, с. 31, 1979.
 23. Карапетян Л. А., Захарян Р. А., Саакян Ф. М., Галоян А. А., Ж. эксперим. и клин. мед., 14, 3, 3—6, 1974.
 24. Kuaw A., Mollors A. Canad. J. Biochem., 50, 20—24, 1972.
 25. Гандельман Л. Ш. Цитология, 17, 1, 5—14, 1975.
 26. Маянская Н. Н., Пакин Л. Е. Успехи совр. биол., 92, 1/4, 64—80, 1981.
 27. Phillip Babu, Kurup P. A. Indian J. Biochem. and Biophys., 15, 3, 193—195, 1978.
 28. Krieger D. T., Liotta A. S. Science, 205, 4104, 3, 366—372, 1979.
 29. Исаечков В. А., Кривошеев О. Г., Бадосов Е. П., Веселова С. П.—В кн.: Второй Всес. съезд эндокринологов, Ленинград, с. 291, 1980.
 30. Lewicki J. A., Fallon J. H., Printz M. P. Brain Res., 158, 2, 359—371, 1978.
 31. Holaday J. W., Law P. V., Loh H. H., Li C. H. J. Pharmacol. and Exp. Ther., 208, 2, 176—183, 1979.
 32. Gibson A., Ginsburg M., Hart S. I., Kitchen I. Brit. J. Pharm., 66, 1, P130 1979.
 33. Suda T., Abe Y., Demura H., Demura R., Shizume K., Tamahashi N., Sasano N. J. Clin. Endocrinol. and Metabol., 49, 3, 475—477, 1979.
 34. Tsong L. F., O'Rourke M. A., Li C. H., Loh H. H. Int. J. Peptide and Protein Res. 14, 3, 213—215, 1979.
 35. Wallis C. J., Printz M. P. Endocrinology, 106, 1, 337—342, 1980.

Киевский научно-исследовательский институт
эндокринологии и обмена веществ МЗ УССР

Поступила 2. II 1983

ВЛИЯНИЕ 6-ОКСИДОФАМИНА НА СОДЕРЖАНИЕ КАТЕХОЛАМИНОВ И ДНК НЕОКОРТЕКСА И СТЕВЛОВОЙ ЧАСТИ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

ТРЕТЬЯК Т. М., СМИРНОВА Г. Н., СЕМЕНОВА Т. П., ГРИШЕНКО Н. И.

Использование 6-оксидофамина в целях химической десимпатизации, помимо решения вопроса о значении катехоламинергической системы мозга вообще, оказалось сопряженным с проблемой регенерации и развития структур ЦНС. Большинство исследователей полагают, что введение нейротоксина на ранних сроках развития животных вызывает разрушение нервных окончаний. Другим исследователям удалось установить, что 6-оксидофамин является также причиной гибели тел норадренергических клеток мозга. Так, подсчет числа клеток в locus coeruleus у хемдепривированных крысят выявил резкое снижение их количества—на 90% по сравнению с нормой [1].

Было замечено, что при введении крысам 6-оксидофамина в ранние сроки постнатального развития вслед за резким падением содержания катехоламинов наступает некоторая компенсация в уровне нейромедиаторов катехоламинергической природы. Микроскопическая картина свидетельствовала о частичном восстановлении терминалей в клетках мозга, наблюдалось разрастание гладкого ретикулума по направлению к митохондриям [2]. К 21-му дню после инъекции нейротоксина возрастала активность тирозингидроксилазы в телах нейронов, вслед за этим увеличивался синтез норадреналина [3].

Было сделано предположение, что в основе пластических процессов, обеспечивающих необходимый для жизни животного уровень синтеза медиаторов, лежит адекватное изменение активности ядерного аппарата сохранивших жизнеспособность нервных клеток. В данной работе мы попытались сопоставить следствие прямого действия нейротоксина на КА-ергические нейроны с содержанием ДНК в хроматине клеток «заинтересованных» структур.

Новорожденным крысятам линии Вистар вводили 6-оксидофамин в дозе 100 мг/кг однократно под кожу спины в 1, 2, 3 дни постнатального развития. На биохимический анализ брали мозг крыс, декапитированных в возрасте 25 дней, 4 и 6 месяцев. В холодильной камере при 0° вы-

Таблица 1

Содержание моноаминов в головном мозгу крыс после введения 6-оксидофамина

Возраст		Содержание норадрена-лина нг/мг ткани		Содержание дофамина нг/мг ткани		Содержание серотонина нг/мг ткани	
		кора	ствол	кора	ствол	кора	ствол
25—26 дней	Контроль n=5	0,490±0,036	0,490±0,030	0,870±0,040	0,820±0,025	0,440±0,036	0,800±0,020
	Опыт n=4	0,145±0,055	0,230±0,020	0,150±0,025	0,340±0,060	0,445±0,005	0,740±0,034
	Изменение содержания моноаминов, %	-70,5	-54%	-83	-59	+1	-7,5
4 мес.	Контроль n=3	0,510±0,028	0,390±0,030	0,920±0,035	0,890±0,040	0,610±0,040	0,830±0,054
	Опыт n=2		0,220±0,020		0,350±0,025	0,570±0,008	0,870±0,020
	Изменение содержания моноаминов, %	-100	43,6	-100	-61	-6,6	+4,8
6 мес.	Контроль n=4	0,20±0,065	0,330±0,020	—	—	0,620±0,060	0,600±0,015
	Опыт n=5	0,170±0,038	0,230±0,025	—	—	0,620±0,000	0,720±0,038
	Изменение содержания моноаминов, %	67,6	30,3	—	—	0	+20

деляли неокортекс и стволовую часть. Исследуемую ткань (200—300 мг) гомогенизировали на холоду в стеклянном гомогенизаторе с притертым пестиком. Анализ норадреналина, дофамина и серотонина проводили спектрофлуориметрически [4]. Содержание моноаминов регистрировали на спектрофлуориметре «Perkin—Elmer MPF—44B». Данные по анализу содержания норадреналина, дофамина и серотонина в структурах головного мозга крыс, подвергнутых воздействию 6-оксидофамина, представлены в табл. 1. Введение нейротоксина вызывало резкое и устойчивое в течение всего наблюдаемого периода падение содержания норадреналина и дофамина в неокортексе и стволовой части мозга. Наиболее выражено было снижение норадреналина в неокортексе, оно держалось в течение 4 месяцев наблюдений, а затем начиналось медленное восстановление уровня нейромедиатора. В стволовой части мозга уменьшение количества норадреналина не столь интенсивно: уровень его снижался примерно в 2 раза и оставался таковым в течение 6 месяцев. Количество дофамина из-за введения нейротоксина особенно сильно падало в коре, а в стволе его количество снижалось примерно наполовину. Введение 6-оксидофамина не отражалось на количестве серотонина, которое было неизменным в исследованных структурах в течение всего периода наблюдений.

Как уже упоминалось, снижение катехоламинов в мозгу в результате введения 6-оксидофамина большинство исследователей связывали с его разрушающим действием на терминалы катехоламинергических клеток [2, 5]. Sievers и соотр. обнаружили, что доза 6-оксидофамина, равная 100 мг/кг, введенная в желудочки мозга новорожденных крысят, повреждает не только терминалы и КА-ергические нейроны, но также глиальные и гранулярные клетки коры мозжечка, клетки мягкой мозговой оболочки и, что следует отметить особо, элементы серотонинергического пути [6]. В работе не приводится гистологический анализ поврежденных структур мозга, поэтому мы ссылаемся на данные литературы, объясняющие развитие компенсации в содержании катехоламинов за счет развития коллатералей со стороны проксимального конца аксона, то есть «спрутинга».

Количественный анализ ДНК, выполненный по методике Karsten, Wollenberger [7], используется в настоящее время довольно широко для определения содержания нуклеиновых кислот в различных тканях [8, 9]. С помощью этого метода было проследжено изменение содержания ДНК в клетках структур мозга, подвергнутых воздействию нейротоксина на ранних сроках постнатального развития крыс. Навеска структур мозга, взятых для этого анализа, составляла 30—50 мг. Интенсивность флуоресценции измеряли на микрофлуоресцентной установке [10]. Вклад РНК при суммарной оценке содержания нуклеиновых кислот устранялся за счет обработки хроматина РНКазой. Эти результаты (табл. 2), свидетельствующие об уменьшении количества ДНК в структурах мозга депривированных животных, хорошо согласуются с исследованиями, обнаружившими деструкцию и гибель КА-ергических ней-

ронов вследствие введения 6-оксидофамина. Уменьшение КА-ергических нейронов и, как результат этого, снижение уровня нейромедиаторов является, по-видимому, причиной нарушения клеточного и тканевого метаболизма, так как, по многочисленным наблюдениям, катехоламины выполняют роль специфических регуляторов в целом ряде метаболических путей и функционально значимых биохимических реакций [8, 9, 11—13].

Таблица 2

Содержание ДНК в хроматине клеток неокортекса и стволовой части мозга крыс после введения 6-оксидофамина (6-ОИДА)

Вид опыта	Возраст крыс	Неокортекс (содержание ДНК мкг/мг ткани)*	Стволовой отдел (содержание ДНК мкг/мг ткани)
Введение 6-ОИДА n=3	25 дней	0,560	0,690
Контроль n=5	25 дней	0,834	0,839
Введение 6-ОИДА n=3	4 мес.	0,615	0,647
Контроль n=3	4 мес.	0,802	0,830

* представлены средние арифметические значения результатов, полученных в опытах

Известно направление работ, обнаруживающее участие катехоламинов в морфогенезе [14, 15] и дифференцировке [16], «медиаторную» функцию нейротрансмиттеров рассматривал Коштоянц [17]. Рядом физико-химических исследований выявлена возможность ковалентного взаимодействия аминогрупп катехоламинов и остатков фосфорной кислоты ДНК [18]. Предшественник норадреналина L-ДОФА при внутрибрюшинном введении проникает в клетки мозга и вступает во взаимодействие с кислыми белками хроматина. Использование строго определенной дозы ДОФА стимулирует акцепцию хроматиновыми белками меченой аминокислоты [19].

Результаты исследований и приведенные здесь данные литературы свидетельствуют о способности КА участвовать в ключевых макромолекулярных процессах, происходящих в клетках мозга, наряду с их традиционной ролью в проведении нервного импульса.

INFLUENCE OF 6-HYDROXYDOPAMINE ON THE CATECHOLAMINE AND DNA CONTENT IN RAT NEOCORTEX AND BRAIN STEM

TRETJAK T. M., SMIRNOVA G. N., SEMENOVA T. P., GRISHCHENKO N. L.

Institute of Biological Physics, USSR Academy of Sciences, Poustchino

The administration of 6-OHDA sharply decreased the level of serotonin and dopamine in neocortex and brain stem in new born rats and

also DNA content in these areas. These changes preserved for 4 experimental months. Data obtained point to the fact that changes in neurotransmitters' content affect DNA synthesis in brain cells.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lanfumly L., Arluison W., Adrien J. *Brain. Res.*, 214, 2, 445—450, 1981.
2. Huang B. H., Yew Y., Williams T. H. *Cell and Tissue Research*, 206, 1, 41—53, 1980.
3. Acheson A. L., Zigmond M. J., Stricker E. M. *Science*, 207, 4430, 537—539, 1980.
4. Козан Б. М., Нечаев Н. В. *Лаб. дело*, 5, 301—303, 1979.
5. Bloom F. E., Algeri S., Groppe A., Revuelta A., Costa E. *Science*, 166, 3910, 1284—1286, 1969.
6. Sievers J., Klemm H. P., Jenner S., Baumgarten H. G., Berry M. *J. Neurochem.*, 34, 4, 765—771, 1980.
7. Karsten U., Wollenberger A. *Anal. Biochem.*, 46, 135—148, 1972.
8. Карнаухов В. Н. Люминесцентный спектральный анализ клетки, М., Наука, с. 93, 1978.
9. Колесников В. А., Сондоре О. Ю., Федосеева Г. Е., Зеленин А. В. *Цитология*, 21, 9, 1029—1035, 1979.
10. Иванов В. А., Терпиловская О. Н., Третьяк Т. М., Смирнова Г. Н. *Биохимия*, 47, 3, 398—404, 1982.
11. Angerer L. M., Georghion S., Moudrianakis E. N. *Biochemistry*, 13, 6, 1075—1081, 1974.
12. Краена В. С., Бару А. М. *Укр. биохим. ж.*, 53, 5, 60—64, 1981.
13. Третьяк Т. М., Архипови Л. В., Иванов В. А. *ДАН СССР*, 257, 5, 1262—1264, 1981.
14. Weiss B. F., Munro H. N., Ohdonez L. A., Wurtman R. I. *Science*, 177, 4049, 613—616, 1972.
15. Сахров Д. А. *Генеалогия нейронов*, М., Наука, 1974.
16. Taub F., Johnson T. C. *Biochem. J.*, 151, 1, 173—180, 1975.
17. Коштоянц Х. С. *Проблемы энзимохимии процессов возбуждения и торможения и эволюции функций нервной системы*, М., Изд-во АН СССР, 1963.
18. Божко Г. Х., Веркин Б. И., Переверзев П. Г., Вансев В. А. *Укр. биохим. ж.*, 44, 4, 468, 1972.
19. Бузников Г. Н. *Низкомолекулярные регуляторы зародышевого развития*, М., Наука, 1967.

Институт биологической физики
АН СССР, Пущино

Поступила 13. VI 1983

УДК 577.15+577.3+591.39

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА NAD- И NADP-ЗАВИСИМЫХ ИЗОЦИТРАТДЕГИДРОГЕНАЗ В ТКАНИ МОЗГА КУР В ОНТОГЕНЕЗЕ

АРУТЮНЯН Л. А., СИМОНЯН А. А., СИМОНЯН Р. А.

Ткань мозга, как и большинство тканей животных, содержит две изоцитратдегидрогеназы, отличающиеся по коферментной специфичности, конформационным и кинетическим характеристикам, особенностям локализации и функционирования в клетке. NAD-зависимая изоцитратдегидрогеназа (NAD-ИЦДГ; КФ 1. 1. 1. 41) локализуется исключительно в митохондриальной фракции; очищенный фермент из ткани мозга имеет $M_{260-310}$ кД[1]. NADP-зависимая изоцитратдегидрогеназа (NADP-ИЦДГ; КФ 1. 1. 1. 42), обнаруженная как в цитоплазме, так и в митохондриях ткани мозга [2], существует в мономерной и димерной формах [3].

Неодинаковы функции изоцитратдегидрогеназ в клеточном метаболизме. NAD-ИЦДГ рассматривается как «истинный компонент» цикла Кребса; участие же митохондриальной NADP-ИЦДГ в энергетическом метаболизме, как полагают, опосредовано через NADP:NAD трансгидрогеназную реакцию (NADP:NAD-оксидоредуктаза, КФ 1. 6. 1. 1.) [4]. Основная функция цитоплазматической NADP-ИЦДГ связывается с генерированием NADPH, необходимого для различных биосинтетических процессов.

Функциональные различия двух форм изоцитратдегидрогеназ обуславливают интерес к сравнительному исследованию их активности для выявления сдвигов в соотношении окислительных и биосинтетических реакций в тканях животных в ходе онтогенеза. Имеющиеся в литературе данные относительно изоцитратдегидрогеназной реакции в ткани мозга касаются преимущественно млекопитающих и охватывают в основном постнатальный период их развития [2, 5, 6]. Нас интересовало сопоставление характера течения этой реакции в ходе эмбрионального и постэмбрионального развития животных. Исходя из этого, была изучена динамика активности двух форм изоцитратдегидрогеназ в ткани мозга кур в ходе онтогенеза.

Опыты проводили на эмбрионах (10-дневных—предплодный период; 15-дневных—плодный период; 20-дневных—период выдупления),

5-дневных цыплятах (ранний постнатальный период) и зрелых курах.

Митохондриальные фракции головного мозга выделяли в 0,25 М растворе сахарозы. Промытые митохондрии разрушали добавлением 0,2%-ного тритона X-100. Обработанную тритоном митохондриальную фракцию центрифугировали при 45 000 г в течение 1 ч для осаждения митохондриальных мембран. Цитоплазматическую фракцию получали часовым центрифугированием постмитохондриального супернатанта при 100 000 г для освобождения от микросомных частиц [5].

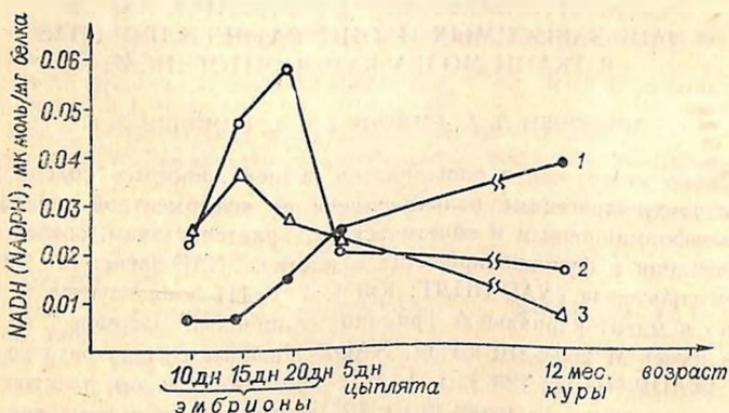


Рис. 1. Изменение активности NAD- и NADP-ИЦДГ в субфракциях мозга кур в онтогенезе (в мкмоль NADH (NADPH) / мг белка/мин). 1—митохондриальная NAD-ИЦДГ; 2—митохондриальная NADP-ИЦДГ; 3—цитоплазматическая NADP-ИЦДГ

Определение активности NAD-ИЦДГ проводили в среде следующего состава (в мМ): трис-НСl—50 (рН 7,0), MgSO₄—10, ЭДТА—0,2. NAD добавляли в количестве 1,2 мМ, ADP и изоцитрат—по 2 мМ (конечные концентрации) [7]. Объем проб—2 мл.

Реакционная среда для определения активности NADP-ИЦДГ содержала (в мМ): трис-НСl—50 (рН 8,5), MnCl₂—2, ЭДТА—0,2. NADP добавляли в количестве 1 мМ, изоцитрат—2 мМ (конечные концентрации) [6]. Объем проб—2 мл.

Активность изоцитратдегидрогеназ определяли по образованию восстановленных форм коферментов при 340 нм на спектрофотометре марки «Spesord UV Vis» и выражали в мкмоль NADH (NADPH)/мг белка/мин. Белок определяли биуретовым методом [8].

В отдельной серии опытов изучали влияние рН среды на активность изоцитратдегидрогеназ.

Результаты исследований показали (рис. 1), что активность NAD-ИЦДГ в митохондриях мозга куриных эмбрионов начинает повышаться только со стадии вылупления и далее прогрессивно возрастает по мере созревания животных, составляя в мозгу зрелых кур более 60% от общей изоцитратдегидрогеназной активности. Активность NADP-ИЦДГ в

субфракциях мозга в эмбриональном периоде развития значительно превышает таковую NAD-ИЦДГ. В плодном периоде уровень обеих NADP-ИЦДГ в мозгу повышается, что особенно выражено в отношении митохондриального фермента, активность которого достигает максимальной величины на стадии вылупления. В раннем постнатальном периоде активность NADP-ИЦДГ в митохондриях резко падает и далее наблюдается постепенное снижение уровня обеих NADP-ИЦДГ в ткани мозга кур.

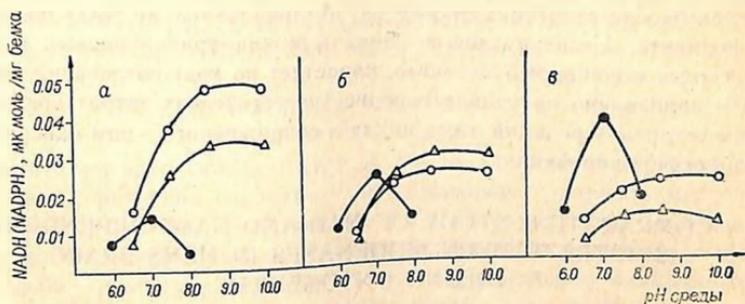


Рис. 2. Влияние рН среды на активность NAD- и NADP-ИЦДГ в ткани мозга кур в онтогенезе (в мкмоль NADH (NADPH) / мг белка/мин). а—20-дневные эмбрионы; б—5-дневные цыплята; в—куры. Обозначения те же, что и на рис. 1

Из приведенных на рис. 2 данных виден неодинаковый характер влияния рН среды на активность различных изоцитратдегидрогеназ. Для всех изученных возрастных групп обнаружена четкая зависимость активности NAD-ИЦДГ от рН инкубационной среды, с оптимумом при 7.0. По данным ряда авторов, эффект рН связан с воздействием на аллостерические свойства фермента [7]. Что касается NADP-ИЦДГ, то изменение ее активности наблюдается при повышении рН среды до 8,5 и проявляется заметнее в эмбриональной стадии развития.

Высокий уровень NADP-ИЦДГ в обеих фракциях мозга курных эмбрионов свидетельствует о ее активном участии в осуществлении связи между промежуточными продуктами цикла Кребса и аминокислотным и липидным метаболизмом, интенсивно протекающим в мозгу незрелых животных [9].

Представляет интерес динамика активности NAD-ИЦДГ в развивающемся мозгу кур. Ее повышение в митохондриях мозга совпадает с другими возрастными изменениями: образованием синапсов, синтезом миелина, появлением электрической активности, повышением Na^+ , K^+ -АТФазной активности. Эта морфологическая и физиологическая дифференциация взаимосвязаны с течением основного метаболизма и, в частности, с уровнем активности специфических энзиматических звеньев, контролирующих трикарбоновый цикл. NAD-ИЦДГ в митохондриях находится под аллостерическим контролем ADP, вызывающей кон-

формационные изменения фермента, повышающие его сродство к субстрату [10]. Снижение в митохондриях уровня АТФ приводит к ускоренному прохождению изоцитрата через цикл и, следовательно, увеличению потока электронов через дыхательную цепь и поддержанию энергетического баланса клетки. Проведенное сравнительное исследование активности двух изоцитратдегидрогеназ в ткани мозга кур в онтогенезе показало превалирование активности NADP-зависимого фермента на эмбриональной стадии развития, что связано с его ролью в течении биосинтетических процессов; активирование же NAD-зависимого фермента, лимитирующего скорость цикла трикарбоновых кислот, происходит в конце эмбриогенеза, нарастает по ходу созревания животных и направлено на удовлетворение энергетических затрат организма путем ускорения реакций этого цикла и сопряженного с ним окислительного фосфорилирования.

A COMPARATIVE STUDY OF NAD-AND NADP-DEPENDENT ISOCITRATE DEHYDROGENASES IN HENS BRAIN DURING ONTOGENESIS

HAROUTJUNIAN L. A., SIMONIAN A. A., SIMONIAN R. A.

The activities of NAD- and NADP-dependent isocitrate dehydrogenases (NAD-IDH, NADP-IDH) were investigated in hen brain subcellular fractions during embryonal and postnatal development. It was shown that NAD-IDH activity in brain mitochondria rose during hatching and was maximal in mitochondria of adult brain. The activity of NADP-IDH in mitochondria and cytoplasm of embryonal brain is higher, than that of NAD-IDH, then it increased until the period of hatching, especially in mitochondria with subsequent decrease in adult brain.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Willson V. J. C., Tipton K. F. *J. Neurochem.*, 33, 1239—1247, 1973.
2. Loverde A. W., Lehrer G. H. *J. Neurochem.*, 20, 441—448, 1973.
3. Dalziel K. *FEBS Lett*, 117, suppl., 45—55, 1980.
4. Stein A. M., Stein J. H., Kirkman S. K. *Biochemistry*, 6, 1370—1379, 1967.
5. Watanabe T., Goto H., Ogasawara N. *Biochem. Biophys. Acta*, 358, 240—246, 1974.
6. Прохорова М. И., Путилина Ф. Е., Ещенко Н. Д. *Вопросы биохимии мозга*, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 9, с. 211—218, 1974.
7. Willson V. J. C., Tipton K. F. *Eur. J. Biochem.*, 109, 411—416, 1980.
8. Itzhaki R. F., Gill D. M. *Analyt. Biochem.*, 9, 401—410, 1964.
9. Gonzalez-Ros J. M., Ribera A. *Lipids*, 15, 279—284, 1980.
10. Willson V. J. C., Tipton K. F. *J. Neurochem.*, 4, 793—799, 1980.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Поступила 3. II 1983

УДК 591.18:575

АКТИВНОСТЬ ТРИПТОФАНГИДРОКСИЛАЗЫ В ГОЛОВНОМ МОЗГУ МЫШЕЙ

КУЛИКОВ А. В., ПОПОВА Н. К.

Триптофангидроксилаза (КФ. 1.14.16.4)—ключевой фермент биосинтеза серотонина—является естественным маркером нейронов серотониновой системы. Его локализация в головном мозгу связана с распределением перикарионов и окончаний серотониновых нейронов [1]. Триптофангидроксилаза синтезируется в перикарионах, находящихся, главным образом, в ядрах шва среднего мозга, откуда фермент аксональным транспортом перемещается в другие отделы мозга, иннервируемые серотониновыми нейронами [2]. Показано, что активность триптофангидроксилазы в отделах мозга, богатых перикарионами серотониновых нейронов (средний мозг, гипоталамус), гораздо выше, чем в области их окончаний (кора полушарий, гиппокамп) [3]. Однако связи между активностью фермента в этих образованиях не обнаружено [3]. Не ясно также, является триптофангидроксилаза в перикарионах и нервных окончаниях одной и той же формой фермента [4].

Целью настоящей работы является изучение активности триптофангидроксилазы в структурах мозга, богатых перикарионами серотониновых нейронов, и в области их окончаний.

Исследования проводили на половозрелых 2—3-месячных самцах мышей массой 25 г семи инбредных линий. На линиях BALB/c(C) и C57BL/6J(B6) был проведен гибридологический анализ и получены реципрокные гибриды первого $(C \times B6) \times (B6 \times C)$ и второго поколений $(B6 \times C) \times (B6 \times C)$. Мышей отсаживали от матерей и выращивали группами по 10 особей. За три дня до забоя животных рассаживали в отдельные клетки, чтобы исключить влияние группового эффекта.

Мышей декапитировали в утренние часы до кормления, быстро на холоду извлекали мозг, выделяли ствол и полушария и помещали в жидкий азот. Ствол головного мозга, включающий средний мозг, продолговатый мозг, таламус и гипоталамус, был выбран как отдел, содержащий перикарионы серотониновых нейронов, в то время как полушария, включающие кору, гиппокамп и полосатое тело,—как область окончаний серотониновых нейронов.

Отделы мозга гомогенизировали в 0,5 мл холодного 0,05 М триацетатного буфера, pH 7,5, содержащего 0,01 М 2-меркаптоэтанола.

Гомогенаты центрифугировали 30 мин при 20 000 г. Активность фермента определяли в надосадочной жидкости по методу Куликова [5] при концентрации субстрата—L-триптофана, равной 8×10^{-4} М, и в присутствии кофактора 6,7-диметилтетрагидроптеридина («Calbiochem»). Содержание белка в пробах определяли по Lowry [6]. Активность фермента выражали в пмоль продукта—5-окситриптофана/мг белка/мин.

Статистическая обработка проводилась с использованием корреляционного анализа и t-критерия Стьюдента [7].

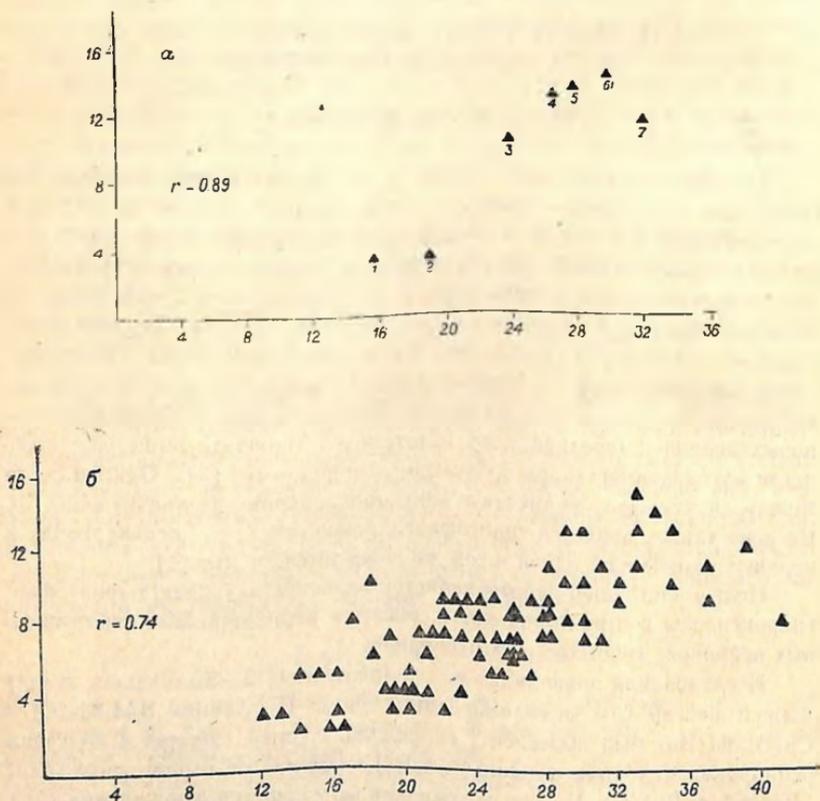


Рис. Корреляция между активностью триптофангидроксилазы в стволе и полушариях головного мозга у инбредных мышей (а) и гибридов второго поколения между линиями BALB/c и C57BL/6J (б). Треугольниками обозначены линии мышей: 1—DBA1, 2—BALB/c, 3—DD, 4—AKR/J, 5—СЗН/He, 6—СВА, 7—С57BL/6J. По оси абсцисс—активность триптофангидроксилазы в стволе головного мозга; по оси ординат—в больших полушариях головного мозга белка (в пмоль 5-окситриптофана/мг белка/мин)

В таблице приведены значения активности триптофангидроксилазы в стволе и полушариях головного мозга у мышей семи инбредных линий. Активность фермента в полушариях у всех изученных линий мышей ниже, чем в стволе, что хорошо согласуется с литературными данными,

полученными на других линиях мышей [3]. Более высокую активность триптофангидроксилазы в стволе головного мозга по сравнению с полушариями можно объяснить, исходя из морфоструктурных особенностей серотониновой системы. Серотонин головного мозга синтезируется, главным образом, в перикарионах серотониновых нейронов и, следовательно, этим обусловлена в них высокая активность фермента. В полушариях головного мозга триптофангидроксилаза доставляется аксональным транспортом. Это процесс медленный, и по мере продвижения фермент разрушается и теряет активность.

Таблица

Активность триптофангидроксилазы в стволе и полушариях головного мозга мышей

Линии	Активность фермента (пмоль/мг/мин)		Отношение ствол/полушария
	ствол	полушария	
DBA1	13,8±0,5 (4)	3,3±0,5 (1)	4,4±0,6 (4)
BALB/c	17,5±0,5 (26)	3,4±0,2 (14)	5,5±0,3 (14)
DD	25,1±1,1 (10)	10,3±1,8 (4)	2,9±0,7 (4)
AKR/J	26,0±1,0 (5)	13,2±0,4 (5)	2,0±0,1 (5)
C3H/He	27,7±1,2 (3)	13,7±1,9 (3)	2,1±0,3 (3)
CBA	28,9±0,7 (10)	14,0±0,7 (4)	2,1±0,2 (4)
C57BL/6J	32,0±0,8 (24)	11,4±0,6 (14)	3,2±0,2 (14)

Примечание. Цифры в скобках—число определений

Все изученные линии делятся на две, достаточно четко отличающиеся группы—с низкой и высокой активностями фермента. К первой группе относятся линии DBA1 и BALB/c, ко второй—все остальные. Для больших полушарий коры мозга характерна гораздо большая вариабельность, чем для ствола. Так, если активность фермента ствола головного мозга максимально различается в 2,5 раза, то в больших полушариях—в 4. Отношение между активностями фермента в стволе и в больших полушариях мозга наибольшее у линий первой группы—у них оно вдвое выше, чем у второй (таблица).

Отмечена коррелятивная связь между активностью фермента в этих двух отделах головного мозга. Так, у линий DBA1 и BALB/c она низка как в стволе, так и в больших полушариях головного мозга. Для линий DD, C3H/He, AKR/J, CBA и C57BL/6J характерна высокая активность фермента в обоих этих отделах. Коэффициент межлинейной корреляции (рис. 1, α) между этими признаками оказался значимым и положительным ($r=0,89$, $p<0,05$). Иными словами, определенному уровню активности триптофангидроксилазы—высокому или низкому—в стволе головного мозга мышей соответствует такой же уровень активности в больших полушариях.

Поскольку в основе различий между отдельными линиями лежат различия их генотипов, высокий коэффициент межлинейной корреляции позволяет предположить наличие общего генетического контроля активности триптофангидроксилазы в стволе и полушариях головного мозга.

Изучали взаимосвязь между этими признаками у гибридов второго поколения между контрастными по активности триптофангидроксилазы линиями BALB/c и C57BL/6J. Обнаружено, что коэффициент корреляции между активностью фермента в стволе и полушариях у гибридов второго поколения (рис. 1, б) высок ($r=0,74$, $p<0,01$).

Было установлено, что у гибридов первого поколения между линиями BALB/c и C57BL/6J корреляция между активностью фермента в стволе и больших полушариях отсутствует ($r=0,22$, $p>0,05$). Гибриды первого поколения между инбредными линиями являются генетически однородными и все разнообразие обусловлено средовыми воздействиями. Это свидетельствует о том, что корреляция между активностью триптофангидроксилазы в стволе и полушариях у гибридов второго поколения обусловлена межличинной (генотипической), а не внутрелинейной (средовой) корреляцией.

Полученные результаты еще раз подтверждают предположение о том, что корреляция между активностью триптофангидроксилазы в стволе и больших полушариях головного мозга генетически детерминирована. Четкая генетическая связь между активностями триптофангидроксилазы в этих структурах мозга дает основание предполагать, что активность фермента в них контролируется одним и тем же геном.

Рядом исследователей было показано, что триптофангидроксилаза в головном мозгу находится в двух формах: растворимой и связанной с синаптосомами. В областях, содержащих перикарiony серотониновых нейронов, преобладает растворимая форма, а в областях, богатых нервными окончаниями,—связанная [4]. Первоначально предполагали, что эти формы представляют различные изоферменты триптофангидроксилазы. Однако после того, как было показано, что, изменив способ выделения, можно перевести связанную форму в растворимую, возникли сомнения в правильности данного предположения [4]. Четкая генетически детерминированная коррелятивная связь между активностью триптофангидроксилазы в стволе и полушариях, несомненно, служит подкреплением для представления, что эти две формы не являются изоферментами.

TRYPTOPHAN HYDROXYLASE ACTIVITY IN MICE BRAIN

KULIKOV A. V., POPOVA N. K.

Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch Acad. Sci. USSR,
Novosibirsk

The activity of tryptophan hydroxylase has been determined in brain stem and hemispheres in male mice of 7 inbred strains and hybrids of the first and second generations between BALB/c and C57BL/6J strains. It was shown that the activity of tryptophan hydroxylase is 2—5-fold higher in the brain stem than in the hemispheres. The genetically

determined positive correlation between the enzyme activities in these areas of brain has been established. A common genetic control of tryptophan hydroxylase activity in brain stem and hemispheres was supposed.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Lovenberg W., Victor S.* Advances in Biochemical Psychopharmacology (E. Costa, G. L. Gessa, M. Sandler, eds.), N. Y., Raven Press, 10, p. 93—101, 1974.
2. *Meek J., Neff N. H.* J. Neurochemistry, 19, 1519—1525, 1972.
3. *Barchas J., Ciaranello B., Dominic J., Deguchi T., Orenberg E., Renson J., Kessler S.* Advances in Biochemical Psychopharmacology (E. Usdin, ed.), N. Y., Raven Press, 12, p. 195—204, 1974.
4. *Knapp S., Mandell A.* Life Sci., 16, 761—771, 1972.
5. *Кушкова А. В.* Вопросы мед. химии, 28, 135—139, 1982.
6. *Lowry O. H., Rosenbrough M. J., Farr A., Randall R. J. J.* Biol. Chem., 193, 265—275, 1951.
7. *Gál M.* Advances in Biochemical Psychopharmacology (E. Costa, G. L. Gessa, M. Sandler, eds.), N. Y., Raven Press, 11, p. 1—11, 1974.

Институт цитологии и генетики
СО АН СССР, Новосибирск

Поступила 14. VI 1982

ГЛУТАМАТНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ ЦНС: ОРГАНИЗАЦИЯ И ФУНКЦИИ

ДАМБИНОВА С. А.

В обзоре рассмотрены проблемы, касающиеся изучения структуры и функции глутаматных рецепторов (ГР) ЦНС, физико-химические и фармакологические свойства мембраносвязанных рецепторов глутамата. Обсуждены молекулярные характеристики выделенных и очищенных ГР и вопросы их реконструкции в искусственных липидных мембранах.

Предположено, что возникновение некоторых форм эпилепсии и паркинсонизма может быть связано с нарушением функции ГР в ЦНС.

Для выполнения высших психических (восприятие, эмоции, мышление) и сложных двигательных функций головного мозга человека необходимы бесперебойно работающие синапсы—межклеточные контакты. Химические процессы, происходящие на уровне синапсов, и особенности метаболизма нейромедиаторов в общих чертах изучены. Однако при длительном рассмотрении функций нейрона оказывается, что многие вопросы, касающиеся передачи и переработки сигналов, связаны с необходимостью исследования тонкой структуры и функции нейрональной мембраны, природы специфических мембранных белков нервных клеток. Возможно, что анализ свойств мембранных белков, в частности хеморецепторных комплексов, узнающих и связывающих нейромедиаторы, окажется тем ключом к пониманию интегративных функций нейрона, который позволит в дальнейшем установить взаимодействие нейронов и выяснить значения посылаемых ими сигналов.

Значительный интерес к медиаторной роли глутамата в последние годы обусловлен его выраженной способностью вызывать возбуждающий эффект у большинства нейронов позвоночных [1] и в первичных мышечных синапсах беспозвоночных [2].

Впервые возбуждающее действие глутамата на нейроны головного мозга было отмечено в 1956 г. Hayashi [3]. Позднее Krnjević и соавт. [4, 5], а затем и другие исследователи предположили, что глутамат является одним из естественных медиаторов в ЦНС, однако длительное время его роль в качестве природного нейромедиатора подвергали сомнению [6]. Основными причинами этого являлись, с одной стороны, отсутствие доказательств ферментативной деградации глутамата в синапсе, а с другой—кажущаяся «неспецифичность» действия этого медиатора. Впоследствии стало ясно, что ферментативное устранение глу-

тамата не имеет существенного значения в синапсах, и инактивация его происходит в основном за счет специфического обратного поглощения глутамата нейронами и глиальными клетками. Большое разнообразие нейронов, способных отвечать на действие глутамата возбуждением, обусловлено широким распространением глутаматергических путей в головном мозгу млекопитающих [7]. В настоящее время получены убедительные доказательства, свидетельствующие, что глутамат удовлетворяет всем основным требованиям, предъявляемым к классическим нейромедиаторам, и является одним из основных возбуждающих нейропередатчиков в ЦНС [8, 9]. Важнейшим из них явилось обнаружение специальных структур на постсинаптической мембране ГР.

Первыми исследователями, предположившими существование мембранных рецепторов для глутамата, управляющих электрической возбудимостью постсинаптических мембран, были Curtis и соавт. [10], которые показали, что только аппликация глутамата на поверхность клетки вызывала деполяризующий ответ нейрона. Введение же глутамата внутрь клетки не изменяло мембранный потенциал нейрона. Результаты последующих электрофизиологических исследований подтвердили реальность существования ГР и наличие их на мембранах нейронов моллюсков, мотонейронов, культивируемых срезах мозга и др. [11—14].

Основной функцией хеморецепторов, в частности ГР, является регуляция ионной проницаемости мембран нервных клеток и генерация возбуждающего или тормозного постсинаптического потенциала (ВПСП или ТПСР). При этом локальный электрический ток способен запустить общие механизмы электрогенеза нейрона [15]. Процесс генерации хемовозбудимого потенциала является многоступенчатым и сводится, по-видимому, к следующим элементарным актам [16]: 1) узнавание и связывание глутамата мембранным рецептором; 2) перестройка структуры рецептора, способствующая открыванию ионного канала; 3) избирательный транспорт ионов в клетку.

При исследовании структуры и функции ГР возникает ряд вопросов: какова молекулярная природа и топография рецепторов на мембране; выполняются ли регулирующие функции рецептора единым комплексом или они сопряжены с разными мембранными структурами; какие механизмы лежат в основе активации рецептора и регуляции его синтеза; каковы, наконец, последствия нарушения функции ГР в головном мозгу позвоночных.

Исследование рецепторных свойств хемовозбудимых мембран включает, как правило, идентификацию молекулярной природы рецептора, изучение его физико-химических и фармакологических характеристик как в мембраносвязанном, так и в солюбилизованном, очищенном состоянии, реконструкцию его в искусственных липидных мембранах и изучение ионофорных функций рецептора.

Для никотиновых холинорецепторных подобных задач в основном решены, хотя и нуждаются в дополнительных исследованиях [17, 18].

Успешный анализ свойств холинорецепторов позволил разработать методологию исследования структуры и функций любых мембранных рецепторных белков, но для ГР ЦНС это сопряжено с особыми трудностями.

Сложности изучения структуры и функции ГР, прежде всего, связаны с отсутствием специфических блокаторов, способных необратимо связываться с рецептором и служить в качестве метки. Наличие таких меток, как, например α -бунгаротоксин для никотиновых холинорецепторов, предопределяет прогресс в изучении природы и свойств рецепторных белков [19]. Анализ хеморецепторных свойств глутаматсвязывающих мембранных белков осложняется высокой метаболической активностью глутамата, наличием большого числа глутаматутилизующих ферментов, в том числе и синаптических (глутаматдекарбоксилаза, глутаминаза и др.), а также существованием процессов поглощения и транспорта этой аминокислоты в синапсе.

Однако ряд закономерностей функционирования ГР позвоночных и беспозвоночных установлен на основе изучения обратного связывания самого L-глутамата, его аналогов и антагонистов.

1. Физико-химические свойства мембраносвязанных ГР ЦНС.

ГР представляют собой генетически детерминированные структуры, расположенные на поверхности постсинаптических мембран и состоящие, как полагают, из двух структурных компонентов: глутаматсвязывающего участка и ионфорной структуры, регулирующей избирательный транспорт ионов [20].

Изучение первой ступени активации ГР—узнавание-связывание глутамата—традиционно проводится с использованием электрофизиологических методов регистрации ответов нервной клетки на аппликацию нейромедиатора [21—23]. Лишь теоретическая и экспериментальная разработки биохимических методов связывания лиганда позволили расширить методические подходы к анализу взаимодействия глутамата с рецептором.

Связывание ^3H -L-глутамата с синаптическими мембранами нервных клеток. При изучении взаимодействия глутамата с мембранным рецептором важно разграничивать истинное (рецепторное) связывание от специфического (метаболического) поглощения нейромедиатора плазматическими мембранами. Возможность различия этих участков между собой показал Roberts [24]. По аналогии связывания с ГАМК-рецепторами он предположил, что процессы специфического связывания и поглощения глутамата могут различаться по чувствительности к наличию в инкубационной среде Na^+ , что и было подтверждено дальнейшими экспериментами [25, 26].

Принято считать, что истинное рецепторное связывание ^3H -L-глутамата является Na^+ -независимым процессом, в то время как поглощение и транспорт этой аминокислоты происходят в присутствии высоких концентраций Na^+ [27, 28]. Изучение связывания радиоактивного глутамата обнаружило наличие глутаматсвязывающих участков

на синаптических мембранах, изолированных из разных структур головного мозга позвоночных [29, 30]. Характеристики взаимодействия глутамата с рецептором, описанные во многих работах, часто неоднозначны даже для одних и тех же структур головного мозга. Так, Shagif, Roberts [31] и Baudry, Lynch [32] предполагают существование одного типа Na^+ -независимых участков связывания для глутамата. Однако эти авторы приводят разные значения констант связывания K_d и V_{max} * для синаптических мембран, выделенных из коры и гиппокампа головного мозга крыс. В наших исследованиях [33] обнаружено, что Na^+ -независимое рецепторное связывание имеет однородную популяцию участков связывания с K_d около 100–130 нМ и $V_{\text{max}} = 1,8\text{--}2,5$ пмоль/мг белка, которые существенно не различаются у синаптических мембран, выделенных из коры гиппокампа головного мозга крыс. С другой стороны, ряд исследователей, например Michaelis и соавт. [34, 35], Biziere и соавт. [36], склоняются в пользу наличия двух типов Na^+ -независимых участков связывания на этих мембранах. Численные значения K_d и V_{max} , приведенные этими авторами, также отличаются друг от друга более чем на порядок.

При анализе кинетических зависимостей реакции связывания глутамата выявлены ее особенности в работах разных исследователей. Очевидно, что расхождения параметров связывания во многом определяются условиями выделения синаптических мембран и инкубации их с радиоактивным нейромедиатором. Кинетика связывания ^3H -L-глутамата с изолированными мембранами нервных клеток существенно зависела от состава инкубационной среды, времени и температуры инкубации, а также присутствия в среде одно- и двухвалентных катионов [37, 38], влияние которых на рецепторное взаимодействие глутамата с мембранами подробно рассмотрено в наших исследованиях и работах Baudry и соавт. [38–41].

Характер связывания радиоактивного глутамата в присутствии одновалентных катионов изменялся в зависимости от типа иона. Для Na^+ была обнаружена бифазная зависимость реакции связывания в широком диапазоне концентрации этого катиона [40]. Li^+ , Rb^+ , Cs^+ и K^+ обладали дозозависимым ингибирующим действием на связывание глутамата. Двухвалентные катионы, в частности Ca^{2+} и Mg^{2+} , оказывали стимулирующее действие на рецепторное связывание, причем Ca^{2+} в низких концентрациях заметно повышал количество связывающих участков без изменения константы сродства глутамата к рецептору [41]. Согласно предположению Baudry и соавт. [42, 43], Ca^{2+} регулирует активацию дополнительных участков связывания глутамата и участвует в повышении эффективности синаптической передачи в гиппокампе. Результаты наших экспериментов по изучению влияния двухвалентных катионов в целом совпадают с этими данными, что свидетель-

* K_d — константа диссоциации комплекса глутамат — рецептор; V_{max} — количество связывающих участков

ствуется о необходимости добавления Ca^{2+} в инкубационную среду при исследовании взаимодействия глутамата с рецептором [37]. Обнаружено, что одно- и двухвалентные катионы в концентрации 5—10 мМ увеличивали специфическое связывание в 2,1—3,3 раза. Na^+ в концентрации 100—150 мМ более чем в 3 раза увеличивал специфическое связывание, в его присутствии активировался второй тип участков связывания $^3\text{H-L-}$ глутамата с K_d 1,8—2,0 мкМ и V_{max} 45—50 пмоль/мг белка. Предполагается, что Na^+ -зависимое связывание относится к системам активного транспорта глутамата.

Обнаружено, что связывание $^3\text{H-L-}$ глутамата значительно снижается при замораживании мембран и длительном хранении [37]. Было предложено использовать слабое ультразвуковое воздействие мембран с последующей их промывкой. Оказалось, что в указанных условиях связывание радиоактивной метки возрастало почти в 34 раза. Дополнительное промывание синаптических мембран вызывало увеличение Na^+ -независимого связывания глутамата практически на 400%. Авторы предположили, что этот эффект связан с возможным действием эндогенного ингибитора, существование которого было подтверждено в последующих исследованиях [44, 45]. В настоящее время проводят изучение его природы и свойств [35]. Выявлено, что эндогенный ингибитор ГР термостабилен, имеет пептидную природу [45]. Выяснение роли предполагаемого ингибитора ГР важно для изучения механизмов его активации и природы активного центра рецепторного белка.

Связывание $^3\text{H-L-}$ глутамата с синаптическими мембранами является обратимым и легко замещается структурными аналогами глутамата (антагонистами и агонистами) [46-49]. Установлено, что связывание радиоактивного глутамата в наибольшей степени происходит на плазматических мембранах, тогда как в основных субклеточных структурах (митохондриях, ядрах, миелине и др.) были обнаружены лишь незначительные величины радиоактивности. Однако нельзя не учитывать данные о Na^+ -независимом связывании $^3\text{H-L-}$ глутамата с плазматическими мембранами легких и печени [50]. Возникает вопрос: соответствуют ли эти Na^+ -независимые участки связывания глутамата физиологическим ГР [33]? Однозначно ответить на него пока не представляется возможным. Однако по ряду приведенных выше данных, касающихся, например, специфичности, насыщенности, обратимости и субклеточного распределения, глутаматсвязывающие участки синаптических мембран обладают свойствами физиологических ГР.

Ионофорные свойства ГР ЦНС. Было установлено, что действие глутамата как нейромедиатора активирует специфический компонент макромолекулы ГР, с помощью которого ионы, направляемые электрохимическим градиентом, проникают через постсинаптическую мембрану [10, 51]. Этот компонент является, вероятно, ионным каналом. Предполагают, что хемовозбуждаемый ионный канал представляет собой белковую пору атомного масштаба, выстланную изнутри гидрофильными группами [52, 53].

Хемовозбудимые ионные каналы могут существовать в трех регистрируемых состояниях: открытом, закрытом и инактивированном (или десенситизированном) [18]. Можно представить, что рецепторный участок молекулы ГР и ионный канал объединены между собой и взаимодействуют аналогично регуляторной и каталитической субъединице фермента, как это предложено для комплекса холлинорецептор—ионный канал. В этом случае сродство нейромедиатора к рецептору может изменяться в зависимости от состояния хемовозбудимого канала, возрастающей от закрытого состояния ионного канала до инактивированного [18].

На основании анализа различных механизмов транспорта Na^+ в нейронах при индукции их глутаматом Teicheberg и соавт. [54, 55] предположили, что изменение ионной проницаемости, вызванное этим нейромедиатором, является слагаемым ряда процессов. С одной стороны, по-видимому, происходит индукция изменения активности Na^+ , K^+ -АТФазы и активация зависимых систем транспорта и поглощения глутамата, с другой, вероятно, вызывается активация потенциалзависимых Na^+ -каналов.

Использование синапсом и синаптических везикул в качестве удобных моделей изучения функции ГР предложили Chang, Michaelis [56, 57]. Они показали, что при действии низких концентраций глутамата синапсомы и синаптические везикулы способны поглощать Na^+ . Длительная экспозиция везикул с глутаматом вызывала десенситизацию, сходную с регистрируемой электрофизиологическими методами. Обнаружено, что стимуляция поглощения Na^+ происходит за счет активации комплекса ГР—ионный канал, а не транспорта глутамата [56]. Подтверждением этих данных служат результаты экспериментов, в которых показано, что возбуждающее действие глутамата не связано непосредственно с механизмами поглощения Na^+ или этой аминокислоты клетками [57].

Для выявления природы хемовозбудимого глутаматуправляемого канала особое внимание привлекают данные о том, что тетродотоксин—блокатор электровозбудимого Na^+ -канала—не влияет на процесс деполяризации, вызванный глутаматом [58]. Это свидетельствует о том, что глутаматуправляемые Na^+ -каналы значительно отличаются по структуре и свойствам от потенциалзависимых Na^+ -каналов. Подтверждением этому является ряд сведений о наличии избирательного блокирования тетродотоксином генерации потенциалов действия и отсутствии такого влияния на ВПСП, вызванного аппликацией глутамата [59].

Изучение типа ионов, проходящих через каналы активированного ГР, позволяет получить информацию не только о геометрии глутаматуправляемых каналов и их свойствах, но и предположить характер ионогенных групп белков и липидов, определяющих специфичность этих каналов. Сведения о том, что Ca^{2+} играет важную роль в продуцировании возбуждающей деполяризации, хотя и в меньшей степени, чем Na^+

[60], указывают на существование глутаматууправляемых Ca^{2+} -каналов. Обнаружение избирательной проницаемости, вызванной глутаматом для K^{+} и Cl^{-} , в случае гиперполяризации [61, 62] также предполагает наличие для них глутаматууправляемых каналов. Природа ионов, проходящих через каналы активированного ГР, очевидно, определяется типом нервных клеток и зависит от их функциональной специализации.

Существенный интерес для выяснения структуры и функции ГР вызывают результаты анализа изменений ионной проводимости мембран при взаимодействии одной молекулы глутамата с одним активным центром ГР [63]. Такой подход к оценке активного состояния хемовозбудимых ионных каналов применяется при исследовании «мембранного шума» [64]. Этот электрофизиологический подход позволяет определять интенсивность и временные характеристики проводимости одного ионного канала при аппликации глутамата [65, 66]. До сих пор кинетические параметры активации нонофорных каналов ГР описаны крайне недостаточно. Практически нет данных о стехиометрии глутамат-рецепторного взаимодействия. Имеются лишь сведения Barker, Ranson [67], которые показали, что величины соотношения глутамат:рецептор, вычисленные по кинетическим кривым доза—ответ, колеблются в пределах единицы, в то время как, по данным Oomiga и соавт. [63], это соотношение равняется 2:1. Эти авторы предполагают взаимодействие двух, а не одной, как в первом случае, молекул глутамата с единственным рецепторным участком плазматической мембраны нейрона.

Многие свойства ионных каналов ГР еще требуют специального исследования. Так, пока еще не представляется возможным количественно установить хемочувствительную плотность мембран нервных клеток к глутамату, оценить активацию специфических центров ГР и определить количество ионных каналов, необходимых для генерации ВПСП и др. Не исключено, что некоторые вопросы функциональной организации ГР ЦНС могут быть решены с помощью биохимических и иммунохимических подходов к анализу его свойств в модельных системах (мембранных везикулах, протеолипосомах и интактных нервных клетках).

Фармакологические свойства мембраносвязанных ГР

К агонистам глутамата относят вещества, способные оказывать возбуждающее действие при аппликации на плазматическую мембрану нейронов. Большинство анализированных соединений являлись структурными аналогами молекулы глутамата, которую модифицировали различными группами. [68]. Установлено, что подобные соединения обладают стереоспецифичностью действия, причем активность L-изомеров была существенно выше, чем D-форм [69]. Уменьшение углеродной цепи молекулы глутамата на 1, 2 или 3 углеродных атома резко снижало возбуждающее действие веществ. Метилирование α -углеродного атома не изменяло активности глутамата, в то время как метилирование β -уг-

леродного атома значительно снижало возбуждающий эффект. Введение гидроксильной или фенильной групп в β -положение также подавляло активность глутамата, по крайней мере, в 1000 раз [70].

На основании этих исследований был сделан вывод о том, что активный центр рецепторной молекулы может содержать две положительно заряженные группы, способные узнавать α - и γ -карбоксогруппы глутамата или α - и β -карбоксогруппы аспартата. Третьим участком узнавания рецептора может быть отрицательно заряженная группа, взаимодействующая специфически с NH_2 -группой нейромедиатора [35].

Наибольший интерес среди структурных аналогов глутамата привлекают производные иботеновой кислоты и каиновая кислота, обладающие значительно более высоким возбуждающим эффектом, чем сам нейромедиатор. Действие иботеновой кислоты практически равно действию глутамата и, как это было обнаружено, связано с гиперполяризацией мембраны нейрона [71, 72]. Недавно описан целый класс гетероциклических соединений, основанный на структурном компоненте иботеновой кислоты,—агентов, обладающих более мощным возбуждающим действием [73]. Однако при исследовании их конкуренции с радиоактивным глутаматом за узнающие участки ГР высокая специфичность этих производных иботеновой кислоты по отношению к ГР пока не подтвердилась.

Длительное время роль специфического агониста L-глутамата приписывали каиновой кислоте, которая является циклическим рестрицированным аналогом глутамата и обладает в 100 раз более высокой возбуждающей активностью. Анализу действия каиновой кислоты посвящено большое количество публикаций [74—76]. На основании этих работ стало ясно, что каиновая кислота не конкурирует с L-глутаматом за участки специфического связывания и имеет собственные узнающие участки на мембране нейрона [77—81].

С веществами, способными избирательно подавлять возбуждающее действие глутамата,—антагонистами—дело обстоит сложнее. Наиболее известные из антагонистов, такие, как НА 966, нуциферин, диэтиловый эфир глутаминовой кислоты и α -аминоадипат, не обладают высокой степенью селективности и проявляют слабый ингибирующий эффект [82—86].

Наиболее перспективными в плане изучения действия антагонистов на ГР являются производные фосфономасляной кислоты [87—89]. Так, например, высокополярные группы фосфатидилсерина, сходного по своей структуре с известным аналогом глутамата—2-амино-4-фосфономасляной кислотой, способны вызывать существенный ингибирующий эффект на функцию ГР [8, 90]. Немаловажный интерес в связи с этим представляют сведения о специфическом влиянии фосфолипиды А на функционирование ГР [90]. Эти данные в совокупности с результатами исследования химического состава очищенного ГР наводят на мысль о возможной регуляции активности ГР путем изменения содержания фосфолипидов.

Неоднозначность и разнонаправленность действия Тагонистов или антагонистов глутамата в разных структурах головного мозга, по-видимому, обусловлены возможностью существования различных типов рецепторов для глутамата. Не исключено, что плодотворный поиск высокоспецифических блокаторов связан с применением ряда нейротоксинов. Так, получены первые сведения о селективном блокирующем действии нейротоксина, выделенного из яда паука (*Nephila clavata*) на ВПСП, вызванный при аппликации глутамата на нервно-мышечный синапс [93]. Было обнаружено, что этот нейротоксин не действовал на аспартагиндуцированную деполяризацию. Авторы предполагают, что найден высокоспецифичный блокатор ГР для беспозвоночных.

Молекулярные характеристики ГР ЦНС. Выделение и очистка глутаматсвязывающих мембранных белков. Известно, что выделение, очистка и реконструкция функций рецепторных макромолекул из мембран нервных клеток является одной из основных возможностей их идентификации и четкого разграничения хеморецепторных процессов от ферментативного и транспортного метаболизма нейромедиаторных аминокислот [39].

К настоящему времени имеется лишь несколько удачных попыток выделить и очистить глутаматные рецепторы из синаптических мембран головного мозга крыс [33, 34]. Как уже неоднократно подчеркивалось, отсутствие соединений, пригодных для использования в качестве специфических меток, является основной причиной крайне недостаточного количества подобных исследований. В литературе представлены два основных подхода к выделению мембранных рецепторов для глутамата. Так, работами Michaelis и соавт. [34, 35, 94] было показано, что мягкая солиubilизация детергентами с последующей двухступенчатой аффинной хроматографией позволяет выделить глутаматсвязывающие мембранные белки. Согласно данным этих авторов, ГР представляет собой гликопротеид, возможно, субъединичной структуры, содержащий в активном центре металлическую группу Fe_2S_2 . Выделенный и очищенный белок имел $M 13,7$ кД и обладал способностью регулировать транспорт ионов. Были представлены доказательства, что глутаматсвязывающие белки являются интегральными внутренними белками [95]. Авторы показали, что чувствительность солиubilизированного рецепторного белка к ряду фармакологических препаратов остается практически одинаковой, как это выявлено для мембраносвязанного рецептора. Ни каиновая кислота, ни L-метил-D-аспарат не вызывали конкурентного подавления связывания 3H -L-глутамата с солиubilизированным рецептором даже в концентрации 10^{-4} M [34].

Иной путь выделения ГР использовали De Robertis, Fiszer de Plasas [96]. Им удалось методом экстракции в хлороформ-метаноле выделить из головного мозга крыс и мышц креветки протеолизид с $M 32$ кД, имеющий три участка связывания для глутамата. Такой метод экстракции мембранных белков не лишен недостатков, которые неоднократно обсуждали в литературе [17]. В настоящее время нет убедит-

тельных доказательств в пользу рецепторной функции выделенных и очищенных протеолипидов [18].

Для сохранения наибольшей нативности ГР нами был использован метод солиubilизации в мягких ионных и неионных детергентах и все процедуры выделения и очистки были сведены к двум ступеням аффинной хроматографии [33, 97]. Одним из путей сохранения стабильности рецепторной макромолекулы явилось снижение окружающей температуры и добавление небольших количеств фосфолипидов на последней стадии очистки. Полученные результаты о гликопротеидной природе глутаматсвязывающих низкомолекулярных белков подтвердили данные Michaelis и соавт. [34]. Была подтверждена также гипотеза о субъединичной структуре рецепторного белка. Проводятся исследования по реконструкции функции ГР в липосомах.

Попытку реконструировать рецептор для глутамата, используя частично очищенные глутаматсвязывающие белки синаптических мембран, предприняли Кузнецов и соавт. [98] и Коломыткин и соавт. [99]. Они показали, что встроенные в бислойные липидные мембраны фрагменты мембран или глутаматсвязывающие белки способны к изменению проницаемости для ионов при добавлении глутамата в среду инкубации. Заслуживает внимания тот факт, что появление изменений ионной проницаемости при воздействии нейромедиатора наблюдалось лишь при обнаружении белковых фрагментов по обе стороны липидной мембраны. Предполагается, что сквозное внутрилипидное присутствие белка в обеих половинах искусственной мембраны необходимо для формирования функционально активного ионного канала.

Физико-химические характеристики очищенных глутаматсвязывающих мембранных белков. Исследование параметров связывания $^3\text{H-L}$ -глутамата с очищенной фракцией мембранных белков обнаружило изменение константы сродства нейромедиатора к рецептору— K_d и числа связывающих участков на макромолекуле белка. Так, Michaelis и соавт. [34] показали, что K_d в этом случае колеблется в пределах 650—800 нМ, в то время как мембраносвязанный рецептор имел K_d —200—300 нМ. Авторы предположили, что такое снижение параметров связывания $^3\text{H-L}$ -глутамата с солиubilизированной формой рецептора обусловлено, по-видимому, изменением микроокружения белка, в частности нарушением белок-липидного взаимодействия.

В наших экспериментах при анализе связывания нейромедиатора в координатах Scatchard оказалось, что солиubilизированный глутаматсвязывающий рецептор имеет K_d 800—1000 нМ и V_{max} 180—200 пмоль/мг белка, тогда как в мембраносвязанной форме глутаматсвязывающий рецептор имел K_d 80—100 нМ и V_{max} 1,5—2,5 пмоль/мг белка. Эти данные подтверждают ранее высказанное предположение Michaelis и соавт. [35]. Кроме того, снижение сродства глутамата к рецептору может быть также обусловлено нарушением стехиометрии субъединиц рецепторного комплекса в ходе выделения и очистки. Мы пытались выявить различные состояния агрегированности рецепторного глутаматсвязывающего белка. Обнаружено, что изучаемые препараты в

разных концентрациях имели различную степень диссоциации молекулы рецептора. При определении величины M этих форм рецептора оказалось, что диссоциированная форма мембранного белка, специфически связывающего глутамат, соответствует зоне градиента 15—20%-ной сахарозы 12—15 кД, в то время как ассоциированная форма белка обнаруживается в области 28—30 кД. Мономерный компонент рецепторного белка при электрофорезе в ПААГ соответствовал низкомолекулярной фракции белка с M 14 кД. Не исключено, что ГР—это комплекс, состоящий из низкомолекулярных субъединиц, наименьшая из которых представляет собой димер. Этот процесс, по-видимому, может оказаться многоступенчатым и приводит к образованию больших агрегатов, как в случае ферментов [100].

Гидродинамические параметры диссоциированной формы ГР существенно отличались от ассоциированной. Найдено, что при низких концентрациях очищенных мембранных белков расчетный коэффициент седиментации колебался в пределах 2.1 S, тогда как для агрегированной формы он соответствовал 3.5 S. Интересно, что в присутствии немеченого L-глутамата коэффициент седиментации глутаматсвязывающего белка соответствовал ассоциированной зоне, то есть 3.5 S, а это согласуется с данными Michaelis и соавт. [34], которые показали, что наибольшей глутаматсвязывающей активностью обладал белковый пик в зоне 3.5 S. Авторы предполагают, что во время выделения и очистки происходит спонтанное снижение дисульфидных связей, ведущих к образованию субъединиц с M 13.8 кД и коэффициентом седиментации около 2.5 S. Нельзя исключить возможность того, что макромолекула ГР состоит из несвязанных дисульфидными мостиками мономеров, которые ассоциируются под действием нейромедиатора. В этом случае механизмы ионной проницаемости мембран, по-видимому, представляют процессы ассоциации и диссоциации специфических рецепторов белков под влиянием молекулы L-глутамата.

Химический анализ очищенных глутаматсвязывающих белков, выделенных из синаптических мембран коры головного мозга крыс представлен в работах [33, 35]. Аминокислотный состав белковых фракций, как обнаружено нами, существенно отличается от результатов исследования, проведенного Michaelis и соавт. [34].

Выявлено большое количество гидрофобных аминокислот, что, возможно, свидетельствует о легкости образования гидрофобных взаимодействий между субъединицами и значительной липофильности макромолекулы рецептора. Было определено соотношение кислых и основных аминокислотных остатков, полярность молекулы, наличие общего положительного заряда, который определяет высокую степень сродства к кислым нейромедиаторам. Теоретический анализ относительной полярности молекулы рецептора позволил рассчитать возможный объем и форму рецептора для глутамата, которые согласуются с представлениями об олигомерной структуре, состоящей из гидрофобных глобул, близких по виду к эллипсу.

Содержание углеводов в макромолекуле ГР не превышает 2% от

содержания общего белка. Наибольшая доля в углеводном компоненте мембранного рецептора приходится на галактозу, маннозу, глюкозу и N-ацетилглюкозамин. Остальные углеводы и сиаловые кислоты представлены в незначительных количествах.

Важная роль липидных компонентов в поддержании структуры и функции ГР не вызывает сомнений: полная или частичная делипидизация мембранного белка ведет к полной инактивации рецептора и потере чувствительности к глутамату. Среди идентифицированных липидов, экстрагируемых из гликопротеин-липидных комплексов рецептора, были обнаружены холестерин и фосфолипиды, большинство из которых приходится на фосфатидилэтаноламин, фосфатидилхолин и фосфатидилсерин.

На основании вышеназванных данных можно представить, что хеморецепторный мембранный белок, специфически связывающий глутамат, является гликопротеин-липидным комплексом, состоящим из низкомолекулярных субъединиц, способных к ассоциации—диссоциации в присутствии нейромедиатора. Создается впечатление, что минимальная структурная единица рецептора может состоять из двух субъединиц, которые, находясь в определенной стехиометрии, составляют олигомерную макромолекулу рецепторного мембранного белка.

Проблемы восприятия и узнавания химических сигналов нервными клетками представляют собой одно из ведущих направлений современной нейробиологии. Особенность изучения хеморецепторных процессов, происходящих в ЦНС, на данном этапе касается механизмов функционирования регуляторных мембранных белков—рецепторов.

ГР являются важным классом этих мембранных белков, которые непосредственно вовлекаются в процессы передачи и обработки информации в головном мозгу млекопитающих. Совокупность представленных в обзоре данных, касающихся в основном биохимических аспектов функционирования ГР, показывает, что в настоящее время сделаны первые шаги к исследованию молекулярной и пространственной организации их в ЦНС.

Появление иммунохимических подходов к исследованию структуры и функции ГР ЦНС является одним из решений проблемы специфического маркирования этого класса мембранных белков.

Получение моноклональных антител к ГР может оказаться полезным для диагностики и оптимизации лечения некоторых форм тяжелых хронических заболеваний, в частности эпилепсии и паркинсонизма. Не исключено, что значительный нейротоксичный эффект глутамата и его рестрицированных аналогов обусловлен нарушением функции ГР в ЦНС. Возможно, что длительная деполяризация, вызванная этими аналогами глутамата, приводит к дегенерации мембраны нейрона, нарушению взаимосвязи структур, ответственных за выполнение сложных двигательных функций. Дальнейший анализ факторов, вызывающих системные изменения в организме и вовлекающихся в механизмы проявления судорожной активности, позволит выявить роль ГР в патогенезе ряда хронических неврологических заболеваний.

CNS GLUTAMATE RECEPTORS. STRUCTURE AND FUNCTIONS

DAMBINOVA S. A.

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

The review deals with physical, chemical and pharmacological properties of membrane-bound glutamate receptors. The molecular characteristics of the purified glutamate receptors and their reconstruction in the artificial lipid membranes are discussed.

ЛИТЕРАТУРА

1. Glutamic Acid. Adv. Biochem. Physiol., eds. L. J. Filler et al. N.-Y., Raven Press, 1979.
2. Мандельштам Ю. Е., Наследов Г. А. Нейрофизиология, 9, 532—536, 1977.
3. Hayashi T., Nagai K. Proc. XX Int. Physiol. Congress, 410, 1956.
4. Krnjevic K., Phillis J. W. J. Physiol., 165, 274—304, 1963.
5. Krnjevic K. Physiol. Rev., 54, 418—540, 1974.
6. Davies J. Evans R. H., Francis A. A., Jones A. W., Watkins J. C.—In: Neuro. transmitters and their receptors (ed. Littauer U. Z. et al., John Wiley Press N.-Y.), p. 333—348, 1980.
7. Briley P. A., Filbin M. T., Lunt G. G., Turner P. D. Mol. Cell. Biochem., 33/39, 347—356, 1981.
8. Glutamate as a transmitter, eds. Roberts P. J. et al., N. Y., John Milley Press, 1980.
9. Glutamate as a neurotransmitter, eds. Dichia G., Gessa G., N.-Y., Raven Press, 1980.
10. Curtis D. R., Watkins J. S. J. Physiol., 150, 656—682, 1960.
11. Nistri A., Constanti A. Progr. Neurobiol., 13, 117—235, 1979.
12. Freeman A. R. Progr. Neurobiol., 6, 137—153, 1976.
13. Duggan A. W. Brain Res., 19, 522—528, 1974.
14. Höslt A., Andrés P. F., Höslt E. Pflügers Arch. 363, 43—48, 1976.
15. Костюк П. Г., Крышталъ О. А. Механизмы электрической возбудимости нервной клетки, М., Наука, 1981.
16. Levy W. B., Hauser J., Cotman C. W. J. Theor. Biol. 60, 109—130, 1976.
17. Вульфшус Е. А., Коваленко В. А.—В сб.: Биофизика, 8, М., ВИНТИ, 1978.
18. Heidmann T., Chanquex J. P. Ann. Rev. Biochem. 47, 317—354, 1978.
19. Cohen J. B., Chanquex J. P. Ann. Rev. Pharmacol. 15, 83—103, 1975.
20. Anwyl R. J. Physiol. 273, 367—388, 1977.
21. Bernardi G., Liegländsberger W., Herz A., Pull E. A. Brain Res., 39, 523—525, 1972.
22. Цыборенко А. Л., Врублевский С. В., Марченко С. М., Крышталъ О. А. Материалы I Всес. биоф. съезда, 11, 103, 1982.
23. Johnston G. A. R., Curtis D. S., Davies J., McCulloch R. M. Nature. 248, 604—605, 1974.
24. Roberts P. J. Nature, 252, 399—401, 1974.
25. Foster A., Roberts R. J. J. Neurochem., 31, 1467—1477, 1978.
26. Sharif N. A., Roberts P. J. Biochem. Pharmacol., 30, 3019—322, 1981.
27. Baudry M., Lynch G. Nature, 282, 748—750, 1979.
28. Foster A., Menna E. E., Fagg G. E., Cotman C. W. J. Neurosci., 1, 620—625, 1981.
29. Baudry M., Lynch G. Mol. Cell. Biochem., 38, 5—18, 1981.

30. Lopez-Colome A. M. *Neurochem. Res.*, **6**, 1019—1025, 1981.
31. Sharif N. A., Roberts P. J. *Brain Res.*, **211**, 293—304, 1981.
32. Baudry M., Lynch G. J. *Neurochem.* **36**, 811—820, 1981.
33. Dambinova S. A., Gorodinsky A. I., Besedin V. I., Doemina M. N. III Soviet-Sweden Symp. Physico-Chemical Biology, Tbilisi, p. 181—182, 1981.
34. Michaelis E. K., Michaelis M. L., Byarsky L. L. *Biochim. Biophys. Acta*, **367**, 338—348, 1974.
35. Michaelis E. K., Michaelis M. L., Chang H. H., Grubbs R. D., Kuonen D. *Mol. Cell. Biochem.*, **38**, 163—179, 1981.
36. Biztere K., Thompson H., Coyle J. *Brain Res.*, **183**, 421—433, 1980.
37. Sharif N. A., Roberts R. J. *J. Neurochem.*, **34**, 779—784, 1980.
38. Baudry M., Lynch G. *Eur. J. Pharmacol.*, **57**, 283—285, 1979.
39. Baudry M., Bundman M., Smith E., Lynch G. *Science*, **212**, 937—938, 1981.
40. Baudry M., Oliver M., Creager R., Wieraszko A., Lynch G. *Life Sci.* **27**, 325—330, 1980.
41. Baudry M., Arst D. S., Oliver M., Lynch G. *Dev. Brain Res.* **1**, 37—48, 1981.
42. Baudry M., Arst D. S., Lynch G. *Brain Res.*, **223**, 195—199, 1981.
43. Baudry M., Lynch G. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **77**, 2298—2303, 1980.
44. Дамбинова С. А., Городинский А. И. *Бюл. экпер. биол. и мед.*, **12**, 58—59, 1982.
45. Svennerholm L., Freedman P. *Biochim. Biophys. Acta.*, **617**, 97—119, 1980.
46. Toffano G., Guidotti A., Costa E. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **75**, 4024—4028, 1978.
47. Buu N. T., Pull E., Var Geder N. *Gen. Pharmac.*, **1**, 5—14, 1976.
48. Foster A. C., Fagg G. E., Menna E. E., Cotman C. W. *Brain Res.*, **229**, 246—250, 1981.
49. Vincent S. R., McGeer E. G. *Brain Res.*, **184**, 99—108, 1980.
50. Head R. A., Tunnicliff G., Matheson G. K. *Can. J. Biochem.*, **58**, 534—538, 1980.
51. Simon J. R., Contrera J. F., Kuhar M. J. *J. Neurochem.*, **26**, 141—147, 1976.
52. Ovchinnikov Y. A.—In: *New horizons in biological chemistry*, ed. by Koike et al., Jap. Scient. Soc. Press, Tokyo, p. 157—174, 1980.
53. В сб.: *Мембраны: ионные каналы* под ред. Юнзмаджева Ю. А., М., Мир, с. 25—94, 1981.
54. Luini A., Goldberg O., Teicheberg V. I. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **78**, 3250—3254, 1981.
55. Teicheberg V. I., Goldberg O., Luini A. *Mol. Cell. Biochem.*, **39**, 281—296, 1981.
56. Chang H. H., Michaelis E. K. *J. Biol. Chem.*, **255**, 2411—2417, 1981.
57. Chang H. H., Michaelis E. K. *J. Biol. Chem.*, **256**, 10084—10087, 1981.
58. Lieglsangberger W., Pull E. A. *Nature New Biol.*, **239**, 204—205, 1972.
59. Koo C. Y. *Fed. Proc.*, **40**, 30—35, 1981.
60. Onodera K., Takeuchi A. *J. Physiol.*, **252**, 295—318, 1975.
61. Yamamoto C., Yamashita H., Chujo T. *Nature*, **262**, 786—787, 1976.
62. Oomura Y., Ooyama H., Sawada M. *J. Physiol.*, **243**, 321—341, 1974.
63. Cull-Candy S. G., Miledi R., Parker I. J. *J. Physiol.*, **321**, 195—210, 1981.
64. Anderson C. R., Cull-Candy S. G., Miledi R. *J. Physiol.*, **282**, 219—242, 1978.
65. Cull-Candy S. G., Parker I. *Nature*, **295**, 410—412, 1982.
66. Cull-Candy S. G., Miledi R. *J. Physiol.*, **326**, 527—551, 1982.
67. Barker J. L., Ransom B. R. *J. Physiol.*, **280**, 331—354, 1978.
68. Краткий курс молекулярной фармакологии (под ред. П. В. Сергеева) М., 1975.
69. Davies J., Watkins J. C. J. *J. Physiol.*, **297**, 621—635, 1979.
70. Curtis D. R., Watkins J. C. J. *J. Physiol.*, **150**, 656—682, 1960.
71. Honore T., Lauridsen J., Krogsgaard-Larsen P. *J. Neurochem.*, **36**, 1302—1304, 1981.
72. McDonald J., Nistri A. *Can. J. Physiol. Pharmac.*, **55**, 965—967, 1977.
73. Krogsgaard-Larsen P., Honore T., Hansen J. J., Curtis D. R., Lodge D. *Nature*, **284**, 64—66, 1980.

74. *Simon J. R., Contrera J. F., Kuhar M. J. J. Neurochem.*, 26, 141—147, 1976.
75. *Johnston G. A. R., Kennedy S. M., Twitchin B. J. Neurochem.*, 32, 121—127, 1979.
76. *Kainic Acid as a Tool in Neurobiology*, eds, McGeer E. G., Olney J. K., McGeer P. L., N.-Y., Raven Press, p. 275, 1978.
77. *Hall J. G., Hicks T. P., McLennan H. Neurosci. lett.*, 8, 171—175, 1978.
78. *Robinson J. H., Deadwyler S. A. Brain Res.*, 221, 117—128, 1981.
79. *Krespan B., Berl S., Nicklas W. J. J. Neurochem.*, 38, 509—518, 1982.
80. *Foster A. C., Menna E. E., Monaghan D., Cotman C. W. Nature.*, 289, 73—74, 1984.
81. *London E. D., Coyle J. T. Mol. Pharmacol.*, 15, 495—505, 1979.
82. *Spencer H. J. Brain Res.*, 102, 91—101, 1976.
83. *McLennan H., Wheal H. V. Neuropharmacol.*, 15, 709—712, 1976.
84. *McDonald J. F., Nistri A., Padjen A. L. Can. J. Physiol. Pharmac.*, 55, 1387—1390, 1977.
85. *Bisco T. J., Davies J., Dray A., Evans R., Francis A., Martin M., Watkins J. Eur. J. Pharmacol.*, 45, 315—316, 1977.
86. *Григорьев В., Мандельштам Ю. Е., Медведь Т. Ю. Ж. эвол. биохим. и физиол.*, 15, 310—312, 1979.
87. *Watkins J. C., Curtiss D. R., Brand S. S. J. Pharmacol.*, 29, 324—329, 1977.
88. *Evans R. H., Jones A. W., Watkins J. C. Br. J. Pharmacol.*, 74, 907P—908P, 1981.
89. *Roberts P. J., Foster G. A., Shurif N. A., Collins J. D. Brain Res.*, 238, 475—479, 1982.
90. *Honore T., Lauridsen J., Krosggaard-Larsen P. J. Neurochem.*, 38, 173—178, 1982.
91. *Bionlac B., De Tinguy-Moreaud E., Vincent J., Nenzil E. Gen. Pharmacol.*, 10, 121—125, 1979.
92. *Lanthorn T., Cotman C. W. Brain Res.*, 225, 171—178, 1981.
93. *Nobufumi K., Akiko N., Takahashi A. Neurosci. Lett.*, 9, s72, 1982.
94. *Michaelis E. K. Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 65, 1004—1012, 1975.
95. *Michaelis E. K. Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 87, 106—113, 1979.
96. *De Robertis E., Fliszer de Plazas S. J. Neurochem.*, 26, 1237—1243, 1976.
97. *Дамбинова С. А., Беседин В. И. Нейрохимия*, 1, 143—148, 1982.
98. *Кузнецов В. И., Коломыткин О. В., Ермишкин Л. И.*—В сб.: Биофизика сложных систем и радиационных нарушений, М., Наука, 29—33, 1977.
99. *Коломыткин О. В., Абросимов Б. С., Чистяков Л. Г., Кузнецов В. И. Материалы I Всесоюз. биофиз. съезда*, 1, 241, 1982.
100. *Думлер И. Л., Этингоф Р. И. ДАН СССР*, 260, 1477—1480, 1981.

Институт экспериментальной медицины
АМН СССР, Ленинград

Поступила 4. V 1983

РЕЦЕНЗИИ

Руководство по нейрохимии. Ред. А. Lajtha. (2-е изд.), т. 1. Химическая и клеточная архитектура, т. 2. Экспериментальная нейрохимия, т. 3. Метаболизм в нервной системе.

Handbook of neurochemistry (Sec. ed.): vol. 1. Chemical and cellular architecture, 1982, 496 p., vol. 2. Experimental neurochemistry, 1982, 475 p., vol. 3. Metabolism in the nervous system, 1983, 698 p. New York, Plenum Press.

В последние годы лабораторная биохимическая практика значительно обогатилась благодаря все более широкому использованию достижений современной аналитической и препаративной химии, физической химии, иммунохимии, новых экспериментальных подходов с возможностью количественного изучения многих определяемых веществ в нано- и пикоколичествах. Были достигнуты крупные успехи и в различных областях нейрохимии. В связи с этим обширное 7-томное «Руководство по нейрохимии», опубликованное под редакцией видного американского ученого, директора Нейрохимического центра в Нью-Йорке проф. А. Lajtha в 1969—1972 гг., теперь оказалось уже недостаточно полным, а частично и устаревшим. Назрела необходимость критически и по-новому осветить последние достижения в нейрохимии, что и призвано сделать 2-е издание «Руководства», планируемое ныне уже в 10 томах.

Новое издание «Руководства», как это вполне очевидно по его плану и содержанию первых трех томов, отнюдь не является лишь переработкой 1-го издания, а представляет собой новый коллективный труд, служащий дополнением к прежнему и отвечающий современным положениям в нейрохимии. Так, следует подчеркнуть, что, например, отягательно таких тем, как «химическая и клеточная архитектура» нервной системы (т. 1) и «экспериментальная нейрохимия» (т. 2) вообще не было в 1-м издании.

Развитие топохимических исследований отдельных морфологических структур НС, в том числе и микроскопических, настоятельная необходимость которых диктуется высокой морфологической, функциональной и биохимической гетерогенностью нервных образований, нашло свое отражение в ряде глав-обзоров, составляющих т. 1 «Руководства». Из них можно указать на такие, как «Водные пространства», «Кальций в нервных клетках», «Пулы аминокислот в головном мозгу», «Нейроны», «Астроциты», «Олигодендроциты», «Шванновская клетка». Кроме того, в т. 1 включены также очень важные обзоры, связанные с современными достижениями микрохимических исследований, на темы: «Ионные транспортные системы», «Аммиак», «Нейропептиды», «Следовые амины головного мозга», «Полиамины», «Циклические нуклеотиды в ЦНС», «Биоптерин», «Физиологическая нейрохимия цереброспинальной жидкости».

Безусловный интерес вызывают обзоры современных достижений практики лабораторных нейрохимических исследований, собранные в т. 2 «Руководства». В них рассмотрены методы изучения гибридизации РНК с ДНК, гистохимические методы установления локализации и количественного определения рецепторов, методы радиоизотопного анализа, выявления и биохимического исследования различных компартментов, масс-спектрометрического изучения метаболизма некоторых нейромедиаторов, перфузии изолированного головного мозга, позитронной эмиссионной томографии, аналитические аспекты фармакодинамики психотропных средств, биохимические

методы диагностики наследственных неврологических заболеваний, методы исследований в головном мозгу человека нейромедиаторов, нейронтенов и соответствующих ферментов. Включены в т. 2 также и обзоры новых успехов в области применения ряда методических приемов, уже широко используемых в нейрохимической практике.

Важно подчеркнуть, что в этих критических обзорах рассмотрены не только положительные стороны излагаемых методов, но подвергнуты обсуждению также и определенные ограничения их рационального применения.

Большое внимание нейрохимиков привлекут также и обзоры, помещенные в т. 3 «Руководства» и посвященные различным вопросам метаболизма в ЦНС, в основном, в физиологических условиях жизнедеятельности при покое; в некоторых из них же даны и сведения, касающиеся метаболических сдвигов при изменениях функционального состояния и при патологических процессах. В этом томе читатель найдет обзоры по превращениям различных групп липидов, некоторых аминокислот (глутаминовой, глицина, метионина), аминокислот, таурина, глутатиона. Далее в т. 3 имеются весьма содержательные обзоры по свойствам и метаболизму миелина, связи локальной функциональной активности структур ЦНС и локального же использования в них глюкозы, интермедиарному метаболизму углеводов и других энергетических субстратов, окислительному фосфорилированию, влиянию гипогликемии на метаболические процессы в головном мозгу, роли триптофана, фенилаланина, тирозина и их метаболитов в ЦНС, метаболизму головного мозга *in vivo*, а также кровоснабжению головного мозга.

Уже опубликованные 1—3 тома «Руководства» содержат очень важную критическую информацию по рассматриваемым в них вопросам и, несомненно, представляют большой интерес для специалистов, работающих в разных областях нейрохимии.

В имеющейся аннотации сообщается о тематике (быть может, пока условной) последующих томов «Руководства»: т. 4—«Ферменты в нервной системе», т. 5—«Метаболические превращения в нервной системе», т. 6—«Рецепторы в нервной системе», т. 7—«Структурные элементы нервной системы», т. 8—«Нейрохимические системы», т. 9—«Изменения метаболитов в нервной системе» и т. 10—«Патологическая нейрохимия».

Демин Н. Н.

УКАЗАТЕЛЬ АВТОРОВ СТАТЕЙ,
ОПУБЛИКОВАННЫХ В ТОМЕ 2 (1983)

- Абрамова З. И. 164 (2)
 Абросимова А. Т. 212 (2)
 Аванов А. Я. 364 (4)
 Агаев Т. М. 180 (2)
 Азарян А. В. 156 (2), 280 (3)
 Алексидзе Н. Г. 199 (2)
 Алиев М. Г. 374 (4)
 Андрианов В. В. 59 (1)
 Анохин К. В. 11 (1)
 Арменян А. Р. 18 (1)
 Арутюнян Л. А. 417 (4)
 Ашмарин И. П. 327 (3)
- Бархударян Н. А. 156 (2), 280 (3)
 Бахарев В. Д. 272 (3)
 Белик Я. В. 26 (1)
 Беллин С. И. 296 (3)
 Белова М. М. 164 (2)
 Беляев С. В. 319 (3)
 Бобкова Н. В. 119 (2)
 Богданова Т. С. 189 (2)
 Брагин Е. О. 347 (4)
 Бресткин А. П. 212 (2)
 Броницкая З. Г. 217 (2)
 Буданцев А. Ю. 130 (2)
- Буятыян Г. Х.** 18 (1)
- Виняр Т. И. 212 (2)
 Вовченко И. Б. 323 (3)
 Войтенко Н. И. 148 (2)
 Воронков М. Г. 212 (2)
- Галоян А. А. 263 (3)
 Гацова В. М. 3 (1)
 Глушенко Т. С. 47 (1)
 Годухин О. В. 130 (2)
 Грищенко Н. И. 429 (4)
 Громова Е. А. 199 (2)
- Дамбинова С. А. 426 (4)
 Демин Н. Н. 458 (4)
 Доведова Е. Л. 138 (2)
 Долгов О. Н. 319 (3)
 Думлер И. Л. 383 (4)
 Дуринян Р. А. 347 (4)
- Елаев Н. Р. 52 (1)
- Заблудовский А. Л. 288 (3)
- Иванов В. А. 164 (2)
- Казарян Б. А. 174 (2)
 Казеннов А. М. 256 (3)
 Калинин С. Н. 63 (1)
 Калининская Л. Н. 402 (4)
 Капралов А. А. 26 (1)
 Карапетян Н. Г. 174 (2)
 Качалова Л. М. 138 (2)
 Клепикова В. А. 47 (1)
 Ковалев Г. И. 315 (3)
 Коган Б. М. 11 (1)
 Козлова Л. С. 323 (3)
 Кононенко В. Я. 402 (4)
 Корнеева Н. В. 241 (3)
 Кочетков Н. В. 319 (3)
 Кошоридзе Н. И. 199 (2)
 Краузберк Т. Х. 247 (3)
 Кривенко Н. Е. 41 (1)
 Кричевская А. А. 397 (4)
 Кругликов Р. И. 3 (1), 104 (1),
 327 (3)
 Куликов А. В. 421 (4)
- Липкинд Г. М. 364 (4)
 Лысова Н. П. 319 (3)
- Майзелис М. Я. 288 (3)
 Маслова М. Н. 256 (3)
 Массари Д. 347 (4)
 Мац В. Н. 3 (1)
 Менджерский А. М. 323 (3)
 Микеладзе Д. Г. 34 (1)
 Митюшов М. И. 189 (2)
 Михалева И. И. 272 (3)
- Наволоцкая Е. В. 353 (4)
 Назарян К. Б. 174 (2)
 Налбандян Р. М. 389 (4)
 Нилова Н. С. 307 (3)
- Орлова Н. В. 3 (1)
- Панов А. Н. 41 (1), 232 (2)
 Парсаданиян Г. К. 84 (1)
 Перт А. 347 (4)

- Пигарева З. Д. 180 (2)
 Плакхина Л. А. 119 (2)
 Подвигина Т. Г. 189 (2)
 Поletaев А. Б. 319 (3)
 Поляков Н. Ф. 205 (2)
 Попова Н. К. 148 (2), 421 (4)
 Попова Н. С. 138 (2)
 Прохорова М. И. 72 (1)
- Рагимова Ш. А. 374 (4)
 Райзе Т. Е. 67 (1)
 Рожанец В. В. 353 (4)
 Розенгарт Е. В. 212 (2)
- Саакян С. А. 263 (3)
 Саакян Ф. М. 263 (3)
 Савина Г. В. 256 (3)
 Саргсян А. С. 272 (3)
 Семенова Т. П. 429 (4)
 Сильвестер Д. М. 296 (3)
 Симонян А. А. 417 (4)
 Симонян Р. А. 417 (4)
 Спичкип А. А. 221 (2)
 Смерчинская Л. С. 26 (1)
 Смирлова Г. Н. 412 (4)
 Соколова Г. П. 72 (1)
 Срапионян Р. М. 263 (3)
 Судакова Н. М. 52 (1)
 Сулейманов А. К. 217 (2), 397 (4)
 Сытинский И. А. 296 (3)
 Сэлп А. В. 247 (3)
- Терпиловская О. Н. 164 (2)
 Токарева А. Е. 119 (2)
 Третьяк Т. М. 412 (4)
 Тюленев В. И. 26 (1)
 Тюлькова Е. И. 67 (1)
- Ушаков А. С. 241 (3)
- Фрайкина Т. Я. 34 (1)
 Фураев В. В. 63 (1)
- Хайдурлу С. Х. 130 (2)
 Хетен Л. 315 (3)
 Христолюбова Н. А. 11 (1)
- Чижевская М. А. 353 (4)
 Чифликян М. Д. 18 (1)
- Шалабодов А. Д. 256 (3)
 Шарагина Л. М. 67 (1)
 Шароян С. Г. 389 (4)
 Шерстнев В. В. 319 (3)
 Шерстнев К. Б. 397 (4)
 Шихов С. Н. 288 (3)
 Шишкина С. К. 241 (3)
- Эдмондс Х. Л. (мл.) 296 (3)
 Эмирбеков Э. З. 232 (2)
 Эттигоф Р. Н. 63 (1), 106 (1)
- Юханов Р. Ю. 353 (4)
- Ярв Я. Л. 247 (3)

CUMULATED AUTHOR INDEX

(VOLUME 2, 1983)

- Abramova Z. I. 164 (2)
 Abrosimova A. T. 212 (2)
 Agaev T. M. 180 (2)
 Aleksidze N. G. 199 (2)
 Aliev M. H. 374 (4)
 Andrianov V. V. 59 (1)
 Anokhin K. V. 11 (1)
 Armenian A. R. 18 (1)
 Ashmarin I. P. 327 (3)
 Avonov A. J. 364 (4)
 Azaryan A. V. 156 (2), 280 (3)
- Bakharev V. D. 272 (3)
 Barkhudaryan N. A. 156 (2), 280 (3)
 Belik Ya. V. 26 (1)
 Bellin S. I. 296 (3)
 Belova M. M. 164 (2)
 Belyev S. V. 319 (3)
 Bobkova N. V. 119 (2)
 Bogdanova T. S. 189 (2)
 Bragtn E. O. 347 (4)
 Brestkin A. P. 212 (2)
 Bronovitskaya Z. G. 217 (2)
 Budantsev A. Iu. 130 (2)
- Buniatian H. Ch. 18 (1)
- Chiflikian M. D. 18 (1)
 Chizhevskaya M. A. 353 (4)
 Christofubova N. A. 11 (1)
- Dambinova S. A. 426 (4)
 Doemin N. N. 458 (4)
 Dolgov O. N. 319 (3)
 Dowedova E. Z. 138 (2)
 Dumler I. L. 383 (4)
 Durinyan R. A. 347 (4)
- Edmonds H. L., Jr. 296 (3)
 Elaev N. R. 52 (1)
 Emirbekov E. Z. 232 (2)
 Etingof R. N. 63 (1), 106 (1)
- Fraikina T. Ya. 34 (1)
 Furaev V. V. 63 (1)
- Galoyan A. A. 263 (3)
- Getzova V. M. 3 (1)
 Gluschenko T. S. 47 (1)
 Godukhin O. V. 130 (2)
 Grishenko N. L. 429 (4)
 Gromova E. A. 119 (2)
- Haidarliu S. H. 130 (2)
 Haroutjunian L. A. 417 (4)
 Hetey L. 315 (3)
- Ivanov V. A. 164 (2)
- Järv I. L. 247 (3)
- Kachalova L. M. 138 (2)
 Kalinina S. N. 63 (1)
 Kalinskaya L. N. 402 (4)
 Kapralov A. A. 26 (1)
 Karapetyan N. H. 174 (2)
 Kazaryan B. A. 174 (2)
 Kazenov A. M. 256 (2)
 Klenikova V. A. 47 (1)
 Kononenko V. V. 402 (4)
 Kochetkov N. V. 319 (3)
 Kogan B. M. 11 (1)
 Korneeva N. V. 241 (3)
 Koshoridze N. I. 199 (2)
 Kovalev G. I. 315 (3)
 Kozlova L. S. 323 (3)
 Krausberk T. H. 247 (3)
 Krichevskaya A. A. 397 (4)
 Krivenko N. E. 41 (1)
 Kruglitkov R. I. 3 (1), 104 (1), 327 (3)
 Kulikov A. V. 421 (4)
- Lipkind G. M. 364 (4)
 Lysova N. P. 319 (3)
- Maizelis M. Ya. 288 (3)
 Maslova M. N. 256 (3)
 Massari D. 347 (4)
 Maz V. N. 3 (1)
 Mendzheritsky A. M. 323 (3)
 Mikeladze D. G. 34 (1)
 Mikhaleva I. I. 272 (3)
 Mityushov M. I. 189 (2)

- Nalbandyan R. M. 389 (4)
 Navolotskaya E. V. 353 (1)
 Nazaryan K. B. 174 (2)
 Nilova N. S. 307 (3)
 Orlova N. V. 3 (1)
 Panov A. N. 41 (1), 232 (2)
 Parsadonian H. K. 84 (1)
 Perth A. 347 (4)
 Pigareva Z. D. 180 (2)
 Plakhinas L. A. 119 (2)
 Podvigina T. T. 189 (2)
 Poletayev A. B. 319 (3)
 Popova N. K. 148 (2), 421 (4)
 Popova N. S. 138 (2)
 Polyakov N. F. 205 (2)
 Prokhorova M. I. 72 (1)
 Ragimova Sh. A. 374 (4)
 Raize T. E. 67 (1)
 Rozhanets V. V. 353 (4)
 Rozengart E. V. 212 (2)
 Saakyan F. M. 263 (3)
 Saakyan S. A. 263 (3)
 Sargsyan A. S. 272 (3)
 Savina G. V. 256 (3)
 Schalabodov A. D. 256 (3)
 Semenova T. P. 429 (4)
 Sepp A. V. 247 (3)
 Sharagina L. M. 67 (1)
 Sharoyan S. G. 389 (4)
 Sherstnev V. V. 319 (3)
 Sherstnev K. B. 397 (4)
 Shikhov S. N. 288 (3)
 Shishkina S. K. 241 (3)
 Simonian A. A. 417 (4)
 Simonian R. A. 417 (4)
 Sinichkin A. A. 221 (2)
 Smerchinskaya L. S. 26 (1)
 Smirnova G. N. 397 (4)
 Sokolova G. P. 72 (1)
 Srapionyan R. M. 263 (3)
 Sudakova N. M. 52 (1)
 Suleimanov A. K. 217 (2), 412 (4)
 Sylvester D. M. 296 (3)
 Sytinsky I. A. 296 (3)
 Terpilovskaja O. N. 164 (2)
 Tjulenev V. Y. 26 (1)
 Tretjak T. M. 412 (4)
 Tokareva A. E. 119 (2)
 Tuilkova E. I. 67 (1)
 Ushakov A. S. 241 (3)
 Vinjar T. N. 212 (2)
 Voitenko N. N. 148 (2)
 Voronkov M. E. 212 (2)
 Vovchenko I. B. 323 (3)
 Yukhananov R. J. 353 (4)
 Zabludovsky A. L. 288 (3)

СО Д Е Р Ж А Н И Е

<i>Брагин Е. О., Массари Д., Перт А., Дуринян Р. А.</i> Изучение роли порадрергических и серотонинергических нейронов головного и спинного мозга в антишоциептивных механизмах стресса	347
<i>Рожанец В. В., Юхананов Р. Ю., Чижевская М. А., Новолоцкая Е. В.</i> Радиониммунологическое изучение локализации ПДС-подобного материала в различных органах и отделах головного мозга крысы	353
<i>Аванов А. Я., Липкинд Г. М.</i> Конформационный анализ гипоталамического кардиоактивного гексапептида и его ацетилированного производного	364
<i>Алиев М. Г., Рагимова Ш. А.</i> Серотонин в гипоталамическом механизме контроля секреции пролактина и молока	371
<i>Думлер И. Л.</i> Иммунохимическая характеристика белкового ингибитора 3,5 АМР фосфодиэстеразы наружных сегментов палочек сетчатки	383
<i>Шароян С. Г., Налбандян Р. М.</i> Растворимые металлопротеины мозга. V Медьсодержащие белки из белого вещества головного мозга	389
<i>Шерстнев К. Б., Сулейманов А. К., Кричевская А. А.</i> Включение C ¹⁴ -лейцина в белки мембран субклеточных фракций мозга крыс при различных формах кислородной интоксикации	397
<i>Калинская Л. Н., Кононенко В. Я.</i> Исследование активности лизосомных ферментов головного мозга крыс при изменениях уровня гормонов гипофизарно-надпочечниковой системы	402
Краткие сообщения	
<i>Третьяк Т. М., Смирнова Г. Н., Семенова Т. П., Гриценко Н. И.</i> Влияние 6-оксидофамина на содержание катехоламинов и ДНК неокортекса и стволовой части головного мозга крыс	412
<i>Арутюнян Л. А., Симонян А. А., Симонян Р. А.</i> Сравнительная характеристика NAD- и NADP-зависимых изоцитратдегидрогеназ в мозговой ткани кур в онтогенезе	417
<i>Куликов А. В., Попова Н. К.</i> Активность триптофангидроксилазы в головном мозгу мышей	421
Обзоры	
<i>Дамбинова С. А.</i> Глутаматные рецепторы ЦНС: организация и функции	426
Рецензии	
<i>Демин Н. Н.</i> Руководство по нейрохимии (2-е изд.), том 1—Химическая и клеточная архитектура, том 2—Экспериментальная нейрохимия, том 3—Метаболизм в нервной системе (ред. А. Лайта)	441

CONTENTS

<i>Bragin E. O., Massari D., Perth A., Durinyan R. A.</i> Involvement of brain and spinal cord noradrenalinergic and serotoninergic neurons in stress-induced Analgesia	347
<i>Rozhanets V. V., Yukhananov R. J., Chizhevskaya M. A., Navolotskaya E. V.</i> Radioimmunological distribution of DSIP—like material in rat brain and different organs	353
<i>Avanov A. J., Lipkind G. M.</i> Conformational analysis of hypothalamic cardioactive hexapeptide and its acetyl derivative	364
<i>Aliev M. H., Ragimova Sh. A.</i> Involvement of serotonin in hypothalamic control of prolactin and milk secretion	374
<i>Dumler I. L.</i> Immunochemical characteristic of protein inhibitor of cyclic GMP phosphodiesterase from retina rods' outer segments	383
<i>Sharoyan S. G., Natbandyan R. M.</i> Soluble metalloproteins of brain. Copper-containing proteins from white matter of brain	389
<i>Sherstnev K. B., Suleimanov A. K., Krichevskaya A. A.</i> Incorporation of ¹⁴ C—leucine into rat brain membrane proteins at different regimes of hyperbarooxygenation	397
<i>Kalinskaya L. N., Kononenko V. V.</i> Rat brain lysosomal enzymes and adrenal hormones levels	402

Short communications

<i>Tretjak T. M., Smirnova G. N., Semenova T. P., Grishenko N. L.</i> Influence of 6-Hydroxidopamine on the catecholamine and DNA content in rat neocortex and brain stem	412
<i>Haroutjunian L. A., Simonian A. A., Simonian R. A.</i> A comparative study of NAD- and NADP-dependent isocitrate dehydrogenases in hens brain during ontogenesis	417
<i>Kullkov A. V., Popova N. K.</i> Tryptophan hydroxylase activity in mice brain	421

Reviews

<i>Dambinova S. A.</i> CNS glutamate receptors. Structure and functions	426
---	-----

Book reviews

<i>Doemin N. N. A. Lajtha (Ed.) Handbook of Neurochemistry (Sec. ed.), vol. 1—Chemical and cellular architecture, 1982, 496 p., vol. 2—Experimental neurochemistry, 1982, 475 p., vol. 3—Metabolism in the nervous system, 1983, 698 p., New York, Plenum Press</i>	441
---	-----

СО Д Е Р Ж А Н И Е

журнала «Нейрохимия», том 2, 1983 год

Выпуск 1

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

Краткие сообщения

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

Обзоры

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

Хроника

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

Выпуск 2

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

Краткие сообщения

<i>Бресткин А. П., Розенгарт Е. В., Виняр Т. П., Абрисимова А. Т., Воронков М. Г.</i> Торможение активности холинэстераз нервной ткани лягушки и тихоокеанского кальмара кремнийорганическими аммониевыми соединениями	212
<i>Сулейманов А. К., Брониовицкая Э. Г.</i> Ганглиозиды мозга крыс при гипербароксигенации	217

Обзоры

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

Хроника

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

Выпуск 3

<i>Корнеева Н. В., Ушиков 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., Яра Я. Л.</i> Исследование кинетики термонактивации ацетилхолинэстеразы мозга крыс и бутирилхолинэстеразы сыворотки крови лошади	247

<i>Казеннов А. М., Маслова М. Н., Савина Г. В., Шалабодов А. Д.</i> Влияние отравления крыс фосфорорганическим ингибитором ацетилхолинэстеразы на активность Na^+ , K^+ -АТФазы головного мозга	256
<i>Срационян Р. М., Саакян С. А., Саакян Ф. М., Галоян А. А.</i> Выделение и характеристика кардиоактивного триптического фрагмента белка-носителя нейроромона «С»	263
<i>Бахарев 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 протениназы из мозга крупного рогатого скота	280
<i>Майзелис М. Я., Заблудовский А. Л., Шихов С. Н.</i> Нарушение синтеза белков при повреждающем действии этанола и антенатальном периоде на развивающийся мозг	283
<i>Эдмондс Х. Л. (мл.), Сыгинский И. А., Сильвестер Д. М., Беллин С. И.</i> Корреляция нейрохимических и поведенческих показателей крыс при алкогольной абстиненции	296
<i>Шилова 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., Кошетков Н. В., Беляев С. В., Лысова Н. П., Долгов О. Н., Полетаев А. Б.</i> Влияние эндогенных олигопептидных лигандов нейроспецифических белков группы S-100 на поведение	319
<i>Менджеричкий А. М., Вовченко Н. Б., Козлова Л. С.</i> Активность протеолиза в мозгу и кининовая система ликвора и крови при действии антител к основному белку миелина	323

Обзоры

<i>Ашмарин И. П., Круеликов Р. И.</i> Пептиды, обучение, память (принцип полифункциональности)	327
--	-----

Выпуск 4

<i>Брагин Е. О., Массари Д., Перт А., Дуринян Р. А.</i> Изучение роли порадерегических и серотонинергических нейронов головного и спинного мозга в антиноцицептивных механизмах стресса	347
<i>Рожанец В. В., Юхананов Г. Ю., Чижевская М. А., Новолюцкая Е. В.</i> Радионимнологическое изучение локализации ПДС-подобного материала в различных органах и отделах головного мозга крысы	353
<i>Аванов А. Я., Липкинд Г. М.</i> Конформационный анализ гипоталамического кардиоактивного гексапептида и его ацетилированного производного	364
<i>Алиев М. Г., Рагимова Ш. А.</i> Серотонин в гипоталамическом механизме контроля секреции пролактина и молока	371
<i>Думлер И. Л.</i> Иммунохимическая характеристика белкового ингибитора $3,5'$ АМР фосфодиэстеразы наружных сегментов палочек сетчатки	383
<i>Широкин С. Г., Налбандян Р. А.</i> Растворимые металлопротеины мозга. V. Медьсодержащие белки из белого вещества головного мозга	389
<i>Шерстнев К. Б., Сулейманов А. К., Кричевская А. А.</i> Включение C^{14} -лейцина в белки мембран субклеточных фракций мозга крыс при различных формах кислородной интоксикации	397

- Калинская Л. Н., Кононенко В. Я.* Исследование активности лизосомных ферментов головного мозга крыс при изменениях уровня гормонов гипофизарно-надпочечниковой системы 402

Краткие сообщения

- Третьяк Т. М., Смирнова Г. Н., Семенова Т. П., Грищенко Н. И.* Влияние 6-оксидофамина на содержание катехоламинов и ДНК неокортекса и стволовой части головного мозга крыс 412
- Арутюнян Л. А., Симонян А. А., Симонян Р. А.* Сравнительная характеристика NAD- и NADP-зависимых изоцитратдегидрогеназ в мозговой ткани кур в онтогенезе 417
- Куликов А. В., Попова Н. К.* Активность триптофангидроксилазы в головном мозгу мышей 421

Обзоры

- Дамбинова С. А.* Глутаматные рецепторы ЦНС: организация и функции 426

Рецензии

- Демин Н. Н.* Руководство по нейрохимии (2-е изд.), том 1—Химическая и клеточная архитектура, том 2—Экспериментальная нейрохимия, том 3—Метаболизм в нервной системе (ред. А. Лайта) 441

CONTENTS

Number 1

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

Short communications

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

Reviews

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

Chronicles

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

Number 2

<i>Gromova E. A., Bobkova N. V., Flakhin L. A., Tokareva A. E.</i> Brain monoamines and the effect of alcohol on rat behaviour	119
<i>Haldarlu S. H., Godukhin O. V., Budantsev A. Ju.</i> Effects of dexamethasone on 3H -dopamine release and catabolism in rat n. caudatus	130
<i>Dowedova E. L., Popova N. S., Kachalova L. M.</i> Effect of DSIP on the mono-	

aminoxydase and acetylcholinesterase activity and on the bioelectric activity of brain motor structures	138
<i>Voitenko N. N., Popova N. K.</i> Kinetic characteristics of serotonin and benzylamine deamination in hibernation	148
<i>Barkhudaryan N. A., Azaryan A. V.</i> Purification and properties of brain cathepsin S	156
<i>Terpilovskaja O. N., Ivanov V. A., Abramova Z. I., Belova M. M.</i> Nuclear proteins from rat brain in postnatal ontogenesis	164
<i>Nazaryan K. B., Karapetyan N. H., Kazaryan B. A.</i> Purification of neurospecific protein 14—3—2	174
<i>Agaeu T. M., Ptigareva Z. D.</i> Mitochondrial GABA-transaminase of dog visual analyzer in postnatal ontogenesis	180
<i>Podvigina T. T., Bogdanova T. S., Mityushov M. I.</i> Effect of corticosteroid hormones on the rate of glycolysis, respiration and oxidative phosphorylation processes in rat brain	189
<i>Koshoridze N. J., Aleksidze N. G.</i> Effect of epinephrine and hydrocortisone on rat brain disulphureductase activity	199
<i>Polyakov N. F.</i> Brain RNA and experimental intracerebral hematoma	205

Short communications

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

Reviews

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

Chronicles

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

Number 3

<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., Jürv J. L.</i> Thermal inactivation of acetylcholinesterase from rat brain and butyrylcholinesterase from horse serum	247
<i>Kazenov A. M., Mastova 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>Sraptonyan 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., Sylvestre 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 phenybut 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-kinin system in liquor and serum	323

Reviews

<i>Ashmurin I. P., Kruglikov R. I.</i> Peptides, learning, memory (polyfunctional principle)	327
--	-----

Number 4

<i>Bragin E. O., Massari D., Perth A., Durinyan R. A.</i> Involvement of brain and spinal cord noradrenalinergic and serotonergic neurons in stress-induced analgesia	347
<i>Rozhanets V. V., Yukhananov R. J., Chizhevskaya M. A., Navolotskaya E. V.</i> Radioimmunological distribution of DSIP-like material in rat brain and different organs	353
<i>Avanov A. J., Lipkind G. M.</i> Conformational analysis of hypothalamic cardioactive hexapeptide and its acetyl derivative	364
<i>Aliev M. H., Ragimova Sh. A.</i> Involvement of serotonin in hypothalamic control of prolactin and milk secretion	374
<i>Dumler I. L.</i> Immunochemical characteristic of protein inhibitor of cyclic GMP phosphodiesterase from retina rods' outer segments	383
<i>Sharoyan S. G., Nalbandyan R. M.</i> Soluble metalloproteins of brain. Copper-containing proteins from white matter of brain	389
<i>Sherstnev K. B., Suleimanov A. K., Krichevskaya A. A.</i> Incorporation of ^{14}C -leucine into rat brain membrane proteins at different regimes of hyperbarooxygenation	397
<i>Kalinskaya L. N., Kononenko V. V.</i> Rat brain lysosomal enzymes and adrenal hormones levels	402

Short communications

<i>Tretjak T. M., Smirnova G. N., Semenova T. P., Grishenko N. L.</i> Influence of 6-Hydroxydopamine on the catecholamine and DNA content in rat neocortex and brain stem	412
<i>Haroutjunian L. A., Simonian A. A., Simonian R. A.</i> A comparative study of NAD- and NADP-dependent isocitrate dehydrogenases in hens brain during ontogenesis	417
<i>Kulikov A. V., Popova N. K.</i> Tryptophan hydroxylase activity in mice brain	421

Reviews

<i>Dambinova S. A.</i> CNS glutamate receptors. Structure and functions	426
---	-----

Book reviews

<i>Doemin N. N. A. Lajtha (Ed)</i> Handbook of Neurochemistry (Sec. ed.), vol. 1—Chemical and cellular architecture, 1982, 496 p., vol. 2—Experimental neurochemistry, 1982, 475 p., vol. 3—Metabolism in the nervous system, 1983, 698 p., New York, Plenum Press	441
--	-----

К СВЕДЕНИЮ ЧИТАТЕЛЕЙ!

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

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

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

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

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