

НАУКА И ТЕХНИКА

ЖУРНАЛ НЕЙРОХИМИЯ

ISSN 0203-493X

# НЕЙРОХИМИЯ

## ՆԵՅՆՈՔԻՄԻԱ



АКАДЕМИЯ НАУК СССР  
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

АКАДЕМИЯ АРМЯНСКОЙ ССР  
АКАДЕМИЯ НАУК СССР

# НЕЙРОХИМИЯ ՆԵՅՐՈՔԻՄԻԱ

ТОМ 4, ВЫП. 1  
Январь—март

Журнал основан в 1982 году  
Выходит 4 раза в год

ИЗДАТЕЛЬСТВО АН АРМЯНСКОЙ ССР  
ЕРЕВАН 1985

Ст. редактор ХАЧАТУРОВА Э. А.

Техн. редактор АЗИЗБЕКЯН Л. А.

Сдано в набор 23.01.1985 г. Подписано к печати 23.04.1985 г. ВФ 05652.  
Бумага № 1, 70×108<sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Высокая печать. Печ. лист. 7,13. Усл. печ. лист. 9,98  
Учет.-изд. 7,97. Тираж 650. Заказ 82. Издат. 6342.  
Адрес редакции: 375044, Ереван-44, ул. П. Севака 5/1, т. 28-17-70, 28-16-52.  
Издательство АН АрмССР, Ереван, 375019, пр. Маршала Баграмяна, 24 г.  
Типография Издательства Академии наук АрмССР, Ереван-19,  
пр. Маршала Баграмяна, 24.



УДК 612.822.1:577.214.3

## СИНТЕЗ РНК В КЛЕТОЧНЫХ ЯДРАХ РАЗЛИЧНЫХ ОТДЕЛОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ ЭТИМИЗОЛА

КАПТИКОВА О. Г., БЕЛЯВЦЕВА Л. М., РАЗУМОВСКАЯ Н. Н., БОРОДКИН Ю. С.

Институт экспериментальной медицины АМН СССР, Ленинград.

Исследована РНК-синтезирующая система клеточных ядер гиппокампа, серого и белого вещества коры больших полушарий головного мозга крыс. Показано, что препараты клеточных ядер, выделенные из этих отделов мозга, различны по содержанию нейрональных и глияльных элементов, уровню матричной активности хроматина, активности РНК-полимеразы и рибонуклеазы. Введение этимизола за 1 ч до опыта повышало матричную активность хроматина и активности РНК-полимераз I и II в клеточных ядрах гиппокампа и серого вещества коры. Добавление этимизола к изолированным ядрам в опытах *in vitro* в концентрациях  $10^{-7}$ — $10^{-4}$  М стимулировало, а в концентрациях  $10^{-4}$ — $10^{-2}$  М ингибировало синтез РНК. Предполагается, что эффекты этимизола связаны с метаболизмом кальция и циклических нуклеотидов.

При изучении метаболических звеньев, связанных с процессами обучения и консолидации памяти, целесообразно использование фармакологических нейротропных препаратов, оказывающих определенное регулирующее воздействие на эти процессы. Особый интерес в этом аспекте вызывает препарат из ряда метилксантинов, являющийся моноциклическим аналогом кофеина с разомкнутым пиримидиновым кольцом, в котором произведена взаимная перестановка групп  $CO$  и  $NH$ ,—этимизол. Установлено, что этимизол (этилнорантинфен) не только стимулирует процесс обучения, но и обладает исключительной способностью к удлинению времени сохранения выработанного навыка [1].

В настоящее время считается установленным, что в консолидации долговременной памяти необходимым этапом является активация синтеза РНК. О возможном влиянии этимизола на этот процесс свидетельствует обнаруженная ранее стимуляция включения меченого уридина в клеточные ядра под влиянием больших доз этого препарата [2] или после многократного его введения [3]. Однако особенностью эффекта этимизола на память является способность улучшать закрепление следа памяти уже после его однократного введения в дозе 1,5 мг/кг.

Задачей настоящей работы явилось исследование системы синте-

за РНК и ее чувствительности к однократному введению малой дозы этимизола в различных типах клеточных ядер мозга. В качестве объекта исследования были выбраны клеточные ядра гиппокампа, серого вещества коры больших полушарий (структур, которым отводят ведущую роль в формировании энграммы памяти), а также белого вещества больших полушарий.

### Материалы и методы

В работе использовали белых крыс-самцов линии Вистар массой 200—250 г. Этимизол из расчета 1,5 мг/кг массы тела вводили внутривенно за 1 ч до декапитации; контрольным крысам вводили физиологический раствор. Клеточные ядра из серого вещества коры, белого вещества больших полушарий и гиппокампа выделяли по методу Austoker и соавт. [4]. Чистоту полученных препаратов контролировали световой микроскопией после окраски толупиновым синим. Идентификацию ядер проводили согласно Løvtun-Rein и McEwen [5]. Растворимый хроматин получали по методу Singh и Sung [6]. Чистые ядра дважды мягко гомогенизировали в ЭДТА-буфере (0,02 М ЭДТА, 0,08 М NaCl и 0,005 М трис-HCl, pH 5,4) с осаждением центрифугированием при 10000 g в течение 10 мин, затем дважды в 0,02 М трис-HCl буфере с pH 8,0 и озвучивали 90 с на ультразвуковом дезинтеграторе «УЗДН-1-У-4-2» при 44 кГц с 20-секундными перерывами через каждые 10 с. Озвученный препарат центрифугировали при 12000g 30 мин. Выход растворимого хроматина составлял около 20%. В полученных препаратах растворимого хроматина отношение белок/ДНК составляло 3,1, и величина  $A_{230}/A_{260}$  равнялась 1,3, что согласуется с литературными данными [7, 8]. О синтезе РНК судили по количеству включенного  $^3\text{H}$ -UTP в кислотонерастворимый осадок после инкубации ядер в течение 10 мин при 37°. Инкубационная среда в объеме 0,5 мл содержала (в мкмоль): трис-HCl (pH 8,0)—20; KCl—35;  $\text{MgCl}_2$ —2,5;  $\text{MnCl}_2$ —0,65; дитиотрейтол—0,5; АТФ, GTP, CTP по 0,5; 15 мкКи  $^3\text{H}$ -UTP (У.А. 22,8 Ки/моль), 0,1 мл суспензии ядер (до 20 мкг ДНК). Среда для определения матричной активности хроматина содержала дополнительно 5,05 ед. РНК-полимеразы E. coli (СКТГ БАВ, Новосибирск), количество  $^3\text{H}$ -UTP 5 мкКи на пробу.

Активность РНК-полимеразы определяли аналогичным способом. Среда для определения активности РНК-полимеразы I содержала 3 мкМ  $\text{MgCl}_2$ ; для РНК-полимеразы II—дополнительно содержала 0,3 М  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , и вместо  $\text{MgCl}_2$ —1,5 мкМ  $\text{MnCl}_2$ . По окончании реакции пребы помещали в лед, добавляя равный объем охлажденной 10%-ной ТХУ, содержащей 0,015 М PPi, Na и 0,5%-ный раствор альбумина в качестве носителя. Осадки промывали 3 раза 5%-ной ТХУ и растворяли в 2,5%-ном КОН. Радиоактивность подсчитывали в сцинтилляционной смеси Bruy [9] на счетчике Isosar-300 («Nuclear Chicago»). При определении матричной активности хроматина ТХУ-осадок переносили на миллипоровые фильтры Synpor (диаметр пор—0,3 мкм) и промывали последовательно 15 мл 5%-ной ТХУ и 10 мл этанола. Фильтры с пробами просчитывали в стандартном толуполовом сцинтилляторе. Включение метки выражали в имп/мин/мг ДНК. ДНК-зависимость включения  $^3\text{H}$ -UTP в ядра проверяли в специальных опытах с использованием актиномицина D, тормозившего включение на 95%. Добавление в пробы панкреатической рибонуклеазы (РНКазы) также тормозило включение на 90%.

Активность РНКазы ядер определяли в условиях, оптимальных для синтеза РНК, но вместо нуклеозидтрифосфатов инкубационная среда содержала 0,2 мг высокополимерной РНК из бычьей печени («Sigma», США). Инкубацию вели 10 мин при 37°, реакцию останавливали добавлением равного объема 1N хлорной кислоты с последующим центрифугированием при 1000 g 10 мин. Надосадочную жидкость разводили водой и измеряли оптическую плотность при 260 нм. За единицу РНКазной активности принимали количество белка, которое вызывает изменение оптической плотности

на 1 ед. при указанных условиях определения. Ферментативную активность выражали в ед/мг белка. Содержание ДНК определяли по Bigton [10], белка—по Lowry и соавт. [11]. Статистическую обработку данных производили с использованием критерия Стьюдента.

## Результаты и обсуждение

Определение способности клеточных ядер головного мозга интактных животных включать  $^3\text{H}$ -УТР показало, что клеточные ядра из коры больших полушарий, выделенные из серого и белого вещества и имеющие различный морфологический состав (препараты ядер серого вещества коры содержали в среднем 70% нейрональных ядер, а белого—70—80% глиальных), отличаются по исходному уровню синтеза РНК: включение  $^3\text{H}$ -УТР в ядра серого вещества было примерно в 1,7 раз выше, чем в ядра белого вещества (табл. 1). Полученные ре-

Таблица 1

Влияние этимизола на синтез РНК в клеточных ядрах головного мозга крыс

| Отделы мозга                                | Уровень включения $^3\text{H}$ -УТР в кислотонерастворимую фракцию ядер, нм/мин/мг ДНК |                      | Изменение относительно контроля, % |
|---------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|------------------------------------|
|                                             | Контроль                                                                               | Опыт                 |                                    |
| Серое вещество коры больших полушарий (n=9) | 1179600 $\pm$ 48392                                                                    | 1486600 $\pm$ 83217  | +26<br>p<0,01                      |
| Белое вещество больших полушарий (n=7)      | 711610 $\pm$ 37784                                                                     | 688860 $\pm$ 41770   | -4<br>p>0,05                       |
| Гиппокамп (n=7)                             | 1053700 $\pm$ 7875                                                                     | 1303700 $\pm$ 101400 | +24<br>p<0,05                      |

*Примечание.* Здесь и в табл. 2, 3, 4 n—число опытов. В каждом опыте использовали по 20 животных, результат опыта является усредненной величиной. Таким образом, общее количество животных равно n $\times$ 20, но средняя ошибка рассчитана для величины n.

зультаты согласуются с имеющимися в литературе данными о неодинаковой способности различных типов клеточных ядер мозга к синтезу РНК [4, 12]. Нельзя не отметить, что различия в уровне включения  $^3\text{H}$ -УТР в кислотонерастворимую фракцию ядер зависят не только от различного содержания нейрональных и глиальных элементов, но и от функциональных особенностей ткани, так как препараты ядер гиппокампа, содержавшие приблизительно одинаковое количество нейрональных и глиальных ядер, включали  $^3\text{H}$ -УТР с такой же интенсивностью, что и ядра серого вещества коры больших полушарий.

Через 1 ч после внутрибрюшинного введения этимизола наблюдалось увеличение интенсивности включения меченого предшественника РНК в ядра серого вещества коры и гиппокампа (на 26 и 24% соответственно) при отсутствии достоверных изменений РНК-синтезирующей активности в ядрах из белого вещества больших полушарий (снижение на 4%). Чтобы выяснить, не обусловлено ли увеличение

интенсивности включения  $^3\text{H}$ -УТР в ядра торможением распада вновь синтезированной РНК под влиянием этимизола, была определена суммарная РНКазная активность исследуемых клеточных ядер (табл. 2). Было установлено, что, если скорость распада РНК в клеточных ядрах измеряли в условиях, оптимальных для определения РНК-синтезирую-

Таблица 2

Влияние этимизола на РНКазную активность клеточных ядер головного мозга крыс

| Отделы мозга                                       | РНКазная активность<br>$\Delta A_{260}$ мг белка · 10 мин |                | Изменение<br>относительно<br>контроля,<br>% |
|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|----------------|---------------------------------------------|
|                                                    | Контроль                                                  | Опыт           |                                             |
| Серое вещество коры<br>больших полушарий<br>(n=10) | $3,0 \pm 0,11$                                            | $3,5 \pm 0,31$ | +17<br>$p > 0,05$                           |
| Белое вещество боль-<br>ших полушарий<br>(n=4)     | $5,6 \pm 0,54$                                            | $4,7 \pm 0,46$ | -61<br>$p > 0,05$                           |
| Гиппокамп<br>(n=4)                                 | $4,8 \pm 0,62$                                            | $4,7 \pm 0,58$ | —                                           |

щей активности, однократное введение этимизола увеличивало, хотя и недостоверно, уровень РНКазной активности в ядрах из серого вещества коры (на 17%) и снижало его в ядрах из белого вещества (на 16%). Следовательно, усиление включения  $^3\text{H}$ -УТР в этих условиях было обусловлено увеличением именно скорости синтеза РНК.

Таблица 3

Влияние этимизола на РНК-полимеразную активность клеточных ядер головного мозга крыс (в имп/мин/мг ДНК)

| Отделы мозга                                      | Контроль                 |                           | Опыт                     |                                               |                           |                                                    |
|---------------------------------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------|----------------------------------------------------|
|                                                   | РНК-по-<br>лимераза<br>I | РНК-по-<br>лимераза<br>II | РНК-по-<br>лимераза<br>I | Изменение<br>относитель-<br>но контроля,<br>% | РНК-по-<br>лимераза<br>II | Измене-<br>ние отно-<br>сительно<br>контроля,<br>% |
| Серое вещество коры<br>больших полушарий<br>(n=7) | 184870<br>$\pm 5929$     | 1093300<br>$\pm 51614$    | 222290<br>$\pm 25716$    | +20<br>$p > 0,05$                             | 1248700<br>$\pm 100550$   | +14<br>$p > 0,05$                                  |
| Белое вещество<br>больших полушарий<br>(n=7)      | 123780<br>$\pm 8163$     | 619110<br>$\pm 40762$     | 91876<br>$\pm 7434$      | -26<br>$p < 0,02$                             | 560360<br>$\pm 76579$     | -9<br>$p > 0,05$                                   |
| Гиппокамп<br>(n=7)                                | 183370<br>$\pm 6828$     | 1196600<br>$\pm 42045$    | 246100<br>$\pm 17305$    | +34<br>$p < 0,02$                             | 1680400<br>$\pm 205720$   | +40<br>$p < 0,05$                                  |

Далее были исследованы обе части транскрипционного комплекса: ферментативная и матричная. Сравнение активностей двух форм РНК-полимераз во всех исследуемых типах ядер показало, что у нитратных животных их соотношение было сходно с соотношением уровней общего включения  $^3\text{H}$ -УТР в ядра. Наименьшей активностью обладали РНК-полимераза I и II в препаратах ядер из белого вещества (табл. 3). Введение этимизола за 1 ч до опыта оказывало небольшое

стимулирующее влияние на ферменты серого вещества коры и существенно активировало обе формы полимераз гиппокампа, в то время как в белом веществе наблюдалось незначительное снижение активности этих ферментов.

При транскрипции хроматин, выделяемых из исследуемых ядер, экзогенной РНК-полимеразой *E. coli* у интактных животных было выявлено обратное соотношение: наибольшей матричной активностью обладал хроматин белого вещества. Этимизол изменял матричную активность хроматина в том же направлении, что и активность полимераз, но в более выраженной степени; особенно значительно и в этом случае оказалось повышение активности хроматина гиппокампа (табл. 4).

Таблица 4

Влияние этимизола на матричную активность хроматина клеточных ядер различных отделов головного мозга крыс

| Отделы мозга                          | Уровень включения эН-УТР нмп/мин/мг ДНК $\times 10^3$ |                          | Изменение относительно контроля, % |
|---------------------------------------|-------------------------------------------------------|--------------------------|------------------------------------|
|                                       | Контроль                                              | Опыт                     |                                    |
| Серое вещество коры больших полушарий | 6918 $\pm$ 574<br>(n=10)                              | 9338 $\pm$ 293<br>(n=8)  | +35<br>p<0,01                      |
| Белое вещество больших полушарий      | 13475 $\pm$ 644<br>(n=6)                              | 8823 $\pm$ 1906<br>(n=5) | -35<br>p=0,05                      |
| Гиппокамп                             | 4879 $\pm$ 974<br>(n=7)                               | 10899 $\pm$ 943<br>(n=6) | +123<br>p<0,01                     |

Приведенные данные позволяют заключить, что изменение функционального состояния головного мозга в результате действия этимизола сопровождалось увеличением РНК-синтезирующей способности клеточных ядер нейронов (но не глиальных клеток). Этимизол активировал как хроматин, так и ферменты транскрипции, причем наибольшую чувствительность к нему проявляли хроматин и РНК-полимеразы гиппокампа.

В настоящее время можно рассматривать различные предполагаемые пути действия этимизола на генетический аппарат клетки. Если исходить из данных о повышении концентрации сАМР в ткани в результате введения больших доз препарата [2], можно предполагать, что этимизол, взаимодействуя с аденозиновыми рецепторами на клеточной мембране [13], активирует аденилатциклазу, что приводит к активации сАМР-зависимых протеникиназ. В таком случае влияние этимизола на функционирование ядерных структур клетки должно осуществляться опосредованно, через клеточные мембраны. Вместе с тем, при исследовании распределения меченого этимизола между цитоструктурами ткани мозга ранее нами было обнаружено, что наибольшая доля метки связывается с клеточными ядрами и с одной из фракций белков эндоплазматической сети [14]. В связи с этим представлялось интересным выяснить возможность влияния этимизола на



синтез РНК при его непосредственном контакте с ядрами в опытах *in vitro*. Результаты этих опытов, представленные на рисунке, показали, что изолированные ядра также обладают чувствительностью к этимизолу. Его влияние проявлялось в строгих концентрационных границах.

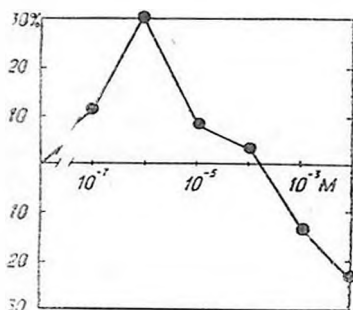


Рис. Влияние этимизола на РНК-синтезирующую активность ядер клеток серого вещества коры больших полушарий головного мозга крысы в опытах *in vitro*. По оси абсцисс — концентрация добавленного этимизола в М; по оси ординат — изменение уровня синтеза РНК в % по отношению к контролю.

нах и носило двухфазный характер: этимизол в концентрациях  $10^{-7}$  —  $10^{-4}$  М стимулировал синтез РНК, в концентрациях же  $10^{-4}$  —  $10^{-2}$  М — ингибировал. Этот факт свидетельствует о возможности существования каких-то акцепторных участков для этимизола на самих клеточных ядрах.

Так как этимизол является структурным аналогом кофенна, можно полагать также, что его эффекты связаны с изменениями кальциевого гомеостаза клеточных ядер. Предварительные данные, полученные нами, указывают на изменение чувствительности хроматина к  $\text{Ca}^{2+}$  после введения этимизола. По-видимому, влияние этимизола на внутриклеточные процессы, как и влияние других метилксантинов, реализуется через систему кальций — циклические нуклеотиды, однако конкретные пути его действия подлежат выяснению.

## RNA SYNTHESIS IN THE DIFFERENT BRAIN CELL NUCLEI IN AETHIMIZOL TREATED ANIMALS

KULIKOVA O. G., BELYAVTSEVA L. M., RAZUMOVSKAYA N. I.,  
BORODKIN Yu. S.

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

The RNA synthesizing system in the cellular nuclei of rat hippocampus, cerebral cortex and cerebral hemispheres white matter was studied. The injection of aethimizol results in 1 h in an increase of both template activity chromatin and activity of RNA polymerase I and II in the nuclei of hippocampus and cerebral cortex. *In vitro* aethimizol ( $10^{-7}$  M —  $10^{-4}$  M) stimulates RNA synthesis in isolated nuclei while in concentration of  $10^{-4}$  —  $10^{-2}$  M inhibits it. It is supposed that the aethimizol effects are related to the metabolism of calcium and cyclic nucleotides.

# Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Бородкин Ю. С., Зайцев Ю. В.—В кн.: Нейрохимические и функциональные основы долговременной памяти. с. 141—184. Л., Медицина, 1982.
2. Заводская И. С., Мигас Э. А., Новиков В. П. Фармакология и токсикология, т. 45, № 2, с. 5—9, 1982.
3. Дамбинова С. А., Шабанов П. Д. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 81, с. 306—307, 1981.
4. Austoker J., Cox D., Mathias A. P. Biochem. J., v. 129, p. 1139—1155, 1972.
5. Løutrup-Rein H., McEwen B. J. Cell Biol., v. 30, p. 405—415, 1966.
6. Singh V. K., Sung S. C. Biochem. J., v. 130, p. 1095—1099, 1972.
7. Грумбкова Л. О., Бохонько Л. И. Биохимия, т. 45, с. 1146—1150, 1980.
8. Миронов Н. М., Лобансков В. В., Шапог В. С. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 89, с. 164—165, 1980.
9. Dyer A. An Introduction to Liquid Scintillation Counting, p. 29—31, (London; Heyden) 1974.
10. Burton K. Biochem. J., v. 62, p. 315—323, 1956.
11. Lowry O. H., Rosebrough J. N., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
12. Джохадзе Д. И. Биохимические особенности клеточных ядер различных тканей, с. 1—176, Тбилиси, Мецниереба, 1977.
13. Мигас Э. А. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 94, с. 70—71, 1982.
14. Разумовская Н. И., Лапина И. А., Белявцева Л. М., Куликова О. Г., Матисева И. М., Лосев Н. А., Бородкин Ю. С.—В кн.: Тезисы Всесоюз. симп. «Механизмы временной организации клетки и их регуляция на различных уровнях», с. 36, Пушкино, 1983.

Поступила 16. V 1984



УДК 616.831—097.2

ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ ТУБУЛИНА,  
ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ НЕРВНОЙ ТКАНИ

АНДРОСОВА Л. В., БУРБАЕВА Г. Ш.

Всесоюзный научный центр психического здоровья АМН СССР, Москва

Антигенные свойства тубулина, выделенного из мозга быка, изучали с помощью антисывороток, полученных против препаратов тубулина, выделенного полимеризацией-деполимеризацией с последующей очисткой от минорных примесей на фосфоцеллюлозе, а также модифицированного бычьим сывороточным альбумином и денатурацией при обработке додецилсульфатом натрия. Специфичность и титр антисывороток исследовали в реакции двойной иммунодиффузии. Реакция идентичности между нативным и денатурированным тубулином указывает на то, что обработка додецилсульфатом натрия не изменяет антигенную детерминанту белка. Специфические антитела к тубулину были выявлены в антисыворотках к конъюгату и к денатурированному тубулину, причем титр был выше при иммунизации конъюгатом.

Имеющиеся в настоящее время данные о некоторых различиях в кинетике реакции полимеризации—деполимеризации и колхичинсвязывающей активности тубулина, выделенного из ткани разных органов [1—4], позволяют предположить их структурные различия, которые, по-видимому, могут быть выявлены иммунохимическими методами с использованием моноспецифических антисывороток. Вместе с тем существуют трудности получения моноспецифической антисыворотки к тубулину, связанные с его низкой антигенностью [5—7].

Целью данной работы было изучение антигенных свойств нативного и модифицированного тубулина. Модификацию тубулина для усиления его антигенности проводили двумя методами: конъюгированием с бычьим сывороточным альбумином (БСА) и денатурацией при обработке додецилсульфатом натрия (ДДС-Na).

## Материалы и методы

Тубулин выделяли из ткани мозга быка методом полимеризации-деполимеризации, описанным Shelanski и соавт. [1], через 1,5—3 ч после забоя животного. В отличие от общепринятого метода в качестве рабочего буфера использовали 50 мМ  $K^+$ ,  $Na^+$ -фосфатный буферный раствор, содержащий 1 мМ  $MgCl_2$ , pH 6,7 при 20°. В процессе выделения использовали 0,1 мМ GTP («Sigma», США) и 1 мМ ЭГТА («Serva», ФРГ).

Исследовали возможность ступенчатого выделения тубулина: процесс его получения прерывали на стадии полимеризации микротрубочек, их осадок суспендировали в 25 mM  $K^+$ ,  $Na^+$ -фосфатном буфере, содержащем 1 mM  $MgCl_2$ , 4 M глицерина и 1 mM ЭГТА. Для выделения тубулина препарат микротрубочек вновь инкубировали 1 ч при 37° и затем центрифугировали при 100000g в течение 1 ч при 25—30°. Осадок микротрубочек суспендировали в рабочем растворе, остальные этапы выделения тубулина из микротрубочек повторяли, как описано Shelanski и соавт. [1].

Полученные препараты тубулина хранили до полутора лет при -20°, или же в виде микротрубочек в 8 M глицерине в течение года при тех же условиях. При проведении деполимеризации таких микротрубочек их предварительно разбавляли в 2 раза рабочим раствором (50 mM  $K^+$ ,  $Na^+$ -фосфатный буфер, содержащий 1 mM  $MgCl_2$  и 2 mM ЭГТА). К полученному раствору добавляли 0,1 mM GTP, инкубировали при 37° 1 ч, центрифугировали при 100000g 1 ч при 25—30° и далее проводили все операции, как описано выше [1]. Сохранность тубулина контролировали электрофоретически, по способности связываться с колхицином и иммунологически.

Для получения тубулина, свободного от минорных компонентов (микротубулоассоциированных белков), использовали хроматографию на фосфоцеллюлозе [8]. Тубулин элюировали с колонки 25 mM  $K^+$ ,  $Na^+$ -фосфатным буфером, содержащим 1 mM  $MgCl_2$ , 1 mM  $\beta$ -меркаптоэтанол и 0,1 mM ЭДТА, а микротубулоассоциированные белки элюировали 1 M NaCl в том же буфере и затем проводили диализ против него, после чего белковый раствор лиофилизировали.

Денатурированный тубулин получали методом электрофореза в ПААГ-пластинке (25×12×1,5 см), содержащей ДДС-Na, на которую наносили 1,2—1,5 мг тубулина, выделенного методом полимеризации-деполимеризации. По окончании электрофореза из геля вырезали зону, соответствующую тубулину (предварительно выявленную при окрашивании электрофоретической дорожки). Элюцию белка проводили 0,005 M фосфатным буферным раствором, pH 7,0, содержащим 0,05%-ный ДДС-Na, в течение 18 ч при 37°. После диализа против деионизированной воды белок лиофилизировали.

Для доказательства того, что выделенный белок является тубулином, был проведен ряд контролей: 1. Электронномикроскопический контроль на стадии полимеризации микротрубочек. Отобранную аликвоту суспензии микротрубочек (5—10 мл) центрифугировали при 70000g 1 ч при 25—30°. Осажденные микротрубочки фиксировали 2%-ным раствором глутарового альдегида в 0,1 M фосфатном буферном растворе, pH 7, 4, в течение 10 мин при комнатной температуре. Далее обработку материала проводили по общепринятой схеме [9]. Ультратонкие срезы изучали в электронном микроскопе «Philips-201-C» (Голландия)\*. 2. Определение колхицин-вызывающей активности тубулина по методу Sherline и соавт. [2], используя  $^3H$ -колхицин [ $^3H$ -C-methoxy]-Colchicine; 5,0 Ci/mole, "Amersham", Англия).

3. Определение величины  $M_r$  и гомогенности тубулина методом электрофореза в 10%-ном ПААГ, содержащем 0,1% ДДС-Na [10] с использованием необходимых стандартных белков («Sigma», США): бычий альбумин, яичный альбумин, пепсин, трипсин,  $\beta$ -лактоглобулин, лизоцим.

Иммуные сыворотки получали путем иммунизации кроликов по схеме, разработанной в нашей лаборатории [11]. В качестве антигена использовали три вида препаратов тубулина: 1) тубулин, полученный полимеризацией-деполимеризацией и очищенный на фосфоцеллюлозе (исходный препарат); 2) конъюгат этого препарата с БСА; 3) гомогенный препарат тубулина, полученный в результате обработки исходного препарата ДДС-Na с последующей элюцией из ПААГ, содержащего ДДС-Na, после проведения электрофореза.

\*Электронномикроскопическое исследование препаратов проведено сотрудниками отдела морфологии нашего центра В. И. Андерс и О. М. Литвиновой, которым авторы приносят свою благодарность.



*Рис. 1.* Электрофореграммы тубуллин мозга быка, выделенного методом полимеризации-деполимеризации, из свежей (*а*) и замороженной (*б*) ткани



*Рис. 2.* Электронная микрофотография микротрубочек, выделенных из мозга быка. Препарат обрабатывали 1%-ной осмиевой кислотой в течение 30 мин с последующей проводкой в 20, 40, 50, 70, 96, 100%-ном спирте.  $\times 70000$

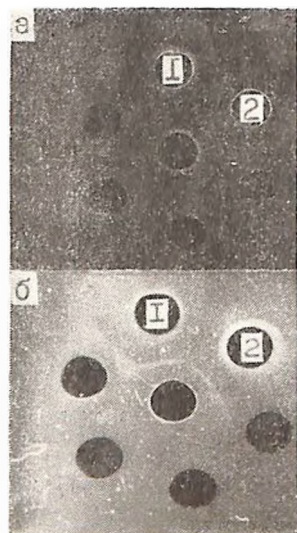


Рис. 4. Реакция двойной иммунодиффузии при иммунизации кроликов препаратами NT (а) и NT-БСА (б). 1. NT—тубулин мозга, выделенный методом полимеризации-деполимеризации и очищенный на фосфоселлюлозе (1 мг/мл); 2. NT—тубулин мозга, выделенный препаративным электрофорезом (1 мг/мл); в центре—антисыворотка к тубулину мозга—NT (а) и к конъюгату тубулина мозга с БСА—NT-БСА (б); в остальных лунках—физиологический раствор.

Конъюгирование тубулина с БСА проводили, используя метилированный БСА («Serga», ФРГ) [12].

Для истощения антител к БСА антисыворотки, полученные против конъюгата, абсорбировали хроматографией на имуносорбенте—сефароза-4В-БСА [13].

Титр и специфичность полученных антисывороток определяли в реакции двойной иммунодиффузии в агаровом геле [14]. При этом исследуемую антисыворотку вносили в центральную лунку, а в периферические лунки—последовательные двукратные разведения препаратов тубулина с исходной концентрацией 8 мг/мл. За титр принимали максимальное разведение экстракта, которое образует преципитат с исследуемой антисывороткой.

## Результаты и обсуждение

Было проведено сравнительное исследование возможности выделения тубулина методом полимеризации-деполимеризации [1] из свежей и замороженной ткани мозга быка. При выделении оценивали однородность и выход полученного препарата. Как видно из электрофограммы (рис. 1, а), тубулин, выделенный из свежей ткани мозга быка, имеет четко различимую доминантную зону с  $M_r$  54,00—0,65 кД, что совпадает с литературными данными [15, 16], и несколько минорных компонентов. Белки минорных зон, по-видимому, являются микротубулоассоциированными белками, так как они обнаруживаются, причем не изменяясь количественно, при повторных циклах полимеризации-деполимеризации. Эти белки не только инициируют и регулируют процесс полимеризации, но и сами включаются в структуру микротрубочек [17].

Таблица

Выход тубулина, полученного методом полимеризации-деполимеризации из свежей и замороженной ткани мозга быка

| Материал           | Масса ткани, г | Общее количество водорастворимых белков в экстракте, мг | Количество препарата тубулина, мг | Количество препарата тубулина в % от общего количества водорастворимых белков экстракта |
|--------------------|----------------|---------------------------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| Свежая ткань       | 640            | 5090                                                    | 370                               | 7                                                                                       |
|                    | 800            | 6750                                                    | 660                               | 10                                                                                      |
|                    | 600            | 4930                                                    | 390                               | 8                                                                                       |
|                    | 100            | 1070                                                    | 80                                | 7,5                                                                                     |
|                    | 100            | 1070                                                    | 85                                | 8                                                                                       |
|                    | 120            | 1450                                                    | 120                               | 8                                                                                       |
| Замороженная ткань | 500            | 4733                                                    | 19,8                              | 0,4                                                                                     |
|                    | 650            | 5576                                                    | 24,7                              | 0,4                                                                                     |
|                    | 670            | 5400                                                    | 23,6                              | 0,4                                                                                     |

Тубулин, выделенный из замороженной ткани, представлял собой гетерогенный препарат (рис. 1, б), при этом выход белка был в 17—25 раз ниже, чем из свежей ткани (таблица).

Следовательно, выделение тубулина возможно проводить только из свежей ткани, полученной через 1,5—3 ч после забоя животного.

Электронномикроскопические исследования подтвердили, что полученный в процессе полимеризации препарат состоит из структур, характерных для микротрубочек (рис. 2).



Выделенный препарат тубулина связывается с колхицином, причем уровень колхицинсвязывающей активности полученного белка согласуется с данными, приводимыми в работе Sherline и соавт. [2] (рис. 3).

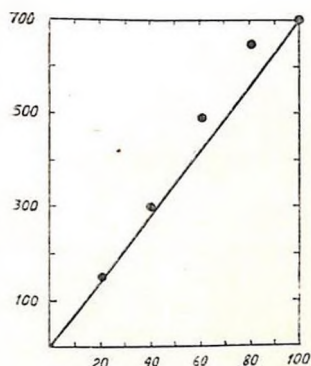


Рис. 3. Зависимость связывания колхицина от концентрации тубулина мозга быка. Концентрация тубулина 7 мг/мл принята за 100%

Таким образом, нами был выделен тубулин, обладающий колхицинсвязывающей активностью и имеющий характерную для данного белка величину  $M_r$ .

Для исследования антигенной активности нативного и модифицированного тубулина проводили иммунизацию кроликов нативным препаратом тубулина, очищенным на фосфоцеллюлозе (НТ); конъюгатом его с БСА (НТ-БСА), а также тубулином, денатурированным ДДС-На и элюированным из геля после электрофореза (ДТ). Специфичность антисывороток оценивали в тесте двойной иммунодиффузии в агаровом геле. Антисыворотки тестировали двумя видами препаратов тубулина—НТ и ДТ.

Показано, что при иммунизации препаратами НТ антитела не вырабатывались (рис. 4, а).

Антисыворотки, полученные против конъюгата (НТ-БСА), после предварительной абсорбции БСА в реакции преципитации с НТ давали одну зону, при этом титр в реакции двойной иммунодиффузии был в пределах 1/32—1/64 при исходной концентрации тубулина 8 мг/мл. Полученная специфическая антисыворотка к тубулину реагировала как с НТ, так и с ДТ, давая при этом реакцию идентичности между этими белками (рис. 4, б). Это указывает на то, что во-первых, антисыворотка направлена только к тубулину, и, во-вторых, обработка ДДС-На не изменяет антигенную детерминанту тубулина.

Антисыворотки, полученные к препарату ДТ в реакции двойной иммунодиффузии, давали тоже одну зону преципитации с НТ и ДТ, однако титр этих антител был невысок (1/2—1/4) при концентрации тубулина 8 мг/мл. При дальнейших циклах иммунизации титр антител увеличивался незначительно.

Так как при иммунизации НТ были получены отрицательные результаты, то, следовательно, он обладает низкой иммуногенностью, что согласуется с данными литературы [5—7].

Полученные результаты позволяют заключить, что оба используемых нами метода—конъюгирование с БСА и денатурация ДДС-На—повышают антигенную активность тубулина. В обоих случаях были получены моноспецифические антисыворотки, реагировавшие также с НТ, что указывает на сохранение нативности антигенных детерминант тубулина в модифицированных препаратах. Анализ полученных



антисывороток показал, что конъюгирование тубулина с БСА в большей степени усиливает антигенные свойства, чем его денатурация. Таким образом, для получения моноспецифической антисыворотки необходимо более эффективно проводить иммунизацию кроликов конъюгатом тубулина с БСА.

## ANTIGENIC PROPERTIES OF TUBULIN ISOLATED FROM NERVOUS TISSUE

ANDROSOVA L. V., BURBAEVA G. Sh.

All-Union Research Center of Mental Health, USSR Academy of Medical  
Sciences, Moscow

3 kinds of tubulin samples from bovine brain were used for raising antiserum: 1) tubulin, purified by means of polymerization-depolymerization and further separated from microtubule-associated proteins by chromatography on phosphocellulose (sample I); 2) a conjugate of sample I with BSA; 3) tubulin, eluted from PAG after electrophoresis of the sample I, in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS).

The specificity and titer of antiserum was tested in the reaction of double immunodiffusion. Identity reaction between the native and denaturated tubulin indicated that SDS treatment didn't change the antigen determinants of the protein. Antitubulin specific antibodies were detected in the antiserum against conjugate and denaturated protein, the titer of the anticonjugate antiserum being higher.

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Shelanski M. L., Gaskin F., Cantor C. R. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 70, № 3, p. 763—768, 1973.
2. Sherline P., Bodwin C. K., Kipnis D. M. Anal. Biochem., v. 62, p. 400—407, 1974.
3. Barnes L. D., Roberson G. M. Arch. Biochem. and Biophys., v. 196, № 2, p. 511—524, 1979.
4. Ray P., Strott C. A. Biochim. et biophys. acta, v. 581, № 1, p. 79—86, 1979.
5. Anbin J. E., Subrahmanyam L., Kalnins V. I., Ling V. Proc. Nat. Acad. Sci. USA v. 73, № 4, p. 1246—1249, 1976.
6. Wiche G., Cole R. D. Exp. Cell Res., v. 99, № 1, p. 15—22, 1976.
7. Eckert B. S., Snyder J. A. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 75, № 1, p. 331—338, 1978.
8. Lockwood A. H. Cell, v. 13, 613—627, 1978.
9. Андрей В. Н., Сальников В. В. Цитология, т. 20, № 5, с. 581—583, 1978.
10. Shapiro A. L., Vinuela E., Maize J. V. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 28, p. 815—820, 1967.
11. Клишник Т. П., Бурбаева Г. Ш. Биохимия, т. 48, № 7, с. 1203—1208, 1983.
12. Moore B. W., Perez V. J., Genring M. J. Neurochem., v. 15, с. 265—272, 1972.
13. Игнатов С. А.—Журн. невропатол. и психиатрии, т. 1, с. 48—51, 1977.
14. Гусев А. И.—В кн.: Иммунохимический анализ (под ред. Л. А. Зильбера), с. 99—120. М., Медицина, 1968.

15. *Berkowitz S. A., Katagiri J., Binder H. K., Williams R. C.* Biochemistry, v. 16, № 25, 5610—5617, 1977.
16. *El-Hamlatwi A.—R. A.* Biochem. J., v. 169, p. 717—719, 1978.
17. *Bender P., Rebbun L. I., Benjamin D. C.* Biochim. et biophys. acta, v. 708, p. 149—159, 1982.

Поступила 28. V 1984

## ИЗДАТЕЛЬСТВО «CHURCHILL LIVINGSTONE»

(Великобритания)

опубликована книга «Научные основы клинической нейрологии» (под ред. M. Swash и Ch. Kennard, 820 с. 1984 г.).

В коллективной монографии, авторами которой являются 67 представителей различных нейронаук, дается всестороннее описание нейрохимических и физиологических механизмов, относящихся к патологии центральной и периферической нервной системы.

## ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР» В 1985 г. ПРЕДЛАГАЕТ:

НИКОЛС Д. Биоэнергетика. Введение в хемиосмотическую теорию (пер. с англ.). М., «Мир», 1985 (1 кв.)—13 л. Тираж 8000 экз., цена 1 р. 40 к.

Книга известного английского биохимика посвящена хемиосмотической теории, создатель которой П. Митчел был удостоен в 1978 г. Нобелевской премии. Рассмотрены принципы энергетических превращений, происходящих в биологических мембранах, дана краткая характеристика клеточных структур в мембранах которых осуществляется транспорт ионов и различных биологических молекул.

Предназначена для биохимиков, биофизиков и молекулярных биологов.



## ИЗМЕНЕНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ СИНАПТОСОМНЫХ БЕЛКОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЦЫПЛЕНКА В ПРОЦЕССЕ ИМПРИНТИНГА

КЛЕПН Е. Э., ГВАЛНИЯ Н. В.

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

С целью изучения биохимического механизма импринтинга— своеобразной формы долговременной памяти—было проведено исследование количественных изменений фракций синапсомных белков переднего мозга цыпленка. Выявлена группа фракций, величина которых возросла при импринтировании. Произведено сравнение с изменением аналогичных фракций в мозгу крысы при формировании другого вида памяти—условно-рефлекторной. Отмечено наличие как сходства, заключающегося в количественном увеличении аналогичных фракций, так и некоторых различий, указывающих на особый путь синтеза белков в случае импринтинга.

Импринтинг—своеобразная, самая ранняя форма долговременной памяти, имеющая большое биологическое значение, как необходимое условие сохранения вида. Механизм его еще мало изучен. Явление импринтинга (запечатления), как известно, заключается в том, что новорожденный детеныш быстро и прочно запоминает первый же предмет (любой формы), движущийся в поле его зрения, и неуклонно следует за ним, как за матерью. Вначале эта способность приписывалась только некоторым видам животных, у которых она наиболее четко проявляется: выводковым птицам и некоторым копытным. Но позднее она была обнаружена, более или менее выраженно, почти у всех животных, вплоть до приматов. Однако наиболее удобным объектом изучения этого явления, не затмившего другими поведенческими реакциями, остаются птенцы выводковых птиц—цыплята и утята [1, 2].

Ранее импринтинг изучался только физиологами, которые разработали лабораторные приемы его исследования: предложив вначале так называемый аппарат Гесса, представляющий собой огражденную дорожку для передвижения птенца вслед за перемещением импринт-объекта («манеж»), затем стали применять и другие приемы импринтирования [2—5].

В настоящее время выполнен ряд исследований, посвященный раскрытию биохимического механизма этого вида памяти [4—13].

Благодаря этим исследованиям были выяснены следующие вопро-

сы. 1). Процесс импринтирования связан с активацией синтеза ДНК и белков, в том числе двух белков, специфических для проведения нервного импульса: ацетилхолинорецептора (АХР) и АХЭ [7—11]. 2) Эта активация происходит в определенных областях мозга цыпленка, расположенных, главным образом, в стриатуме (полосатом теле). Ногн указывает, что основными зонами запоминания являются области в вентральном гипостриатуме, названная им *intermediate hyperstriatum ventrale* (IMHV), а также близрасположенная область, именуемая «участком S» [11]. 3) Специфичность областей мозга проверяли опытами по влиянию их повреждения на успешность импринтирования [11]. 4) Существенным является наблюдение об асимметрии полушарий в отношении биохимических сдвигов при импринтировании [10, 11]. 5) Помимо указанных изменений в интенсивности синтеза белков, некоторыми авторами отмечаются сдвиги в биосинтезе и других соединений, например, некоторых биогенных аминов [13].

По современным представлениям, в основе возникновения долговременного следа памяти лежит формирование определенного ансамбля нейронов, что связано с активацией синтеза некоторых специфических и неспецифических ферментных и рецепторных белков [14—17]. Поэтому имеются основания допустить, что этот процесс наиболее выражен в областях синаптических контактов. Ранее нами было показано, что при обучении крыс обнаруживается группа синаптосомных белков, количество которых при обучении увеличивается. В этой группе показано наличие АХР, а также выявлена возможность присутствия и других рецепторов [18—20].

При исследовании импринтинга, являющегося одной из форм долговременной памяти, можно было ожидать изменения аналогичных белковых фракций. Поэтому мы и предприняли их изучение, применив для выделения этих белков те же седиментационные и электрофоретические приемы, что и при исследовании мозга крыс.

### Материалы и методы

Яйца кур инкубировали при 37—38°. Цыплят сразу после вылупления изолировали в отдельные коробки и содержали при 30°. Через 15—20 ч после вылупления они импринтировались в аппарате Гесса с манежем диаметром 1 м. В качестве импринт-объекта был применен полупрозрачный полиэтиленовый сосуд красного цвета с лампочкой от карманного фонарика внутри, который вращался вдоль дорожки манежа. После 5—7-кратного прохождения (или пробега) цыпленка вслед за объектом происходило прочное его запоминание, что проверяли тестированием на второй день. Был применен так называемый «световой» контроль. Цыплят того же возраста помещали по одному в тот же манеж (но без импринт-объекта) приблизительно на то же время, которое было затрачено на обучение. Освещение—как при импринтировании—рассеянный свет сверху. Затем обученных и контрольных цыплят помещали поодиночке в коробки и содержали при 25°.

На второй день (после тестирования) цыплят забивали, из полушарий переднего мозга методами дифференциального центрифугирования в градиенте сахарозы выделяли фракцию синаптических мембран [18—20]. Белки экстрагировали 1%-ным тритоном X-100 и подвергали электрофорезу в ПААГ тремя способами: 1) электрофорез в боратном буфере при pH 8,6; 2) электрофокусирование в градиенте pH

4.0—9.5; 3) способ, удачно заменяющий довольно сложный метод двумерного разделения, заключающийся в том, что из фореграммы, полученной при электрофорезе в боратном буфере pH 8,6, вырезается область, требующая дальнейшего разделения. Полученный «ломтик» гомогенизируется и гомогенат наносится на трубку с ПААГ для электрофокусирования [21], то есть двумерному разделению подвергается только требуемая фракция.

Полученные фореграммы денситометрировали и определяли площадь под пиками обычными методами.

### Результаты и обсуждение

Для представления о характере распределения фракций белков синаптических мембран переднего мозга цыпленка в контроле и его изменении при импринтинге на рис. 1 приведены денситограммы одного из опытов. Из этого рисунка видно, что основная масса белков распо-

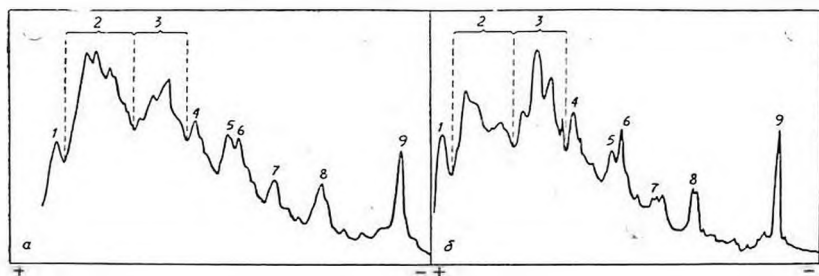


Рис. 1. Фракционирование белков трионового экстракта синаптических мембран переднего мозга цыпленка путем электрофореза в ПААГ в боратном буфере, pH 8,6: а—контроль, б—импринтинг.

лагается в катодной части фореграммы в двух группах фракций: второй и третьей. Остальные белки сосредоточены в семи небольших фракциях. Разница между группами второй и третьей всегда четкая, но внутри этих групп количество пиков и границы между ними не всегда различаются. Видимо, эти белки близки по своей электрофоретической подвижности. Для количественной оценки были рассмотрены не отдельные пики, а указанные группы целиком. После импринтирования происходят количественные сдвиги: визуально заметно, что наиболее значительны изменения в упомянутых двух группах.

Количественная оценка и статистическая обработка данных приведена в таблице, из которой видно, что, действительно, достоверные изменения, связанные с импринтингом, происходят во второй и третьей группах. На 6,0% увеличивается третья группа и одновременно, почти на ту же величину (на 5,8%) уменьшается менее подвижная вторая группа. Величина остальных фракций достоверно не меняется. Необходимо учесть, что приведенные в таблице величины количественных изменений фракций кажутся незначительными только потому, что выражают процент от общего количества белков, то есть группа 3, составляющая 22,6%, увеличивается до 28,6%, а группа 2 уменьшается с 34,9% до 29,1%. Таким образом, по отношению к величине самой

фракции, сдвиги представляются весьма значительными—они составляют 1/4 и 1/6 исходной величины фракции. Изменения эти всегда однонаправлены и достоверны:  $p_2 < 0,05$ , а  $p_3 < 0,02$ .

Таблица

Изменение величины электрофоретических фракций белков синаптических мембран переднего мозга цыпленка при импринтинге электрофорез триптонового экстракта в боратном буфере pH 8,6)

| Условия опыта   | №№ фракций       |                     |                     |                     |                    |                    |                    |                    |                    |
|-----------------|------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|                 | 1                | 2                   | 3                   | 4                   | 5                  | 6                  | 7                  | 8                  | 9                  |
| Контроль (I)    | 5,0<br>$\pm 1,1$ | 34,90<br>$\pm 1,14$ | 22,6<br>$\pm 1,0$   | 11,1<br>$\pm 0,7$   | 6,10<br>$\pm 0,33$ | 6,8<br>$\pm 0,7$   | 4,00<br>$\pm 0,41$ | 3,50<br>$\pm 0,38$ | 3,90<br>$\pm 0,31$ |
| Импринтинг (II) | 6,0<br>$\pm 1,4$ | 29,10<br>$\pm 1,36$ | 28,60<br>$\pm 1,28$ | 10,70<br>$\pm 0,59$ | 5,90<br>$\pm 0,33$ | 6,90<br>$\pm 0,16$ | 3,90<br>$\pm 0,41$ | 3,3<br>$\pm 0,4$   | 3,60<br>$\pm 0,71$ |
| Разность II—I   | 1,0              | -5,8<br>$p < 0,05$  | 6,0<br>$p < 0,02$   | -0,4                | -0,2               | 0,1                | -0,1               | -0,2               | -0,3               |

Примечание. Изменения всех фракций, кроме 2- и 3-й, недостоверны  $p > 0,2$

При сравнении вышеописанных наблюдений с результатами наших прежних исследований (изучение синаптосомных белков мозга крыс при выработке условно-рефлекторной памяти) выявили, с одной стороны, их сходство, заключающееся в том, что при обучении крыс также происходило нарастание электрофоретически аналогичных фракций и примерно на ту же величину—с 19,5 до 25,1% [20], но, с другой стороны, в опытах с крысами это увеличение происходило гораздо медленнее: за 7—10 дней обучения и, вместе с тем, не наблюдалось достоверного уменьшения какой-либо другой фракции.

Сопоставление отличий в изменении аналогичных белковых фракций при двух видах памяти с хорошо известным своеобразием импринтинга, по-видимому, свидетельствует об особенностях пути белкового синтеза при формировании данного вида памяти.

Своеобразные черты импринтинга, отличающие его от других форм памяти, заключаются в следующем: 1) запоминание совершается только в первоначальный очень короткий период постнатальной жизни (до 30 ч) при функционально неразвитом мозге (это последнее обстоятельство специально подчеркивается исследователями—мозг морфологически уже сформирован, но функционально не развит [7, 11]); 2) период обучения очень короткий—около 1 ч; 3) обучение сопровождается сильным эмоциональным напряжением, а также, как отмечают некоторые исследователи [6], более быстрым развитием мозга; 4) импринтинг биологически особенно необходим для сохранения вида. Короче говоря, при формировании энграммы импринтинга крайне необходимо в кратчайшие сроки создать множество разнообразных белков. Как же эта задача выполняется еще недоразвитым организмом?

В литературе встречаются указания на возможность в некоторых

случаях ускоренного синтеза белков путем быстрой активации так называемых «белков-предшественников», то есть заранее синтезированных физиологически неактивных «заготовок» [22]. Сообщается, что это происходит, например, в случае необходимости быстрого синтеза в организме трипсина и инсулина: из «предшественников» — трипсиногена и проинсулина, представляющих собой длинные полипептидные цепи, не обладающие ферментной активностью. Под действием же протеазы быстро «отстригается» часть полипептидной цепи, что вызывает появление специфической активности.

Гипотеза об участии подобного механизма в импринтинге была предложена Haywood и соавт. [8], которые, обнаружив быстрое нарастание активности АХЭ при импринтинге, были вынуждены допустить, что белок был синтезирован *перед* импринтингом, а во время обучения за очень короткое время произошла его активация путем быстрой конформационной перестройки (пути активации, конечно, в случае разных белков могут быть разные).

Нам кажется правомерным допустить, что синтез и других белков, необходимых для развития импринтинга, может происходить таким же образом — путем быстрой конформационной перестройки предварительно синтезированного «предшественника». Возможность наличия у «предшественника» такого качества, как избыточная длина полипептидной цепи соответствовала бы нахождению их в более медленной электрофоретической фракции (как это имело место в наших опытах), которая должна была бы уменьшаться.

В случае правильности высказанного предположения становится объяснимым отсутствие фракции, уменьшающейся при обучении крыс (о чем было сказано выше), так как в этом случае особой необходимости в ускоренном формировании энграммы нет и синтез белков может происходить обычным путем.

В некоторой степени с нашими данными согласуются цитированные выше результаты Заалишвили [12], которая, исследуя изменения распределения фракций общих мембранных белков мозга цыпленка при импринтинге, также нашла уменьшение одной (тоже второй) фракции, занимающей сходное положение на денситограмме. Нужно учесть, однако, что ею исследовались синапсомные белки совместно с митохондриальными.

Из всего вышесказанного следует, что наше представление об особом «ускоренном» синтезе белков, необходимых для консолидации памяти при импринтинге, сложилось, главным образом, на основании умозрительных сопоставлений, которые, однако, кажутся нам достаточно убедительными. Для получения экспериментальных доказательств нужно выяснить природу исследуемых белков. Для этого, прежде всего, необходимо их более детальное разделение. Наиболее часто применяемым способом для достижения этой цели является двумерное разделение с использованием в качестве одного из направлений электрофокусирования, но оно дает настолько большое количество

отдельных фракций, что оценка денситограммы требует машинной обработки, а это пока затруднительно.

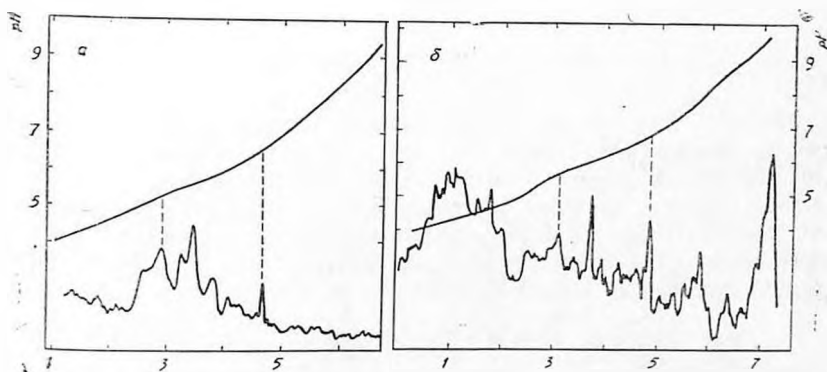


Рис. 2. Электрофокусирование в ПААГ тритоновых экстрактов: а—экстракт участка фореграммы в ПААГ (денситограмма с которой дана на рис. 1. а), содержащего вторую и третью группы фракций (вторичное разделение этих белков), б—цельный экстракт белков синаптических мембран

Поэтому мы воспользовались методом, описанным выше (в разделе «Материалы и методы»), при помощи которого были подвергнуты электрофокусированию интересные нас фракции: вторая и третья [21]. Полученная при этом кривая (рис. 2, а) была сопоставлена с кривой электрофокусировки цельного экстракта синапсомных белков (рис. 2, б). Видно, что из множества пиков общего экстракта, интересующим нас группам белков принадлежит только восемь, расположенных между рН 5,5 и 6,8. Относительно крайнего пика (рН 5,5) можно предположить, что он является холинорецепторным белком, судя по литературным данным о величине изоэлектрической точки этого белка [23].

В дальнейшем предстоит изучить функциональные свойства остальных белков, представленных пиками указанной денситограммы (рис. 2, б). Учитывая данные, полученные Собчинской и соавт. [13], о накоплении при импринтинге некоторых биогенных аминов, можно ожидать наличия в этой группе фракций ферментных белков, связанных с метаболизмом этих аминов, и, кроме того, некоторых компонентов сАРМ и  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулиновой систем, которые присутствуют в синапсомных мембранах [17].

При изучении этого вопроса нельзя упускать из виду то обстоятельство, что, хотя с процессами памяти связана активация синтеза целого ряда белков, изменения, происходящие при обучении, связаны не только с запоминанием [11, 24], и для выявления последних могут потребоваться дополнительно специальные методы исследования.



# CHANGES IN THE DISTRIBUTION OF BRAIN SYNAPTOSOMAL PROTEINS IN THE PROCESS OF IMPRINTING

KLEIN H. E., GVALIA N. V.

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

To study the biochemical mechanism of imprinting quantitative changes in synaptosomal protein fractions in chicken forebrain have been investigated. A group of fractions was revealed the amount of which increased during imprinting. Comparison was made with the similar protein fractions in the rat brain during formation of another type of memory—conditioned-reflex memory. A difference was found, indicating a peculiar pathway of protein synthesis during imprinting.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Дьюсбери Д. Поведение животных. Сравнительные аспекты, М., Мир, 1981.
2. Понугаева А. Г. Импринтинг (Запечатление), Л., Наука, 1973.
3. Bateson P. P. G., Horn G., Rose S. P. R. Brain Res., v. 39, p. 445—465, 1972.
4. Рижинашвили Р. С., Мониава Э. С., Марсагишвили Г. А., Мосидзе В. М. Сообщ. АН ГССР, т. 105, с. 589—592, 1982.
5. Рижинашвили Р. С., Зурабишвили Э. А., Мосидзе В. М., Марсагишвили Г. А. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 92, с. 16—17, 1981.
6. Chapotier C. La Recherche, v. 8, p. 994—995, 1977.
7. Horn G., Rose S. P. R., Bateson P. P. G. Science, v. 181, p. 506—514, 1973.
8. Haywood J., Hambley J., Rose S. P. R. Brain Res., v. 92, p. 219—225, 1975.
9. Horn G., McGabe B. J., Bateson P. P. G. Brain Res., v. 168, p. 361—373, 1979.
10. Bredley P., Horn G., Bateson P. P. G. Experim. Brain Res., v. 41, p. 115—120, 1981.
11. Horn G. VIII Гагск не беседы (под ред. Оннани Т. И.), Тбилиси, Мещнереба, 1983.
12. Заалишвили Э. А., Рижинашвили Р. С., Марсагишвили Г. А. Сообщ. АН ГССР, т. 97, с. 181—184, 1980.
13. Собчинская Н. М., Рижинашвили Р. С., Марсагишвили Г. А. Сообщ. АН ГССР, т. 102, с. 461—463, 1981.
14. Кометиани П. А., Алексидзе Н. Г., Клейн Е. Э. Нейрохимические аспекты памяти (под ред. Кругликова Р. И.), Тбилиси, Мещнереба, 1980.
15. Кометиани П. А. VII Гагские беседы (под ред. Оннани Т. И.), с. 472—484, Тбилиси, Мещнереба, 1979.
16. Кометиани П. А. Нейрохимия, т. 1, с. 394—405, 1982.
17. Микадзе Д. Г. Циклические нуклеотиды, ионы кальция и протеинкиназные реакции в нервной ткани, Тбилиси, Мещнереба, 1983.
18. Клейн Е. Э., Чоговадзе Н. С. Изв. АН ГССР, сер. биол., т. 4, с. 509—515, 1978.
19. Клейн Е. Э. Сообщ. АН ГССР, т. 94, с. 701—704, 1979.
20. Клейн Е. Э., Чоговадзе Н. С. Вопросы биохимии нервной и мышечной систем, с. 204—217, Тбилиси, Мещнереба, 1979.
21. Ruddel A. A., Jacob-Lorena M. Anal. Biochem., v. 122, p. 248—252, 1982.
22. Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э., Хилл Р., Леман Н. Основы биохимии, М., Мир, т. 1, 1981.
23. Природа холинорецептора и структура его активного центра (под ред. Вепринцева). Пушкино, 1975.
24. Кругликов Р. И. Нейрохимические механизмы обучения памяти, М., Наука, 1981.

Поступила 7. IX 1984



УДК 577.112:612.822.1

## ВЛИЯНИЕ БЕЛКА S-100 НА ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ ЯДЕРНЫХ БЕЛКОВ МОЗГА КРЫСЫ; УЧАСТИЕ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ

КАПРАЛОВ А. А., БАЛКОВ Д. И., ТЮЛЕНЕВ В. И., БЕЛИК Я. В.  
Институт биохимии им. А. В. Палладина АН УССР

В опытах *in vitro* показано, что  $\text{Ca}^{2+}$  в концентрациях  $10^{-5}$ — $10^{-6}$  М уменьшает стимулирующее действие нейроспецифического белка S-100 на фосфорилирование ядерных белков мозга крыс. Прединкубация белка S-100 с  $\text{Ca}^{2+}$  ( $10^{-5}$  М) в течение 4 и 18 ч значительно увеличивает его стимулирующее действие на процесс фосфорилирования. Высказывается предположение, что действие белка S-100 на фосфорилирование обусловлено не изменением концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , а его взаимодействием с этим белком. Установлено, что для стимулирующего действия белка S-100 на процесс фосфорилирования необходима определенная концентрация  $\text{Ca}^{2+}$ .

Ранее нами было показано, что нейроспецифический белок S-100 увеличивает фосфорилирование определенной группы ядерных белков мозга, но не печени [1]. Известно, что добавление  $\text{Ca}^{2+}$  изменяет конформацию этого белка [2, 3]. При этом происходит образование дисульфидных мостиков между двумя из трех молекул цистеина, входящих в состав белка S-100 [4]; наблюдается перераспределение гидрофильных и гидрофобных фракций белка [5]; появляются дополнительные фракции при хроматографии белка на ДЭАЭ-целлюлозе [2, 6—8]. Учитывая способность белка S-100 связывать  $\text{Ca}^{2+}$  и участие этих ионов в регуляции внутриклеточных процессов [8], мы исследовали его действие на фосфорилирование ядерных белков в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$  и некоторые механизмы этого процесса.

### Материалы и методы

В опытах были использованы самцы белых крыс массой 150—200 г. Животных декапировали, ядерную фракцию мозга выделяли по методу Buidman [9], ядра печени — по методу Тюленева и соавт. [10], белок S-100 получали из мозга быка по методу Stewart [7]; в опытах использовали белковую фракцию IC, которую идентифицировали методами иммунопреципитации и электрофореза. Полученные препараты белка S-100 выходили одним пиком при хроматографии на сефадексе G-100, мигрировали одной полосой при электрофорезе в 7,5 и 10%-ных ПААГ и давали единственную полосу преципитации в реакции иммунодиффузии. В гелях с большим содержанием акриламида белковый препарат распадался на несколько полос; в зависимости от

условий электрофореза количество полос изменялось, однако все они реагировали с антисывороткой к белку S-100. Используемая в этих опытах антисыворотка была идентична антисывороткам, полученным ранее [6]. Наши результаты по гетерогенности белка S-100 соответствуют литературным данным [7, 11]. Фосфорилирование ядерных белков исследовали в инкубационной смеси следующего состава: 50 мМ трис-HCl (pH 7.5), 25 мМ  $MgCl_2$ , 10 мкМ  $[\gamma\text{-}^{32}P]\text{ATP}$  (удельная радиоактивность 1000 К<sub>n</sub> (ммоль), 1 мг ядерных белков, 40 мкг белка S-100 [12]. Контролем служили пробы, содержащие, помимо указанных компонентов, ТХУ в конечной концентрации 5%. В зависимости от условий опыта в инкубационную среду добавляли  $10^{-7}$ — $10^{-4}$  М  $Ca^{2+}$  или  $10^{-7}$ — $10^{-4}$  М ЭГТА. Инкубацию проводили так, как описано ранее [1]. Для определения радиоактивности использовали нитроцеллюлозные фильтры «Синпор» № 8 (Чехословакия), которые помещали в сцинтилляционную жидкость ЖС-1 и измеряли радиоактивность исследуемых образцов, используя жидкостный сцинтилляционный счетчик SL-30 «Intertechnique» (Франция). Белок определяли по методу Whittaker [13]. О фосфорилировании судили по включению  $^{32}P$  в имп/мин/мг белка. В некоторых случаях перед измерением радиоактивности из исследуемых образцов экстрагировали нуклеиновые кислоты и липиды. Нуклеиновые кислоты удаляли обработкой осадка 5%-ной ТХУ при 90° в течение 30 мин. Липиды экстрагировали, используя хлороформ-метанол [14]. После удаления нуклеиновых кислот и липидов абсолютные значения получаемых результатов уменьшались, однако соотношения между ними оставались прежними.

### Результаты и обсуждение

Прежде всего было изучено влияние  $Ca^{2+}$  на белок S-100-зависимое фосфорилирование ядерных белков мозга. Для этого в инкубационную среду добавляли  $Ca^{2+}$  вместе с белком S-100. Обнаружено,

Таблица

Влияние  $Ca^{2+}$  и ЭГТА на стимулированное белком S-100 фосфорилирование белков ядерной фракции мозга

| Условия опыта                                                               | Включенное $^{32}P$<br>(имп/мин/мг<br>белка) | % к конт-<br>ролю | p     |
|-----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|-------------------|-------|
| Контроль (без белка S-100)                                                  | $42038 \pm 647$<br>(n=13)                    | 100               | —     |
| +белок S-100                                                                | $56521 \pm 689$<br>(n=13)                    | 136               | <0,01 |
| +белок S-100 + $10^{-5}$ М $Ca^{2+}$                                        | $50967 \pm 829$<br>(n=11)                    | 121               | <0,01 |
| +белок S-100 + $10^{-6}$ М $Ca^{2+}$                                        | $41995 \pm 1296$<br>(n=5)                    | 100               | >0,5  |
| +белок S-100, прединкубированный с ядерной фракцией + $10^{-5}$ М $Ca^{2+}$ | $45504 \pm 3967$<br>(n=10)                   | 108               | >0,5  |
| +белок S-100 + $10^{-5}$ М ЭГТА                                             | $50616 \pm 799$<br>(n=5)                     | 120               | <0,05 |
| +белок S-100, прединкубированный с $Ca^{2+}$ в течение 18 ч                 | $101118 \pm 4434$<br>(n=9)                   | 204               | <0,01 |
| +белок S-100, прединкубированный с $Ca^{2+}$ в течение 4 ч                  | $76449 \pm 6050$<br>(n=6)                    | 182               | <0,01 |

что  $Ca^{2+}$  в концентрациях  $10^{-6}$  и  $10^{-5}$  М снижает стимулирующее действие этого белка на фосфорилирование белков ядерной фракции (таблица). Причем в присутствии  $10^{-6}$  М  $Ca^{2+}$  фосфорилирование

снижается до уровня контроля. Это может быть обусловлено тем, что белок S-100, связывая ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , находящиеся в среде, уменьшает их концентрацию, что вызывает увеличение фосфорилирования ядерных белков. Следовательно, добавление этих ионов должно снижать действие белка S-100, что мы и наблюдаем. То есть, уровень фосфорилирования определяется концентрацией  $\text{Ca}^{2+}$ , а белок S-100 играет лишь роль фактора, изменяющего ее. Кроме этого,  $\text{Ca}^{2+}$ , изменяя конформацию белка S-100 или структур, с которыми он взаимодействует, может создавать определенные затруднения для его действия на фосфорилирование, и, таким образом, сам белок S-100 влияет на этот процесс.

Учитывая, что  $\text{Ca}^{2+}$ , входящий в состав инкубационной среды, может изменять конформацию белка S-100 еще до его контакта с ядрами, мы несколько изменили условия эксперимента и стали добавлять белок в инкубационную среду вместе с ядерной фракцией, проинкубировав их перед этим совместно при  $4^\circ$  в течение 30 мин. В этом случае наблюдается еще большее ингибирование белок S-100-зависимого фосфорилирования ядерных белков. Этот эффект трудно объяснить, исходя из предположения о действии белка S-100 на фосфорилирование через изменение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , так как в этом случае концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  не изменяется.

Для более детального выяснения того, как  $\text{Ca}^{2+}$  сам по себе влияет на фосфорилирование ядерных белков, мы изучили его действие на этот процесс в изолированной ядерной фракции мозга. Одновременно для сравнения было изучено влияние  $\text{Ca}^{2+}$  на фосфорилирование белков в ядрах печени. Было обнаружено, что  $\text{Ca}^{2+}$  в концентрациях  $10^{-6}$  —  $10^{-3}$  М практически не влияет на включение  $^{32}\text{P}$  в белки ядер мозга (рис. 1). Ядра печени при этих концентрациях  $\text{Ca}^{2+}$  недостоверно изменяют уровень фосфорилирования. Предположив, что отсутствие эффекта в этом случае может быть обусловлено ионами  $\text{Ca}^{2+}$ , находящимися в среде в отсутствие экзогенного  $\text{Ca}^{2+}$ , мы добавляли в инкубационную среду, содержащую  $10^{-6}$  М  $\text{Ca}^{2+}$ , ЭГТА, который их связывает. Обнаружено, что в ядрах клеток мозга ЭГТА уменьшает фосфорилирование ядерных белков (рис. 2). Причем при меньших концентрациях ЭГТА в пробе этот эффект выражен сильнее. Следует отметить, что в ядерной фракции как мозга, так и печени наблюдается эффект ЭГТА на фосфорилирование. При низких концентрациях ЭГТА наблюдается ингибирование фосфорилирования, исчезающее при высоких концентрациях этого реагента. Полученные результаты позволяют высказать предположение о существовании двух зависимых от  $\text{Ca}^{2+}$  процессов, противоположно влияющих на фосфорилирование белков в ядрах. Интересно отметить, что подобные процессы могут протекать в ядерной фракции мозга и печени, что указывает на их неспецифический характер. Эти выводы подтверждаются одинаковым характером кривых в опытах, в которых исследовалось влияние различных концентраций  $\text{Ca}^{2+}$  на фосфорилирование на фоне  $10^{-5}$  М ЭГТА

(рис. 1, 2). Можно полагать, что при физиологических концентрациях  $\text{Ca}^{2+}$  в реакциях фосфорилирования участвуют и другие факторы, которых недостаточно при добавлении экзогенного кальция. Это подтверждается литературными данными, свидетельствующими о том, что, например, в цитозоле мозга для  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимого фосфорилирования необходим  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимый регуляторный белок (кальмодулин) [15]. Подобные данные получены для ядер клеток печени [16] и мозга [17]. Обнаружено, что молекула белка S-100 имеет два места связывания  $\text{Ca}^{2+}$  с сильным сродством к нему и пять—со слабым [18]. Исходя из того, что величина  $M_r$  белка S-100 равна 20 кД, его концентрация в наших опытах составляет  $0,6 \cdot 10^{-6}$  М. Оценить, сколько  $\text{Ca}^{2+}$  свя-

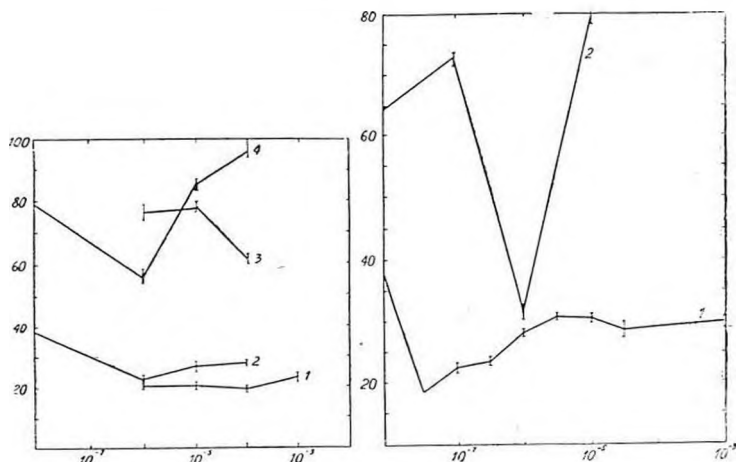


Рис. 1. Зависимость фосфорилирования белков ядерных фракций мозга и печени крыс от концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ . 1. ядра мозга; 2. ядра мозга +  $10^{-5}$  М ЭГТА; 3. ядра печени; 4. ядра печени +  $10^{-5}$  М ЭГТА. По оси абсцисс—концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  (М); по оси ординат—включение  $^{32}\text{P}$  ( $\text{нмп/мин/мг белка} \times 10^{-3}$  М)

Рис. 2. Зависимость фосфорилирования белков ядерных фракций мозга (1) и печени (2) крыс от концентрации ЭГТА. По оси абсцисс—концентрация ЭГТА (М); по оси ординат—включение  $^{32}\text{P}$  ( $\text{нмп/мин/мг белка} \times 10^{-3}$  М)

зывается в наших условиях, исходя из этих данных, трудно, так как равновесие наступает через 20—24 ч. Однако можно сделать заключение, что если бы белок S-100 действовал на фосфорилирование только за счет изменения концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , как это отмечается в случае ЭГТА, то при его добавлении к ядрам мозга происходило бы ингибирование этого процесса (рис. 2), хотя мы наблюдаем активирование (таблица). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что наше предположение о действии белка S-100 на фосфорилирование ядерных белков путем изменения концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  не находит достаточного экспериментального подтверждения.

Таким образом, из полученных данных можно заключить, что белок S-100 стимулирует фосфорилирование ядерных белков только при определенной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ . При её изменении в большую или меньшую сторону действие белка S-100 на фосфорилирование ядерных белков уменьшается. Этот вывод можно сделать, исходя из того, что при добавлении в среду одновременно  $10^{-5}$  М ЭГТА, связывающего  $\text{Ca}^{2+}$ , и белка S-100, фосфорилирование увеличивается в меньшей степени по сравнению с контролем, чем при добавлении одного белка (таблица). Маловероятно, что в этом случае белок S-100 и ЭГТА действует на разные, несвязанные между собой системы фосфорилирования, хотя полностью исключить эту возможность нельзя.

Учитывая, что используемый в наших опытах белок получается в отсутствие  $\text{Ca}^{2+}$ , а изменения его конформации происходят в течение достаточно длительного времени (до 24 ч) [19], мы прединкубировали белок S-100 в среде инкубации, содержащей  $\text{Ca}^{2+}$  в концентрации  $10^{-5}$  М, в течение нескольких часов, после чего изучали его действие на фосфорилирование. Было обнаружено, что после прединкубации с  $\text{Ca}^{2+}$  в течение 4 ч белок S-100 увеличивает фосфорилирование ядерных белков на 46% по сравнению с непрединкубированным белком, а после прединкубации в течение 18 ч — на 68%. По сравнению с фосфорилированием в отсутствие белка S-100 это увеличение составляет соответственно 82 и 104% (таблица). Возможно, что именно этот эффект имеет место в нативном ядре, где белок S-100 постоянно находится в контакте с  $\text{Ca}^{2+}$ . При электрофорезе изменения конформации белка S-100 наблюдаются при концентрациях  $\text{Ca}^{2+}$   $10^{-6}$  —  $10^{-8}$  М (при больших концентрациях  $\text{Ca}^{2+}$  полосы становятся более диффузными) [2]. Приблизительно такие же условия обнаружены в клетке, где концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  составляет в состоянии покоя  $10^{-8}$  —  $10^{-6}$  М, а при возбуждении увеличивается до  $10^{-5}$  М [20]. Исходя из данных литературы и наших результатов, можно предположить, что изменения концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  при возбуждении нервной клетки имеют важное значение для регуляции действия белка S-100 на фосфорилирование ядерных белков. Подобный механизм обнаружен в синапсомозгах, деполяризация которых может вызывать фосфорилирование определенных белков посредством увеличения концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  [21]. Не исключено, что белок S-100 может принимать участие в реализации подобных процессов в ядрах. Однако связать действие белка S-100 с какими-то определенными протенинказами в настоящее время пока не представляется возможным.

Интересно отметить, что в цитоплазме белок S-100 влияет на фосфорилирование определенных белков. Но в этом случае он, вероятно, действует путем изменения концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  [22]. Действие белка S-100 можно сравнить с действием кальмодулина, который, в отличие от белка S-100, обнаружен в составе многих тканей и также участвует в процессах фосфорилирования белков. Не исключено, что физиологическое значение этих белков подобно. Показано присутствие

в мозгу кальмодулинзависимых протеникиназ [23], причем две из них фосфорилируют один и тот же специфический белок нервных окончаний в различных участках его молекулы [24]. В ядре также обнаружена  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулинзависимая протеникиназа [16]. По аналогии можно предполагать, что в клетке имеются и белок S-100-зависимые протеникиназы.

По-видимому, механизмы действия кальмодулина на фосфорилирование белков несколько отличаются от механизма действия белка S-100. Так, кальмодулин способен активировать протеникиназу только в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$ . В отсутствие этих ионов он не влияет на активность протеникиназ.

Таким образом, можно сделать вывод, что действие белка S-100 на фосфорилирование ядерных белков зависит от  $\text{Ca}^{2+}$ , что может иметь важное значение в регуляции этих процессов в физиологических условиях.

## PARTICIPATION OF $\text{Ca}^{2+}$ IN S-100 PROTEIN-DEPENDENT PHOSPHORYLATION OF PROTEINS OF RAT BRAIN NUCLEI

KAPRALOV A. A., BALKOV D. I., TYULENEV V. I., BELIK Ja. V.

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

It was shown that addition of  $\text{Ca}^{2+}$  ( $10^{-6}$ — $10^{-5}$  M) to the incubation mixture decreased stimulating action of neurospecific S-100 protein on phosphorylation of rat brain nuclear proteins. Preincubation of S-100 protein with  $\text{Ca}^{2+}$  for 4—18 hours increased significantly its stimulating action on the phosphorylation. It was suggested that S-100 protein's action depends on its interaction with  $\text{Ca}^{2+}$ . It was stated that certain concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  maintained in nucleus was required for the stimulating action of S-100 protein.

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Тюленев В. И., Капралов А. А., Смерчинская Л. С., Белик Я. В. Биохимия, т. 48, № 5, с. 827—831, 1983.
2. Calissano P., Moore B. W., Friesen A. Biochemistry, v. 8, № 11, p. 4818—4326, 1969.
3. Moore B. W.—In: Handbook of Neurochemistry, v. 6, p. 93—99, N. Y., Plenum Press, 1969.
4. Палладин А. В., Смерчинская Л. С. Укр. біохім. журн., т. 41, № 3, с. 398—406, 1971.
5. Старостина М. В., Свиридов С. М. Молекуляр. биология, т. 12, № 2, с. 372—376, 1978.
6. Смерчинська Л. С., Белик Я. В., Сироватська Л. П., Бірилло Т. М. Укр. біохім. журн., т. 48, № 5, с. 609—613, 1976.
7. Stewart J. A. Biochim. et biophys. acta, v. 263, № 1, p. 178—192, 1972.
8. Rasmussen H. Science, v. 170, № 3956, p. 404—412, 1970.
9. Burdman J. A. J. Neurochem., v. 19, p. 1459—1469, 1972.

10. Тюленев В. Н., Масюк А. И., Бердышев Г. Д. Биохимия, т. 44, № 8, с. 1441—1446, 1979.
11. Uyemura K., Vincendon G., Gombos G., Mandel P. J. Neurochem., v. 18, № 3, p. 429—438, 1971.
12. Perumal L. S., Rapport M. M. Life Sci., v. 22, № 9, p. 803—808, 1978.
13. Whittaker J. P., Granum P. E. Annual. Biochem., v. 109, № 1, p. 156—159, 1980.
14. Виркем Дж., Броукхьюз Р.—В кн.: Биохимическое исследование мембран, с. 227—254, М., Мир, 1979.
15. Yamauchi T., Fujisawa H. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 90, № 4, p. 1172—1178, 1979.
16. Sikorska M., Mac Manus J. P., Walker P. R., Whitfield J. F. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 93, № 4, p. 1196—1203, 1980.
17. Калакдадзе Н. В., Фрайкина Т. Я., Микеладзе Д. Т.—В сб.: Девятая Всесоюзная конференция по биохимии нервной системы, с. 58—59, Ереван, 1983.
18. Callssano P., Atema S., Fasella P. Biochemistry, v. 22, № 13, p. 4553—4560, 1974.
19. Rusca G., Callssano P. Biochim. et biophys. acta, v. 221, № 1, p. 74—85, 1970.
20. Cheung W. Y. Science, v. 207, № 4426, p. 19—27, 1980.
21. Krueger B. K., Forh J., Greengard P. J. Biol. Chem., v. 252, № 8, p. 2764—2773, 1977.
22. Patel J., Marangos P. J. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 109, p. 1089—1093, 1982.
23. Yamauchi T., Fujisawa J. FEBS Lett., v. 116, № 2, p. 141—144, 1980.
24. Kennedy M. B., Greengard P. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 78, № 2, p. 1293—1297, 1981.

Поступила 5. VIII. 1984





УДК 577.23+577.153+615.779.94

ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И СВОЙСТВА РАСТВОРИМОЙ  
МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ  $H^+$ -АТРАЗЫ МОЗГА БЫКА

ХВАТОВА Е. М., НОВИКОВА Н. А., КОРЯГИН А. С.

Медицинский институт, Горький

Растворимая митохондриальная  $H^+$ -АТРаза мозга быка выделена методом ультразвуковой дезинтеграции субмитохондриальных частиц, предварительно обработанных хлороформом. Очистка фермента проводилась последовательно кислотной precipitation, высаливанием  $(NH_4)_2 SO_4$ , термообработкой и вновь высаливанием. Электрофорез в ПААГ выявил гомогенность полученного белка. У. А. фермента составила 16—24 мкмоль  $P_i$ /мин/мг белка.  $K_m$  для  $Mg$  АТР равна 0,69 мМ. В растворе  $(NH_4)_2 SO_4$  (50% насыщения) при температуре  $+4^\circ$  активность фермента сохраняется в течение нескольких месяцев. Растворимая АТРаза не чувствительна к олигомицину и ингибируется водорастворимым карбонимидом.

Для нервной ткани характерен высокий уровень энергетического обмена со значительной скоростью образования АТР (0,6—2,4 мкмоль АТР/г ткани/мин), поскольку ее основные функции связаны с большой затратой энергии [1]. Наименьшей структурной единицей, способной осуществлять катализ всех связанных с превращением АТР процессов, является  $H^+$ -АТРАЗный комплекс, чувствительный к олигомицину, в состав которого входят несколько индивидуальных белков с величиной  $M_r$  от 11 до 380 кД и фосфолипиды. Самым высокомолекулярным компонентом в составе АТРАЗного комплекса является растворимая митохондриальная  $H^+$ -АТРаза (сопрягающий фактор  $F_1$ ). С этим ферментом связывают осуществление АТР-гидролазной и АТР-синтетазной реакций [2].

Растворимая АТРаза получена из различных тканей, дрожжей, хлоропластов, бактерий [3—7].

Описан ряд методов выделения этого фермента: экстракция АТРАЗы из ацетонового порошка [8], выделение фермента при ультразвуковой обработке субмитохондриальных частиц (СМЧ) [9] или митохондрий [10], экстрагирование фактора  $F_1$  из СМЧ хлороформом [11] и др.

Однако получить достаточно активный препарат  $H^+$ -АТРАЗы из митохондрий мозга при использовании методов, предложенных в литературе для фермента из других источников, нам не удалось. Выделен-

ный фермент обладал незначительной У.А. ( $\sim 1$  мкмоль  $P_i$ /мин/мг белка).

Разработанная нами методика получения растворимой митохондриальной  $H^+$ -АТразы мозга быка учитывает особенности химического состава нервной ткани, обогащенной липидами [12].

### Материалы и методы

*Выделение* митохондриальной фракции из головного мозга проводили методом дифференциального центрифугирования [13]. Для получения фракции, обогащенной митохондриями и одновременно лишенной миелина и синапсом, применяли центрифугирование в ступенчатом градиенте плотности сахарозы (0,7—1,2—1,45 М, pH 7,5) при 60000g в течение 120 мин. Полученную фракцию хранили при  $-20^\circ$ . Освобождение митохондрий от наружных мембран проводили на основе метода, предложенного Шиппакимым и соавт. [9]. Использовали гипотоническую среду, содержащую 0,02 М трис-HCl (pH 7,5). Суспензию митохондрий в данной среде выдерживали при  $0^\circ$  в течение 30 мин, затем центрифугировали 30 мин при 10000g. Полученный осадок ресуспендировали в среде, содержащей 0,9 М NaCl, 0,02 М трис-HCl (pH 7,5) и центрифугировали при 6000g в течение 10 мин. Отсутствие в митохондриях примеси наружных мембран контролировали методом электронной микроскопии.

Полученные СМЧ обрабатывали хлороформом при температуре  $0^\circ$ , к суспензии СМЧ в 0,25 М сахарозе добавляли 0,5 объема хлороформа при постоянном перемешивании. Осаждение частиц проводили центрифугированием при 10000g в течение 10 мин. Осадок СМЧ, обработанных хлороформом, суспендировали в среде, содержащей 0,1 М сахарозы, 1 мМ ЭДТА, 10 мМ трис-HCl (pH 7,5) и озвучивали в течение 5 мин на ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-2Т при частоте 22 кГц. После этого раствор центрифугировали при 140000g в течение 30 мин, осадок вновь суспендировали, дезинтегрировали и центрифугировали при тех же условиях. Полученные СМЧ хранили при  $-20^\circ$ .

Для выделения АТразы СМЧ суспендировали в среде приведенного выше состава и озвучивали непрерывно в течение 25 мин без охлаждения с последующим центрифугированием при 200000g в течение 30 мин. Первичный супернатант, обладающий АТразной активностью, использовали для очистки фермента.

*Очистку* АТразы начинали кислотной преципитацией [10]: pH исследуемого раствора доводили до 5,4 1 N  $CH_3COOH$ , затем его центрифугировали при 18000g, pH полученного супернатанта быстро доводили до 7,2—7,4. Высаливание проводили добавлением к раствору фермента кристаллического  $(NH_4)_2SO_4$  до конечной концентрации 50% насыщения. Раствор выдерживали при температуре  $4^\circ$  в течение 30—40 мин и центрифугировали 10 мин при 10000g. Термообработку осадка проводили по Racker [10], его растворяли в среде, содержащей 0,25 М сахарозы, 30 мМ АТР, 1 мМ ЭДТА, 10 мМ трис-HCl (pH 7,5) и выдерживали на водяной бане при  $64^\circ$  в течение 4 мин. Раствор охлаждали при комнатной температуре до  $37^\circ$  и центрифугировали при 18000g в течение 10 мин. К супернатанту добавляли порошок сульфата аммония до конечной концентрации 50% насыщения. Полученный препарат хранили при  $4^\circ$ .

Гомогенность растворимой  $H^+$ -АТразы контролировали методом электрофореза в 5%-ном ПААГ. Гель готовили на трис-HCl буфере (pH 7,5). Электродным буфером служил раствор трис-диэтилбарбитуровой кислоты [14]. Гели фиксировали 10%-ной ТХУ и окрашивали 0,25%-ным Кумасси R-250. Идентификацию белка, обладающего АТразной активностью, проводили непосредственно в геле [9].

АТразную активность регистрировали pH-метрическим методом [15]. Скорость реакции выражали в мкмоль  $P_i$ /мин, У.А. в мкмоль  $P_i$ /мин/мг белка. Для определения активности использовали инкубационную среду, содержащую 2 мМ АТР,

2 мМ  $MgSO_4$ , 3 мМ трис- $HCl$  (рН 8,3). В пробу конечным объемом 5 мл вносили 10—15 мкг белка, реакцию регистрировали в течение 1—2 мин. Величину  $K_m$  определяли в координатах Лайнуивера-Бэрка. Белок определяли по методу Lowry и соавт. [16].

## Результаты и обсуждение

Для выделения АТРазы митохондриальную фракцию освобождали от миелина и синапсом, что обеспечивало уменьшение количества белковых примесей в первичном супернатанте, упрощало очистку и повышало выход ферментного препарата. Для частичного разрушения белок-липидных связей в мембранах митохондрий СМЧ обрабатывали хлороформом.

Для выделения фактора  $F_1$  применяли 3-кратное воздействие ультразвуком: дважды с короткой экспозицией озвучивания—для получения инвертированных мембранных пузырьков [9], которые затем подвергали продолжительному непрерывному воздействию ультразвуком. Применение указанных в работе Щипакина и соавт. [9] параметров ультразвуковой обработки не приводило к выделению АТРазы, что, по-видимому, связано с физико-химическими особенностями мембран митохондрий мозга.

Очистка выделенной растворимой АТРазы включала следующие операции: кислотную преципитацию, высаливание и термообработку. Данные по эффективности очистки приведены в таблице.

Таблица

Этапы очистки растворимой митохондриальной Н-АТРазы

| Этапы очистки                                           | Общий белок, мг | АТРазная активность      |                                 | Выход, % | Степень очистки |
|---------------------------------------------------------|-----------------|--------------------------|---------------------------------|----------|-----------------|
|                                                         |                 | общая, мкмоль $P_i$ /мин | У.А. мкмоль $P_i$ /мин/мг белка |          |                 |
| Первичный супернатант (после осаждения СМЧ при 200000g) | 13,80           | 21,81                    | 1,58                            | 100      | 1,00            |
| Кислотная преципитация                                  | 9,30            | 16,28                    | 1,75                            | 74,64    | 1,1             |
| Высаливание (50% насыщения $(NH_4)_2SO_4$ )             | 1,97            | 9,61                     | 4,88                            | 44,06    | 3,1             |
| Тепловая обработка                                      | 1,47            | 18,75                    | 12,76                           | 85,97    | 8,1             |
| Конечный препарат                                       | 1,10            | 18,41                    | 16,74                           | 84,41    | 10,6            |

После кислотной преципитации и высаливания удалялась значительная часть белковых примесей. Применение тепловой обработки вызывало увеличение У.А. фермента в несколько раз, потери белка при этом были незначительны. Увеличение АТРазной активности после термообработки связывают с удалением белкового ингибитора АТРазы [8, 9].

Общая АТРазная активность, определяемая в конечном препарате АТРазы после всех этапов очистки, составила 84% от общей активности в первичном супернатанте. У.А. фермента при этом возрастала ~ в 11 раз. Достигнутая степень очистки белка была сравнима с таковой для препаратов АТРазы из других тканей [9, 10].

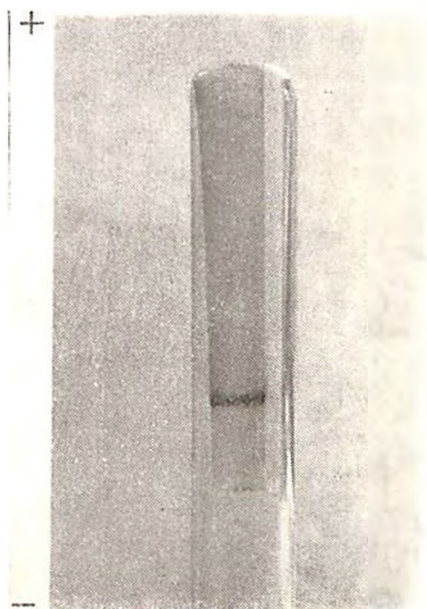


Рис. 1. Электрофореграмма растворимой  $H^+$ -АТФазы. На гель наносили  $\sim 100$  мкг белка, окрашивали Кумасси R-250.



Анализ чистоты полученного препарата показал, что очищенный фермент гомогенен: в геле обнаруживается единственная полоса (рис. 1). Одновременно проведенная энзиматическая идентификация выявила, что в этом же участке геля локализована АТРазная активность.

Проведенные исследования показали, что митохондриальная растворимая АТРаза мозга быка не чувствительна к олигомицину и ингибируется водорастворимым карбонимидом. У. А. фермента в разных опытах составляла 16—24 мкмоль  $P_i$ /мин/мг белка.

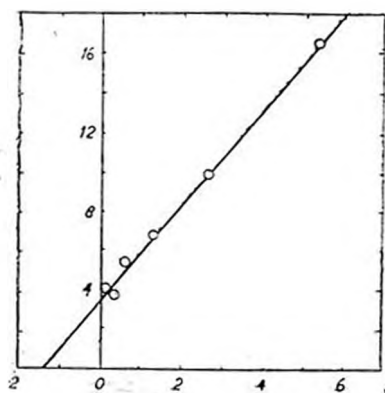


Рис. 2. Определение графическим способом величины  $K_m$  в координатах двойных обратных величин.

По оси абсцисс— $1/[S]$ ,  $\text{мМ}^{-1}$ , по оси ординат— $1/V$ , мкмоль  $P_i$ /мин.

Активность фермента в водной среде при комнатной температуре сохранялась в течение трех суток. В растворе  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (50% насыщения) активность фермента при температуре  $4^\circ$  сохранялась в течение нескольких месяцев.

Зависимость гидролиза АТФ от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера-Бэрка приведена на рис. 2. Величина  $K_m$ , определенная для  $\text{MgATP}$  в этих условиях, равна 0,69 мМ, что сопоставимо с данными, приведенными для фермента из других тканей [8, 17].

Предложенный способ выделения и очистки растворимой митохондриальной  $\text{H}^+$ -АТРаза мозга быка относительно несложен, стабилен и позволяет с высокой степенью надежности получать фермент из ткани мозга.

## PURIFICATION AND CHARACTERISTICS OF THE SOLUBLE BOVINE BRAIN MITOCHONDRIAL $\text{H}^+$ -ATPase

KHIVATOVA E. M., NOVIKOVA N. A., KORYAGIN A. S.

Biochemical Department, Medical School, Gorky

The soluble bovine brain mitochondrial  $\text{H}^+$ -ATPase has been extracted by ultrasonic desintegration of submitochondrial particles, pretreated with chloroform. The purification of enzyme was performed by acid precipitation, ammonium sulphate precipitation, thermal treatment and again ammonium sulphate precipitation. Electrophoresis in polyacrylamide gel proved homogeneity of the protein purified. Enzyme specific ac-

tivity is 16—24  $\mu\text{mole P}_i/\text{mg protein per minute}$ .  $K_m$  for Mg-ATP is 0,69 mM. In the ammonium sulphate solution (50% saturation) protein activity is stable for several months at  $+4^\circ$ . The soluble ATPase is not sensitive to oligomycin and is inhibited by water-soluble carbodiimide.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Прохорова М. И.—В кн.: Нейрохимия (под ред. М. И. Прохоровой), с. 30, Л., Изд-во ЛГУ, 1979.
2. Скулачев В. П., Козлов И. А. Протонные аденозинтрифосфатазы. Молекулярные биологические генераторы тока, М., Наука, 1977.
3. Knowles A. F., Penefsky H. S. J. Biol. Chem., v. 247, p. 6524—6630, 1972.
4. Catterall W. A., Pedersen P. L. J. Biol. Chem., v. 246, p. 4987—4991, 1971.
5. Ryrie I. Arch. Biochem. and Biophys., v. 184, p. 464—475, 1977.
6. Farron F. Biochemistry, v. 9, p. 3823—3828, 1970.
7. Muller H., Neufang H., Knobloch K. Eur. J. Biochem., v. 127, p. 559—566, 1982.
8. Акименко В. К., Минков И. Б., Бакеева Л. Е., Виноградов А. Д. Биохимия, т. 37, с. 348—359, 1972.
9. Шипакин В. Н., Азарашвили Т. С., Фролова Е. П., Евтодченко Ю. В.—В кн.: Биофизика живой клетки. Мембраны (под ред. Г. М. Франка), с. 12—24, Пушкино, 1974.
10. Horstman L. L., Racker E. J. Biol. Chem., v. 245, p. 1336—1341, 1970.
11. Beechly R. B., Hubbard S. A., Linnet P. E., Mitchell A. D., Mann E. A. Biochem., v. 148, p. 533—537, 1975.
12. Хватова Е. М., Новикова Н. А., Корягин А. С. Авт. свид. на изобр., № 1070479, кл. G 01 N 38/50, 1984.
13. Samogy G., Fonio A. Acta physiol. Acad. Sci. Hung., v. 21, № 4, p. 295—308, 1962.
14. Маурер Г. Диск-электрофорез. Теория и практика электрофореза в полиакриламидном геле, М., Мир, 1971.
15. Болдырев А. А., Лебедев А. В., Ритов В. Б. Вопр. мед. химии, т. 15, с.622—626, 1969.
16. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. K., Randall R. L. J. Biol. Chem. v. 193, p. 265—275, 1951.
17. Houstek J., Drahota Z. Biochim. et biophys. acta, v. 484, p. 127—139, 1977.

Поступила 28. IX 1984



УДК 612.831.001.6:616.45—001.1/3

## ВЛИЯНИЕ АГРЕССИВНОЙ РЕАКЦИИ НА ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЙ СПЕКТР КИСЛЫХ БЕЛКОВ РАЗЛИЧНЫХ СТРУКТУР ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

КАРКИЩЕНКО Н. Н., КУЛИКОВА О. Н., СТРАДОМСКИЙ Б. В.

Ростовский ордена Дружбы народов медицинский институт

Методом диск-электрофореза в 20%-ном ПААГ было проведено аналитическое разделение элюатов водорастворимых и тритон X-100 растворимых белков БТС-преальбуминовой фракции. Обнаружено, что в изученных структурах головного мозга количество зон водорастворимых белков БТС-преальбумина варьировало от 5 до 11. Наибольшей гетерогенностью крайне кислых белков отличался гипоталамус. Белковые зоны с электрофоретической подвижностью 0,50 и 0,56 с помощью поверхностной иммунопреципитации были идентифицированы как содержащие белок S-100.

Экстракция белков тритоном X-100 приводила к исчезновению белковых зон, расположенных в катодной части электрофоретического спектра.

Агрессивная реакция крыс сопровождалась значительным увеличением количества белка в зонах кислых белков исследованных структур головного мозга, включая содержащие белок S-100. В неокортексе и гиппокампе в катодной части электрофоретического спектра обнаружено появление дополнительной белковой зоны с  $R_m$  0,03, отсутствовавшей у контрольных животных (интактных и подвергнутых электрокожным раздражениям).

В последнее время появилось немало работ, посвященных изучению молекулярных механизмов эмоционального стресса. Такие исследования продиктованы необходимостью изыскания оптимальных средств лечения психических заболеваний [1—6].

Важнейшим звеном в процессах, обеспечивающих механизмы интегративной деятельности головного мозга, являются биологически активные низкомолекулярные белки. К подобным белкам относятся преальбумины мозга, в частности белок S-100, выполняющий важную функцию в реализации нервных процессов [7—10].

В связи с тем, что в настоящее время отсутствуют исследования, посвященные изучению участия биологически активных белков в механизмах развития эмоциональных стрессов, целью данной работы явилось исследование кислых низкомолекулярных белков различных структур головного мозга крыс при реакции агрессии—одной из форм эмоционального стресса.

## Материалы и методы

Опыты проводили на 100 нелинейных белых крысах-самцах массой 220—250 г. Основную контрольную группу составляли интактные животные, находящиеся в условиях вивария. В качестве модели агрессивного поведения использовали агрессию, вызываемую электрокожным раздражением [11, 12]. Для этого крыс помещали парами в специальную камеру с электродным полом. Животных в камере подвергали 6-кратной электростимуляции в течение 1 ч электрическими импульсами частотой 100 имп/сек, напряжением 15—20 В, силой тока 1.5—2.0 мА. По окончании электростимуляции крыс декапитировали и на холоду извлекали головной мозг.

Для контроля влияния самих электрокожных раздражений на белковый метаболизм при изучении агрессивного поведения была исследована группа крыс, каждую из которых отдельно помещали в камеру и подвергали электростимуляции при тех же параметрах, что и у пары животных при вызове агрессивного поведения.

У половины групп животных экстрагировали водорастворимые белки дистиллированной водой. У другой половины экстракцию проводили, используя 1%-ный раствор неионогенного детергента тритона X-100. Водорастворимые белки и белки, растворимые в тритоне X-100, экстрагировали из следующих структур головного мозга: неокортекса, гиппокампа, гипоталамуса, мозжечка, продолговатого и среднего мозга. Водорастворимые белки исследуемых структур контрольных и подопытных животных подвергали диск-электрофорезу в 7.5%-ном ПААГ в 1-ой щелочной системе [13]. Фракцию белков, движущуюся вместе с фронтом желтого пигмента, в области миграции свидетеля бромтимолового синего (БТС) к аноду— $R_m$  1.0—БТС-преальбумин—после проведения электрофореза вырезали из гелевых столбиков и элюировали в дистиллированной воде в течение 48 ч. Белки, экстрагированные 1%-ным раствором тритона X-100, разделяли с помощью диск-электрофореза в той же щелочной системе, что и водорастворимые белки, но для более надежного разделения белковых полос с добавлением в концентрирующую и разделяющую системы тритона X-100 до концентрации 0.1% [14]. Элюаты белков БТС-преальбумина вели в 1%-ном растворе тритона X-100 в течение 48 ч. Элюаты белков БТС-преальбумина каждого из отделов головного мозга разгоняли в 20%-ном ПААГ с pH 9.5. Для разделения детергент-растворимых белковых компонентов БТС-преальбумина в концентрирующую и разделяющую системы добавляли тритон X-100 до концентрации 0.1%. Одновременно проверяли гомогенность белка БТС-преальбумина путем повторного диск-электрофореза в 7.5%-ном ПААГ.

Идентификация белка S-100 в диск-электрофоретическом спектре водорастворимых белков и белков, растворимых в тритоне X-100, была проведена с помощью поверхностной иммуопреципитации. Для этого столбики геля погружали на 48 ч в антисыворотку к нейроспецифическому белку S-100. На поверхности геля через 48 ч наблюдали линии precipitation в местах локализации белка S-100.

Окрашенные гели сканировали на денситометре «Spesol» (ГДР). Денситограммы разбивали на области, соответствующие определенным белковым зонам и по площади пиков судили о количестве белка в этих зонах. Площадь пиков рассчитывали по формуле:  $J = k \cdot a \cdot c$ , где  $J$ —площадь пика,  $k$ —коэффициент гауссовской кривой 1,067,  $a$ —высота пика,  $c$ —ширина пика на половине его высоты.

Общее количество белка определяли как сумму площадей отдельных пиков. Результаты обрабатывали статистически с использованием критерия Стьюдента-Фишера.

## Результаты и обсуждение

БТС-преальбуминовая фракция, куда входят низкомолекулярные биологически активные белки [15, 16], отличается высокой гетерогенностью. При разделении водорастворимых кислых низкомолекулярных белков в 20%-ном ПААГ нами было обнаружено, что различные струк-



туры головного мозга крыс содержат свой, индивидуальный набор этих белков. Наибольшей гетерогенностью кислых белков отличался гипоталамус. У контрольных животных в гипоталамусе наблюдалось до 11 фракций, что, возможно, связано с нейрогуморальной функцией этой структуры головного мозга. В других исследованных отделах мозга контрольных животных количество белковых зон варьировало от 5 до 9.

Зона с  $R_m$  0,56 в неокортексе, продолговатом мозгу, мозжечке, среднем мозгу и гипоталамусе, а также зона с  $R_m$  0,45 в мозжечке были представлены двойными полосами. У интактных животных зоны с  $R_m$  0,75, 0,50 и 0,20 присутствовали во всех исследованных отделах мозга, а белковая зона с  $R_m$  1,0—в следовых количествах. Белки, входящие в зону, расположенную сразу же за свидетелем, в наших экспериментах могли менять свою электрофоретическую подвижность в пределах от 0,73 до 0,80. Белковые зоны с электрофоретической подвижностью 0,50 и 0,56 с помощью поверхностной иммуопреципитации были идентифицированы как содержащие белок S-100. Белковые зоны с  $R_m$  0,41 присутствовали в неокортексе, среднем мозгу и гипоталамусе. Зона с  $R_m$  0,23 встречалась только в неокортексе и гипоталамусе, а белковые зоны с  $R_m$  0,27 и 0,10 обнаружены в мозжечке и гипоталамусе. Далее было отмечено, что в среднем мозгу и гипоталамусе контрольных животных отсутствовала зона с  $R_m$  0,45, в гиппокампе—белковые зоны с  $R_m$  0,45 и 0,03, а в неокортексе—зона с  $R_m$  0,03.

Реакция агрессии сопровождалась резкими количественными изменениями во фракциях кислых низкомолекулярных белков (табл. 1). В неокортексе наблюдали увеличение количества белка в зонах с  $R_m$  0,23 и 0,20 на 104 и 937% соответственно по сравнению с контролем. Повышение количества белка в зонах, расположенных в катодной части спектра отмечено также в гиппокампе и гипоталамусе. Так, в гиппокампе увеличение количества белка было характерно для зоны с  $R_m$  0,20 на 141%, а в гипоталамусе—для зон с  $R_m$  0,23, 0,10 и 0,03, в которых прирост белка по сравнению с контрольными величинами достигал 28—81%. В этих структурах головного мозга мы наблюдали также возрастание количества суммарных кислых белков, входящих в 20%-ный ПААГ, на 13—41%, следовательно, неокортекс, гиппокамп и гипоталамус характеризуются однонаправленным типом реагирования на реакцию агрессии. Однако для неокортекса характерен и специфический ответ на агрессию, что выражается в уменьшении количества белка в зонах с  $R_m$  0,54—0,56 и 0,45 на 26 и 21% соответственно по сравнению с контролем. В отличие от высших структур головного мозга в мозжечке агрессивная реакция вела к снижению количества белка в зонах, расположенных в катодной части электрофоретического спектра, на 36—52% по сравнению с контрольными величинами.

Были установлены не только количественные, но и качественные изменения во фракциях крайне кислых белков при агрессии. В неокортексе и гиппокампе в катодной части электрофоретического спектра

Таблица 1.

Содержание водорастворимых крайне кислых белков головного мозга крыс в зонах  
20%-ного ПААГ

| Структура          |          | 0,75   | 0,56   | 0,50   | 0,45   | 0,41     | 0,35   | 0,29   | 0,23     | 0,20     | 0,17   | 0,10    | 0,03    | общая площадь денситограммы |
|--------------------|----------|--------|--------|--------|--------|----------|--------|--------|----------|----------|--------|---------|---------|-----------------------------|
| Неокортекс         | контроль | 80±6   | 111±2  | 378±10 | 86±6   | 69±7     | 72±10  | —      | 25±5     | 8±1      | —      | —       | —       | 829±28                      |
|                    | опыт     | 79±12  | 83±8** | 322±18 | 68±4** | 67±3     | 80±9   | —      | 51±3**   | 83±4**   | —      | —       | 102±5   | 933±47**                    |
| Гиппокамп          | контроль | 49±11  | 55±6   | 300±20 | 88±6   | —        | —      | —      | —        | 41±2     | —      | —       | —       | 499±48                      |
|                    | опыт     | 42±2   | 51±5   | 300±9  | 83±5   | —        | —      | —      | —        | 106±14** | —      | —       | —       | 705±34**                    |
| Гипоталамус        | контроль | 80±2   | 249±22 | 391±23 | —      | 170±16   | 153±10 | 179±12 | 57±2     | 270±28   | 121±11 | 144±13  | 120±10  | 1999±91                     |
|                    | опыт     | 69±7   | 230±20 | 405±17 | 175±9  | —        | 168±14 | 197±19 | 103±13** | 311±20   | 94±12  | 185±17* | 213±8   | 2265±44*                    |
| Средний мозг       | контроль | 48±6   | 84±10  | 398±17 | —      | 99±7     | 141±7  | —      | —        | 117±1    | —      | —       | 145±12  | 1036±39                     |
|                    | опыт     | 38±8   | 86±7   | 415±25 | —      | 138±12** | 140±25 | —      | —        | 97±19    | —      | —       | 148±20  | 1060±88                     |
| Продолговатый мозг | контроль | 117±15 | 115±14 | 330±20 | 124±11 | —        | 128±14 | —      | —        | 121±12   | —      | —       | 39±5    | 974±74                      |
|                    | опыт     | 123±24 | 106±7  | 319±17 | 119±11 | —        | 128±13 | —      | —        | 103±16   | —      | —       | 34±4    | 906±67                      |
| Мозжечок           | контроль | 76±10  | 136±12 | 397±23 | 128±14 | —        | 108±10 | —      | —        | 179±16   | 92±13  | 111±11  | 138±7   | 1362±93                     |
|                    | опыт     | 86±15  | 146±4  | 415±10 | 143±6  | —        | 120±12 | —      | —        | 86±8**   | 81±7   | 73±1**  | 80±10** | 1230±40                     |

Примечание. \*0,1 > p > 0,05 \*\*p < 0,05

обнаружено появление дополнительной белковой зоны с  $R_m$  0,03, отсутствовавшей у контрольных животных, а также у одиночных животных (без партнера), подвергнутых электростимуляции. При агрессивной реакции в гипоталамусе белки, находившиеся в зоне с  $R_m$  0,41, изменяли свою подвижность в электрическом поле.  $R_m$  этих белков становилась равной 0,45.

Было показано, что экстракция белков с помощью 1%-ного раствора тритона X-100 приводила к исчезновению белковых зон, расположенных в катодной части электрофоретического белкового спектра. Основываясь на том, что обработка тритоном X-100 снижает электрофоретическую подвижность большинства белков за счет связывания белками достаточно большого количества молекул тритона X-100, нами были проведены дополнительные исследования, которые показали, что, действительно, белки, медленно мигрировавшие в 20%-ном ПААГ и располагавшиеся в катодной части спектра, выходили при обработке тритоном X-100 из состава зоны БТС-преальбумина. В 7,5%-ном ПААГ они мигрировали с  $R_m$  0,97—0,98 вместо 1,0. Однако не исключено, что обработка белков детергентом может вызывать и диссоциацию белковых комплексов. Обработка тритоном X-100 вела не только к исчезновению медленно мигрировавших белков, но и к сильному снижению количества быстро передвигающихся белков зоны с  $R_m$  0,75.

Мы установили, что средний и продолговатый мозг содержат 7 белковых зон, растворимых в тритоне X-100 кислых низкомолекулярных белков, неокортекс и мозжечок—6 зон, гипоталамус—5, а гиппокамп—4 белковые зоны. Во всех отделах мозга зона с  $R_m$  0,45 и зона с  $R_m$  0,56, за исключением гиппокампа, были представлены в виде двойных полос. Белок в зоне с  $R$  1,0 был обнаружен в следовых количествах в исследуемых структурах головного мозга.

Экстракция белков тритоном X-100 приводила к появлению белковых зон крайне кислых белков, отсутствовавших в диск-электрофоретическом спектре водорастворимых белков. Так, в продолговатом мозгу выявились зоны с  $R_m$  0,67 и 0,41, в мозжечке—зона с  $R_m$  0,41, а в среднем мозгу—белковая зона с электрофоретической подвижностью 0,67.

При реакции агрессии мы наблюдали увеличение количества белка как в отдельных белковых зонах кислых низкомолекулярных белков, так и общего их количества, экстрагированного детергентом из исследованных отделов мозга и входившего в 20%-ный ПААГ (табл. 2), по сравнению с контролем. В неокортексе и гипоталамусе увеличение уровня белка отмечено для зоны с  $R_m$  0,50 до 57%, в мозжечке—в зонах с  $R_m$  0,41, 0,56 и 0,75 на 23,15 и 20% соответственно, в гиппокампе—в белковой зоне с  $R_m$  0,56 на 58%. В продолговатом мозгу наблюдали уменьшение количества общего белка, входившего в 20%-ный ПААГ, а также в зонах с  $R_m$  0,75 и 0,56 на 27—46%. В среднем мозгу отличий от контрольных значений не обнаружено.

Таким образом, наши исследования показали, что агрессивная реакция у крыс приводила к стойким как количественным, так и качест-

Таблица 2

Содержание растворимых в тритоне X-100 крайне кислых белков головного мозга крыс в зонах 20%-ного ПААГ

| Структура          |          | 0,75   | 0,67 | 0,56     | 0,50     | 0,45   | 0,41   | 0,35  | Общая площадь денситограммы |
|--------------------|----------|--------|------|----------|----------|--------|--------|-------|-----------------------------|
| Неокортекс         | контроль | 53±5   | —    | 70±1     | 448±11   | 113±3  | 91±5   | 82±4  | 857±27                      |
|                    | опыт     | 54±5   | —    | 63±5     | 703±17** | 110±3  | 80±9   | 64±9  | 1073±23**                   |
| Гиппокамп          | контроль | след   | —    | 114±6    | 645±32   | 148±6  | —      | —     | 907±7                       |
|                    | опыт     | след   | —    | 171±19** | 700±38   | 180±14 | —      | —     | 1055±65*                    |
| Гипоталамус        | контроль | след   | —    | 45±3     | 475±5    | —      | 48±5   | 42±4  | 510±18                      |
|                    | опыт     | след   | —    | 56±7     | 519±21*  | —      | 63±5   | 48±3  | 686±21**                    |
| Средний мозг       | контроль | 53±1   | 36±4 | 150±10   | 588±12   | 136±4  | 88±4   | 61±1  | 1112±26                     |
|                    | опыт     | 49±8   | 42±3 | 122±10   | 589±32   | 149±10 | 112±10 | 74±7  | 1137±38                     |
| Продолговатый мозг | контроль | 110±17 | 73±8 | 254±23   | 621±23   | 140±6  | 79±2   | 93±5  | 1370±31                     |
|                    | опыт     | 60±4** | 62±5 | 185±11** | 633±32   | 134±8  | 88±9   | 89±10 | 1251±61*                    |
| Мозжечок           | контроль | 56±6   | —    | 103±10   | 486±35   | 92±7   | 77±10  | 47±7  | 861±51                      |
|                    | опыт     | 71±3*  | —    | 105±12   | 573±17*  | 104±10 | 99±3   | 57±6  | 1069±18**                   |

Примечание. \*  $0.1 > p > 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.05$



венным изменениям во фракциях крайне кислых низкомолекулярных белков. В исследованных отделах головного мозга подопытных животных эти изменения носили разнонаправленный характер, что вероятней всего определяется функциональными особенностями соответствующих структур. При развитии агрессивной реакции следует отводить особую роль коре больших полушарий головного мозга, где обнаружено появление дополнительной белковой зоны. Уменьшение, а также исчезновение ряда белковых зон мы связываем как с выходом белков из ткани мозга в ликвор, так и с усилением протеолиза белков и образованием олигопептидных компонентов. Не исключено, однако, что уменьшение количества белков водорастворимой фракции при агрессивной реакции является следствием увеличения связывания их с мембранами нервной ткани. Так, если количество водорастворимых кислых белков в мозжечке при агрессии незначительно уменьшалось, то воздействие детергента тритона X-100 на клеточные мембраны ткани этой структуры приводило к статистически достоверному увеличению количества белка при агрессии.

Тем не менее, основным ответом крайне кислых белков на реакцию агрессии явилось повышение их количества в исследованных структурах головного мозга. Мы предполагаем, что этот процесс происходил за счет увеличения солюбилизации кислых белков и отщепления их от мембран. Особое внимание привлекает увеличение количества белка в зонах, содержавших белок S-100 ( $R_m$  0,56 и 0,50), функция которого тесно связана с регуляцией проницаемости мембран для ионов [7, 9].

## AGGRESSIVE REACTION EFFECT ON THE ELECTROPHORETIC PATTERN OF ACIDIC PROTEINS IN RAT BRAIN DIFFERENT STRUCTURES

KARKISHENKO N. N., KULIKOVA O. N., STRADOMSKY B. V.

Medical School, Rostov-on-Don

Analytical separation of eluates of water-soluble and Triton X-100-soluble proteins of BTB-prealbuminous fraction was carried out using electrophoresis in 20% PAG.

It was found that in rat brain structures studied the quantity of water-soluble BTB-prealbumin protein zones varied from 5 to 11. Hypothalamus showed the most evident heterogeneity of extremely acidic proteins. Using surface immunoprecipitation technique the protein zones with electrophoretic mobility 0,50—0,56 were identified as the ones containing S-100 protein. Extraction of proteins with Triton X-100 resulted in disappearance of protein zones in the catode part of electrophoretic spectrum.

The aggressive reaction in rats was followed by considerable increase in acidic protein zones including those containing S-100. An additional protein zone with  $R_m$  0,03 absent in control animals appeared in neocortex and hippocampus in the catode part of electrophoretic spectrum.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Налбандян Р. М.—В сб.: Вопросы биохимии мозга, т. 7, с. 221—232, Ереван, 1972.
2. Анохина И. П. Нейрохимические механизмы психических заболеваний, М., Медицина, 1975.
3. Матлина Э. Ш., Бару А. М., Васильев В. Н.—В кн.: Физиология человека и животных. Физиология эмоций, с. 31—93, М., Наука, 15, 1975.
4. Демин Н. Н.—В кн.: Проблемы ВНД и нейрофизиологии, с. 176—186, Л., Наука, 1975.
5. Каркищенко Н. Н.—В кн.: Катехоламинергические нейроны, с. 75—85, М., Наука, 1979.
6. Зиле Р. К., Клишн В. Е. Проблемы эндокринологии, т. 25, № 6, с. 73—79, 1979.
7. Hyden H. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 71, p. 2965—2968, 1974.
8. Mahalik S. P., Korenovsky A., Rapport M. M., J. Neurochem., v. 33, p. 751—762, 1979.
9. Старостина М. В., Свиридов С. М. Молекулярная биология, т. 12, с. 372—376, 1978.
10. Долгов О. Н., Полетаев А. Б., Шерстнев В. В. Успехи физиол. наук, т. 11, № 3, с. 47—63, 1980.
11. O'Kelly L. E., Steckle L. C. J. Psychobiology, v. 8, p. 125—131, 1939.
12. Ulrich R., Wolff P., Azrin N. Anim. Behav., v. 12, p. 14—15, 1964.
13. Маурер Г. Диск-электрофорез, М., Мир, 1971.
14. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. М., Наука, 1981.
15. Синишкин А. А., Прокофьев В. Н., Шерстнев К. Б., Кучеренко Н. А. Укр. біохім. журн., т. 50, № 4, с. 429—431, 1978.
16. Синишкин А. А. Укр. біохім. журн., т. 53, № 3, с. 113—122, 1981.

Поступила 1. IV 1984



УДК 577.12:591.4.05

## ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА ГЛИКОГЕНА В ГОЛОВНОМ МОЗГУ ПРИ ДЕЙСТВИИ ИПРАЗИДА И ТУБАЗИДА; НОВЫЙ АСПЕКТ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ В КЛИНИКЕ

СУДЖЯН Ц. М.

Государственный медицинский институт, Ереван

Установлено, что при внутрибрюшинном введении белым крысам производных гидразина—ингибиторов МАО (ипразида и др.) и тубазида (метаболита ипразида) наблюдается увеличение активности I- и D-форм гликогенсинтазы в различных субклеточных фракциях мозга. Под влиянием ипразида в мозгу повышается также количество гликогена, сопровождающееся снижением содержания глюкозы. Между тем введение негидразинового ингибитора МАО—трансамина не изменяло активности фермента и содержания гликогена и глюкозы. Рекомендовано применение производных гидразина, в частности ипразида или тубазида, при сочетании депрессивных состояний или туберкулеза с диабетом.

Головной мозг характеризуется чрезвычайно высокой интенсивностью течения физиологических процессов и метаболизма при сравнительно ограниченной собственных источников энергии и, следовательно, зависимостью от поступления энергетических ресурсов извне, а также высокой чувствительностью нервной ткани к дефициту кислорода. Поэтому изучение особенностей метаболизма гликогена в мозгу привлекает большое внимание. Следует заметить, что в тканях мозга выявлена взаимосвязь превращений углеводов с метаболизмом многих аминов [1]. Ингибиторы МАО, подавляя окислительное дезаминирование, способствуют их накоплению в организме, причем преимущественно в мозгу [2]. В то же время применение ингибиторов МАО как факторов, необходимых для изучения молекулярных механизмов переключения метаболических путей и биосинтетических реакций в мозгу, оправдано также их использованием в психиатрии в качестве антидепрессантов.

В настоящей работе представлены данные по изучению особенностей метаболизма гликогена в головном мозгу при действии психотропных веществ—ипразида (1-изоникотиноил-2-изопропилгидразина) и трансамина (транс-2-фенилциклопропиламина) из группы ингибиторов МАО, а также применяемого при лечении туберкулеза одного из продуктов метаболизма ипразида в организме—тубазида (1-изоникотиноилгидразин), не являющегося ингибитором МАО.



Исследования проводили на белых крысах-самцах. Ипразид, трансамин и тубазид вводили в физиологическом растворе внутривенно. Через 16 ч после введения ипразида в дозе 10 мг/100 г массы животного и через 4 ч после введения трансамина (1 мг/100 г) крыс фиксировали замораживанием. Тубазид вводили за 10 и 16 ч до замораживания животных в дозах, эквивалентных дозам ипразида. В опытах *in vitro* изучаемые вещества вносили в среды в концентрациях, рассчитанных на массу ткани, в соответствии с опытами *in vivo*. Определение содержания гликогена проводили методом Kegg [3] в модификации LeBaton [4]. Содержание глюкозы определяли по методу Somogyi в видоизменении Nelson [5]. Выделение гликогенсинтазы (ГС) (UDP-глюкоза: гликоген 4- $\alpha$ -глюкозилтрансфераза; КФ 2.4.1.11) из субклеточных фракций мозга и определение ее активности проводили методами Leloir-Goldemberg [6] и Villar-Palasi, Rosell-Perez [7]. Пируваткиназу (КФ 2.7.1.40), используемую при определении активности ГС, выделяли из мышц кролика и очищали методом Leloir, Goldemberg [6]. Общую активность ГС определяли в присутствии глюкозо-6-фосфата, а ее I-формы — без него. По разности общей активности и I-формы судили об активности D-формы фермента. Содержание белка определяли по Lowry и соавт. [8].

### Результаты и обсуждение

Результаты проведенных исследований показали (табл. 1), что введение гидразинового ингибитора МАО—ипразида приводило к увеличению активности ГС, ее I-формы во фракции ткани мозга, выделенной при 41000g (промытый осадок), повышению содержания гликогена и понижению содержания глюкозы, между тем негидразиновый ингибитор МАО—трансамин не оказывал заметного влияния на ак-

Таблица 1

Активность I- и D-форм гликогенсинтазы (ГС) во фракции, выделенной из ткани мозга при 41000g, и содержание гликогена и глюкозы при введении ипразида и трансамина

| Условия опыта | Активность ГС, нмоль UDP/мг белка/мин |                     | Актив-ность I-формы, % от об-щей | Содержание                |                      |
|---------------|---------------------------------------|---------------------|----------------------------------|---------------------------|----------------------|
|               | I+D-формы                             | I-форма             |                                  | гликогена                 | глюкозы              |
|               |                                       |                     |                                  | (мкмоль глюкозы /г ткани) |                      |
| Контроль      | 35,62±0,38<br>(10)                    | 3,06±0,11<br>(10)   | 8,5                              | 3,73±0,05<br>(15)         | 1,320±0,024<br>(15)  |
| Ипразид       | 39,05±0,61***<br>(10)                 | 3,74±0,11**<br>(10) | 9,5                              | 4,25±0,08***<br>(11)      | 1,140±0,041*<br>(15) |
| Трансамин     | 34,98±0,38*<br>(10)                   | 2,95±0,11*<br>(10)  | 8,3                              | 3,89±0,06*<br>(8)         | 1,29±0,08*<br>(12)   |

Примечание. В табл. 1—2 в скобках—число опытов. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

тивность ГС и на содержание гликогена и глюкозы в мозгу. После введения ипразида активность ГС увеличивалась также и во фракции мозга, выделенной при 2000g (надосадочный слой гомогената) и 25000g (промытый осадок) ( $p < 0,01$ ), а после введения трансамина не изменялась.

Полученные результаты позволили сделать заключение о том, что именно ипразид оказывал влияние на биосинтез гликогена, ибо транс-



амин, являющийся также ингибитором МАО, но не производным гидразина, оказался неактивным. С целью проверки выдвинутого суждения изучали влияние возможных продуктов превращения ипразида на активность ГС, ее I- и D-форм. Ипразид в организме распадается гидролитическим путем или посредством окисления [9]. Показано [10], что продукты гидролитического распада ипразида в мозгу кролика не изменяли содержания гликогена. В связи с этим можно допустить, что в мозгу не происходит расщепления ипразида гидролитическим путем. Одним из продуктов окисления ипразида является тубазид [11]. При его введении в наших опытах в количествах, эквимолярных ипразиду, за 16 ч до начала опыта при отсутствии сдвигов в общей активности ГС имело место некоторое увеличение активности ее I-формы ( $p < 0,05$ ). Нельзя исключить возможность, что тубазид может действовать быстрее ипразида, поэтому в дальнейшем его вводили за 10 ч до начала опыта и обнаружили значительное увеличение активности обеих форм ГС ( $p < 0,01$ ). Можно допустить, что в организме крыс превращение ипразида в тубазид происходит в течение примерно 6 ч, и действие ипразида на биосинтез гликогена в мозгу опосредовано через образование тубазида.

Для решения этого вопроса были поставлены опыты *in vitro*. Они показали (табл. 2), что в присутствии ипразида при 30-минутной ин-

Таблица 2

Активность гликогенсинтазы (нмоль UDP/мг белка) во фракции, выделенной из ткани мозга при 25000g, под влиянием ипразида и тубазида в опытах *in vitro*

| Условия опыта | Время инкубации, мин |                      |                      |
|---------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|               | 10                   | 20                   | 30                   |
| Контроль      | 230,0±8,7<br>(10)    | 480,0±15,0<br>(12)   | 735,0±48,0<br>(12)   |
| Ипразид       | 100,6±2,7***<br>(15) | 340,0±9,5***<br>(14) | 545,0±11,0**<br>(15) |
| Тубазид       | 283,3±6,3***<br>(14) | 460,0±13,0*<br>(15)  | 630,0±27,0*<br>(15)  |

кубации во фракции мозга, выделенной при 25000g, активность ГС уменьшалась; наличие же в среде тубазида приводило к значительной активации фермента уже при 10-минутной инкубации. При изучении влияния тех же веществ на активность обеих форм ГС во фракции мозга, выделенной при 41000g, оказалось, что после 15-минутной инкубации с ипразидом было отмечено уменьшение общей активности фермента ( $p < 0,01$ ) при отсутствии изменений со стороны ее I-формы ( $p > 0,5$ ), то есть влияние ипразида в условиях *in vitro* оказалось противоположным его эффекту в опытах *in vivo*. При инкубировании с тубазидом на протяжении 30 мин активность I- и D-форм ГС во фракции мозга, выделенной при 41000g, увеличивалась.

Таким образом, один из продуктов метаболизма ипразида в организме—тубазид, не являющийся ингибитором МАО, в эквимолярных

ипразиду количества вызывал заметное повышение активности ГС, ее I- и D-форм. Исходя из того, что тубазид оказывал активизирующее действие на биосинтез гликогена мозга при введении его в организм через 10 ч, то есть на 6 ч раньше, чем после введения ипразида (через 16 ч), и, имея в виду, что в опытах *in vitro* увеличение общей активности ГС, ее I- и D-форм происходило только под влиянием тубазид, можно заключить, что специфическое действие на биосинтез гликогена мозга самого ипразида, расщепляющегося с образованием тубазид, в действительности, осуществляется лишь последним.

Повышение в мозгу содержания гликогена под влиянием ипразида (тубазид) в сочетании с понижением в нем количества глюкозы в результате увеличения активности ГС и ее I-формы позволили нам выдвинуть предположение о возможной индукции биосинтеза гликогена в мозгу ипразидом (тубазидом), подобно действию инсулина. В ряде исследований [12, 13] получены данные о стимулирующем действии инсулина на синтез гликогена также и в головном мозгу. Сравнительно недавно выявлено [14], что концентрация инсулина в мозгу крыс превосходит его содержание в крови примерно в 25 раз. О физиологической роли инсулина в ЦНС свидетельствует наличие рецепторов этого гормона в нервной ткани. Gagliardino и соавт. [15] выявили потенцирование инсулином стимулирующего влияния иналамида (ингибитор МАО, так же, как и ипразид, относящийся к числу производных гидразина) на активность ГС печени крыс. Литературные данные [11] свидетельствуют об однотипности метаболизма ипразида в организме крыс и человека.

Все изложенное позволяет нам рекомендовать применение ипразида и лекарственных средств подобного действия, являющихся производными гидразина (иналамида и др.), при сочетании депрессивных состояний с диабетоподобными расстройствами. Ввиду выявления аналогичного влияния тубазид на биосинтез гликогена нами было предложено применение этого средства при сочетании туберкулеза с диабетом.

Применение производных гидразина, в частности ипразида и тубазид, при сочетании депрессии или туберкулеза с диабетом и диабетоподобными расстройствами в ряде лечебных учреждений Москвы и Еревана (Клиника нервных болезней I ММИ, Психоневрологический диспансер № 11 г. Москвы, Республиканская клиническая туберкулезная больница МЗ АрмССР и др.) позволило установить высокую эффективность предложенного способа лечения.

# PECULIARITIES OF BRAIN GLYCOGEN METABOLISM UNDER THE ACTION OF IPRONIAZID AND TUBAZID. THE NEW ASPECT OF CLINICAL APPLICATION OF THESE HYDRAZINE DERIVATIVES

SUDJIAN Ts. M.

State Medical School, Yerevan

Peculiarities of brain glycogen metabolism under the action of hydrazine derivatives—MAO inhibitors and tubazid (iproniazid metabolite) have been studied. The activity of I- and D-forms of glycogen synthase (GS) in brain subcellular fractions increased under these conditions. Transamine—MAO non-hydrazine inhibitor does not affect the activity of I and D-forms of GS. The content of glycogen increased and glucose reduced in the brain under the effect of iproniazid. The use of hydrazine derivatives is recommended at combination of depressive states with diabetes, in particular the use of iprazide or tubazid is recommended at the combination of tuberculosis with diabetes.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Mrsulja, Ražic L. M. J. Neurochem., v. 17, p. 821—822, 1970.
2. Neff N. H., Costa E. J. J. Pharmacol. and Exp. Ther., v. 160, p. 40—47, 1933.
3. Kerr S. E. J. Biol. Chem., v. 116, p. 1—7, 1936.
4. LeBaron F. N. Biochem. J., v. 61, p. 80—85, 1955.
5. Nelson N. J. Biol. Chem., v. 153, p. 375—380, 1944.
6. Leloir L. F., Goldemberg S. H.—In: Methods in Enzymology, v. 5, p. 145—147, N. Y.—L., Acad. Press, 1962.
7. Villar-Paas C., Rosell-Perez M.—In: Methods in Enzymology, v. 8, p. 382—384 N. Y.—L., Acad. Press, 1966.
8. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., v. 193 p. 265—275, 1951.
9. Hsu K.—Y., Noda A., Iguchi S. J. Pharm. Dyn., v. 3, p. 620—627, 1980.
10. Мусяковская А. А. Автореф. канд. дис., Киев, 1968.
11. Koechlin B., Iliev V. Annals N. Y. Acad. Sci., v. 8, p. 864—872, 1959.
12. Prasanna K. G., Subrahmanyam K. Endocrinology, v. 8, № 2, p. 1—6, 1968.
13. Schudt C. Fur. J. Biochem., v. 97, № 1, p. 155—160, 1979.
14. Havrankova J., Schmechel D., Roht J., Brownstein M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 75, p. 5737—5741, 1978.
15. Gagliardino J. J., Hernandez R. E., Rodriguez R. R., Lauri H. Amer. J. Physiol., v. 219, p. 314—317, 1970.

Поступила 16. III 1984



## КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 612.82.015.348.017—08

## МЕТОД ОТДЕЛЕНИЯ ПОДИРОВАННЫХ ОПИОИДНЫХ ПЕПТИДОВ ОТ ИХ НЕМЕЧЕННЫХ ФОРМ С ПОМОЩЬЮ ИОНООБМЕННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

ДМИТРИЕВ А. Д., ТЕННОВ А. В., \*ГОЛИКОВА Ю. И., \*КНЗНИМ Е. А.,  
\*КОБЫЛЯНСКИЙ А. Г., \*САМОВИЛОВА Н. Н.

Институт клинической психиатрии Всесоюзного научного центра психического здоровья АМН СССР, \*Центральная научно-исследовательская лаборатория IV Главного управления МЗ СССР, Москва.

В связи с актуальностью изучения распределения и содержания в организме опиоидных пептидов и их рецепторов весьма важной представляется дальнейшая разработка методов получения опиоидных  $^{125}\text{I}$ -пептидов, пригодных для использования в качестве меченых лигандов в радиоиммунологических и радиорецепторных исследованиях.

При йодировании пептидов, в состав которых входит остаток тирозина, йод может замещать водород в орто-положениях по отношению к гидроксильной группе ароматического кольца тирозина, при этом образуются моно- и диiodформы олигопептидов [1]. Для биологических исследований особое значение имеет получение моноiodформ пептидов, поскольку диiodформы обладают меньшей иммунореактивностью [2], более слабой биологической активностью [3] и в некоторых случаях практически не связываются со специфическими мембранными рецепторами [3, 4]. При получении же моноiodформ посредством йодирования с большим по отношению к йоду молярным избытком пептида [5] его У. А. оказывается невысокой. В связи с этим особый интерес представляют методы отделения йодированных пептидов от их немеченных форм, для чего используются различные подходы. В частности, для получения моноiodформы D-Ala<sup>2</sup>, D-Leu<sup>5</sup>-энкефалина (DADL) используют две последовательные хроматографии—на бюбеле Р-2 и на ДЭАЭ-сефадексе [4].

В настоящей работе предлагается метод выделения моноiodформ олигопептидов, имеющих свободные аминогруппы или остатки аргинина, сущность которого состоит в применении NOX на SP-сефадексе в градиенте концентрации ацетат-аммонийного буфера, выбранного в связи с возможностью его полной лиофилизации. Значения pH, при



которых проводили хроматографию, подбирали таким образом, чтобы при элюции градиентом 0,05 М—0,5 М  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  достигалось разделение свободного  $^{125}\text{I}$ , немеченого пептида, а также моно- и дийодформ  $^{125}\text{I}$ -пептида.

Все исследованные пептиды—Leu-, Met-энкефалины,  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -эндорфины\* и DADL («Serva») —йодировали хлораминовым методом [1]. Йодирование останавливали, добавляя к инкубационной смеси 1 мл 0,05 М  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ , pH 3,5, содержащего 5% 2-меркаптоэтанола. Про-

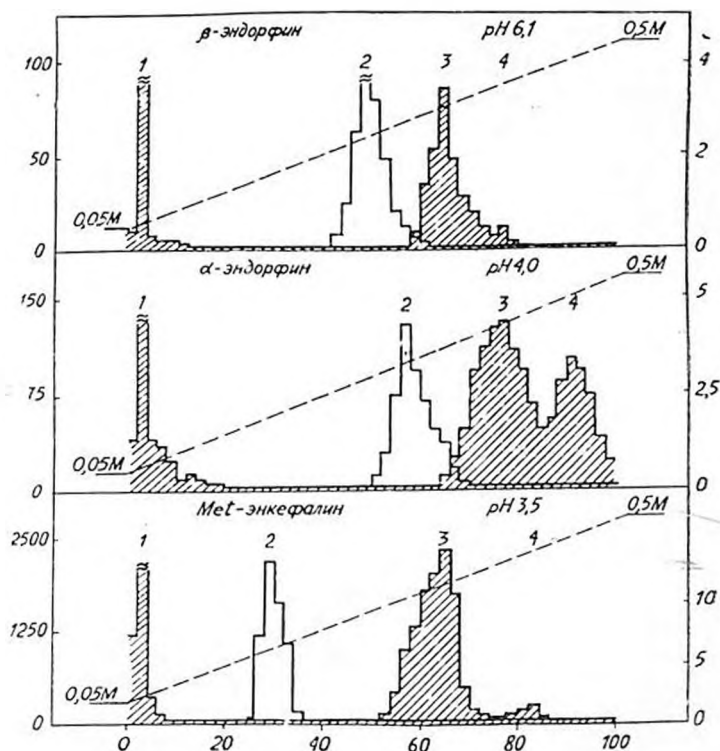


Рис. 1. Хроматография инкубационной смеси (после йодирования пептидов) на колонке с SP-сефадексом C-25 (1,2×5 см). Элюцию проводили градиентом концентрации 0,05 М—0,5 М  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  со скоростью 10 мл/ч (— — —). Объем фракции—2 мл. В отдельных опытах через колонку в тех же условиях пропускали немеченные опиоидные пептиды (□) и определяли их концентрации во фракциях радиоиммунологическим методом, [■]— $^{125}\text{I}$ -радиоактивность во фракциях. 1— $^{125}\text{I}$ , не включившийся в пептиды, 2—немеченные пептиды, 3—монойодформы  $^{125}\text{I}$ -пептидов, 4—дийодформы  $^{125}\text{I}$ -пептидов. По оси абсцисс—объем элюента (мл). По оси ординат: слева—концентрация пептидов (нг/мл), справа—включение  $^{125}\text{I}$  ( $10^{-6}$  · пмп/мин)

бу наносили на колонку с SP-сефадексом C-25 (1,2×5 см), уравновешенным 0,05 М  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  с необходимым значением pH, не содержащим меркаптоэтанола. В случае  $\beta$ -эндорфина SP-сефадексе перед заполнением колонки выдерживали 1 ч в 1%-ном растворе бычьего сы-

\* Пептиды были любезно предоставлены проф. М. И. Титовым (лаборатория синтеза пептидов ВКНЦ АМН СССР, Москва).

вороточного альбумина (БСА) в воде при pH 9,0 (pH 9,0 устанавливали аммиаком в суспензии сефадекса), затем БСА отмывали дистиллированной водой при pH 9,0, уравнивали сефадекс 0,05 М  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ , pH 6,1 и после этого заполняли сефадексом предварительно силиконированную колонку.

Профили разделения меченых и немеченых форм некоторых опиоидных пептидов показаны на рис. 1 (хроматографию  $\gamma$ -эндорфина проводили при pH 4,0, а в случаях Лей-энкефалина и DADL использовали pH 3,5). При соответствующем подборе значения pH сначала элюируется свободный  $^{125}\text{I}$ , не включившийся при йодировании в пептид (пик 1), далее последовательно элюируются немеченый пептид (пик 2), моно- и дийодформы  $^{125}\text{I}$ -пептидов (пики 3 и 4 соответственно), причем все четыре пика хорошо разделяются. В связи с тем,

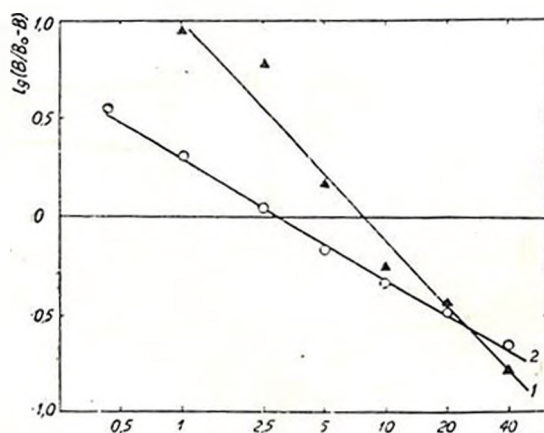


Рис. 2. Вытеснение меченого DADL из комплекса с опиоидными рецепторами мембран мозга крысы возрастающими концентрациями Мет-энкефалина.  $B_0$ —количество меченого лиганда, связанного с рецепторами в отсутствие немеченого лиганда,  $B$ —то же при определенной концентрации немеченого лиганда. По оси абсцисс—концентрация Мет-энкефалина, нМ. 1— $[^3\text{H}]$ -DADL, 2— $[^{125}\text{I}]$ -DADL

что в этих условиях достигается практически полная очистка монойодформ  $^{125}\text{I}$ -пептидов, их У. А. соответствует удельной радиоактивности используемого  $^{125}\text{I}$  и составляет около 2000 Ки/ммоль.

Биологические свойства полученных монойодформ опиоидных пептидов оценивали по их способности связываться с избытком специфической антисыворотки, полученной путем иммунизации кроликов пептидами, ковалентно связанными с БСА бисдиазотированным бензидином [6]. Иммунореактивность  $^{125}\text{I}$ -пептидов была при этом не ниже 90%. Пригодность меченых пептидов для использования в конкурентном анализе была проверена путем сравнения способности Мет-энкефалина вытеснять  $[^{125}\text{I}]$ -DADL (полученный описанным методом) и  $[^3\text{H}]$ -DADL («Amersham», Англия, У. А. 54 Ки/ммоль) из их комплекса с опиоидными рецепторами мембран мозга крысы [4]. Вытеснение 50% меченого лиганда из комплекса с мембранами для  $^{125}\text{I}$ -пептида наблю-

далось при концентрации Met-энкефалина 3 нМ, тогда как концентрация, необходимая для вытеснения 50%  $^3\text{H}$ -лиганда, была почти в три раза выше и составляла 8 нМ (рис. 2). Таким образом, йодированные пептиды, отделенные от их немеченых форм предлагаемым методом, могут успешно использоваться в радиорецепторном анализе.

Описанный хроматографический метод очистки  $^{125}\text{I}$ -пептидов позволяет при небольших затратах  $^{125}\text{I}$  получать моноидоформы опиоидных пептидов с У.А. около 2000 Ки/ммоль, имеющие иммунореактивность не менее 90% и пригодные для использования в радиоиммунологических и радиорецепторных исследованиях.

## METHOD OF SEPARATION OF IODINATED OPIOID PEPTIDES FROM THEIR NONRADIOACTIVE FORMS BY ION-EXCHANGE CHROMATOGRAPHY

DMITRIEV A. D., TENNOV A. V., GOLIKOVA. U. I., KIZIM E. A.,  
KOBLYANSKY A. G., SAMOVILOVA N. N.

Institute of Clinical Psychiatry of All-Union Mental Health Scientific  
Center, USSR Academy of Medical Sciences, Research Laboratory  
of the USSR Ministry of Public Health, Moscow, USSR

The method of separation of iodinated opioid peptides from their nonradioactive forms by ion-exchange chromatography on SP-sephadex G-25 using  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  gradient is described. The method permits to obtain pure monoiodoforms of peptides with activity about 2000 Ci/mole. The immunoreactivity of the monoiodoforms of Leu-, Met-enkephalins and  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -endorphins thus obtained is  $\geq 90\%$ . The applicability of these  $^{125}\text{I}$ -peptides for radioimmunological and radioreceptor studies is presented.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Hunter W. M. Brit. Med. Bull., v. 30, p. 18—23, 1974.
2. Goodfriend T. L., O'Day C. E.—In: Methods of hormone radio-immunoassay, p. 365—375. London—N. Y., Acad. Press, 1974.
3. Marshall J. C., Odell W. D. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., v. 149, p. 351—355, 1975.
4. Miller R. J., Chang K. J., Leighton J., Cuatrecasas P. Life Sci., v. 22, p. 379—388, 1978.
5. Stadill F., Rehfeld J. F. Scand. J. Clin. Lab. Invest., v. 30, p. 361—368, 1972.
6. Дмитриев А. Д., Голикова Ю. И., Кобылянский А. Г., Самовилова Н. Н., Трушина Е. Д., Ярыгин К. Н., Беспалова Ж. Д., Азьянко А. А., Сакс Т. Р. Нейрохимия, т. 1, с. 66—74, 1982.

Поступила 25. X. 1984





## АКТИВНОСТЬ КИСЛЫХ И НЕЙТРАЛЬНЫХ ПРОТЕИНАЗ В РАЗЛИЧНЫХ ОТДЕЛАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС; РАСПРЕДЕЛЕНИЕ В ГЛИИ И НЕЙРОНАХ

МУРТИ В., ПРАКАШ Г. С., СУБРАМАНИЯМ К., ШРИВАСТУ К. Р.,  
ПРАСАД М. С. К., САДАСИВУДУ Б.

Центр современных исследований в области нейрохимии, Отдел биохимии  
Османского медицинского колледжа, Хайдарабад, Индия

Помимо роли, которую играют протеиназы головного мозга в кругообороте белков, они принимают участие в аксоплазматическом токе [1] и образовании таких биологически активных пептидов, как вещество Р [2], эндорфины и энкефалины [3]. В различных тканях описаны два типа протеиназ—лизосомные и нелизосомные. Наибольшая роль в протеолизе отводится цистеиновым протеиназам—катепсинам В, Н и L [4]. Лизосомная аспарагиновая протеиназа катепсина D, активная при кислых значениях pH, обладает более узкой специфичностью по сравнению с цистеиновыми протеиназами. Все вышеуказанные протеиназы были выделены из ткани головного мозга разных животных [5—9]. Из головного мозга была выделена также нелизосомная протеиназа, активная при нейтральных значениях pH [5]. В настоящем сообщении представлены результаты исследований по региональному распределению протеиназ, активных при кислых и нейтральных значениях pH, в головном мозгу крыс и сопоставлено их содержание в изолированных препаратах нейронов и глии.

Эксперименты были проведены на белых крысах массой 150—200 г. Животных декапитировали и выделяли мозжечок, кору больших полушарий, ствол мозга согласно методике, предложенной Sadasivudu и Lajtha [10].

В опытах использовали 10%-ный гомогенат ткани в 0,32 М ледяной сахарозе, который получали с помощью гомогенизатора типа Поттер-Эльвегейм, используя тефлоновый пестик. Гомогенизацию проводили через 3 мин после декапитации.

Фракции, обогащенные нейронами и глией, получали по методу Iqbal и Tellez Nagel [11] в модификации Shrivastaw и соавт. [12]. Кору больших полушарий инкубировали с 0,1%-ным трипсином 1 ч при

37° в 10 мМ К-фосфатном буфере, рН 6,0 содержащем 10%-ный фиколл и 10%-ные растворы глюкозы и фукозы. Затем в пробы добавляли 0.1%-ный раствор ингибитора трипсина, все последующие операции проводили при 0—4°. Ткань размельчали, пропуская ее последовательно через сита разного диаметра (105, 75 и 53 мкм). Полученную суспензию разводили равным объемом 50%-ной сахарозы и насливали на прерывистый градиент сахарозы, содержащий 5 мл 50%-ной сахарозы, 10 мл 40%-ной сахарозы и 5 мл 35%-ной сахарозы. После 10-минутного центрифугирования при 4500g отбирали нейрональную фракцию, осевшую между 40 и 50%-ной сахарозой, для дальнейшей очистки. Глиальная фракция была получена на границе 35 и 40%-ной сахарозы. Морфологическая картина полученных фракций в фазово-контрастном микроскопе полностью соответствовала описанию Iqbal и Tellez Nagel [11] и Norton и Poduslo [13].

Активность протенназ определяли по методу Serra и соавт. [14] по высвобождению тирозина из денатурированного мочевиной гемоглобина. В случае протенназ, активных при нейтральных значениях рН, инкубационная смесь содержала 0,1 мл гемоглобина (2,5 мг), 32 мкмоль трис-НСI буфера, рН 7,6 и 0,2 мл гомогената. После 1 ч инкубации в термостатированной водяной бане при 37° с помешиванием реакцию останавливали добавлением 2 мл 5%-ной ТХУ. Затем пробы центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин и к 1 мл супернатанта добавляли 2 мл 0,5 М карбонат-бикарбонатного буфера с 0,05 М NaOH (рН 10,5), а через 10 мин при комнатной температуре—0,5 мл реагента Фолина (1:2,5) и через 1 ч измеряли поглощение при 750 нм, используя L-тирозин в качестве стандарта. В случае протенназ, активных при кислых значениях рН, в качестве субстрата использовали раствор гемоглобина (5 мл) в цитратном буфере, рН 3,2 (40 мкмоль цитрата). Белок определяли по методу Lowry и соавт. [15], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин.

Проведенные исследования показали, что активность нейтральных протенназ почти одинакова в коре полушарий и стволе мозга и несколько ниже в мозжечке (таблица). Во всех 3-х регионах активность

Таблица

Активность кислых и нейтральных протенназ в различных отделах головного мозга крыс (мкмоль тирозина/г сырой ткани)

|                          | Кора больших полушарий | Мозжечок           | Ствол мозга        |
|--------------------------|------------------------|--------------------|--------------------|
| Нейтральные протенназы   | 12,63±<br>1,38 (6)     | 10,63±<br>2,86 (6) | 14,63±<br>2,59 (6) |
| Кислые протенназы        | 156,8±                 | 153,5±             | 118,75±            |
| Белок (мг/г сырой ткани) | 11,4 (6)               | 12,32 (6)          | 13,57 (6)          |
|                          | 97,76±                 | 92,4±              | 84,83±             |
|                          | 4,55 (6)               | 6,91 (6)           | 16,0 (6)           |

кислых протенназ в 10 раз выше, чем нейтральных. Минимальная активность кислой протенназы обнаружена в стволе мозга, в двух других областях она практически одинакова. Как видно из данных, представленных на рисунке, У.А. нейтральных протенназ выше в глиальных клетках по сравнению с нейронами. Однако У.А. кислых протенназ в 4 раза выше в нейронах, чем в глии. С другой стороны, в нейронах У.А. кислых протенназ в 5 раз выше, чем нейтральных. В глиальных же клетках У.А. нейтральных протенназ вдвое выше, чем кислых. Минимальное содержание белка обнаружено в стволе мозга.

В последнее время описаны два основных пути внутриклеточной деградации белков. Установлено, что внутриклеточная деградация белков, в основном, осуществляется лизосомными протенназами [16]. По-видимому, за нелизосомный протеолиз ответственны протенназы, активные при нейтральных значениях pH.

Обычно более высокая активность кислых протенназ по сравнению с нейтральными в любом отделе головного мозга свидетельствует о большем вкладе кислых протенназ в деградацию белков, что может играть определенную роль при патологии.

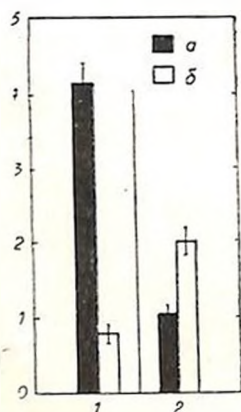


Рис. Активность кислых и нейтральных протенназ во фракциях, обогащенных нейронами (1) и глиальными клетками (2). а—кислые протенназы; б—нейтральные протенназы. По оси ординат—активность в мкмоль тирозина/мг белка/ч

Поскольку установлено, что активность кислых протенназ выше в нейрональном препарате, большая часть протенназ, активных при кислых значениях pH, должна быть локализована в нейронах. Точно так же высокая активность нейтральных протенназ в любом отделе головного мозга может быть обусловлена повышенным содержанием глиальных клеток. Значительная активность нейтральных протенназ обнаружена в синапсоммах [17]. Существует гипотеза, что деградация белков с длинным периодом полужизни осуществляется лизосомными ферментами, тогда как расщепление белков с коротким периодом полужизни может быть частично обусловлено нелизосомными нейтральными протенназами. Известно, что 3,5% белков мозга имеют короткое время полужизни (в среднем 10 ч), тогда как остальные—более длительное (в среднем 10 дней) [18]. В этой связи можно предположить, что нейроны обладают более высокой протеолитической активностью, что важно для осуществления ряда процессов, перечисленных во введении.



# ACID AND NEUTRAL PROTEINASES IN DIFFERENT REGIONS OF RAT BRAIN ALONG WITH THEIR DISTRIBUTION IN NEURONS AND GLIA

MOORTHY B., SURYA PRAKASH G., SUBRAHMANYAM K., SHRIVASTAW K. P.,  
PRASAD M. S. K., SADASIVUDU B.

Centre for Advanced Research in Neurobiochemistry, Department of Biochemistry,  
Osmania Medical College, India

Acid (pH 3,2) and neutral (pH 7,6) proteinase activities were studied in different regions of rat brain along with their specific activities in the enriched neuronal and glial cell preparations. It was found that the specific activity of neutral proteinase was relatively higher in glial cells when compared to neurons, while the specific activity of acid proteinase was higher in neurons. These data are discussed in relation to the breakdown of proteins in brain.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Black M. M., Lasek R. J. *Brain Res.*, v. 171, p. 401—413, 1979.
2. Marks N., Lajtha A.—In: *Handbook of Neurochemistry*, v. 5, pt. A., (ed. Lajtha A.), N. Y., Plenum Press, 1971.
3. Herbert E., D. *Trends Biochem. Sci.*, v. 6, p. 184—188, 1981.
4. Barrett A. J., Kirschke H.—In: *Methods in Enzymology*, v. 80, pt. C. p. 535—561, Lorand, L., N. Y., Acad. Press Inc., 1981.
5. Marks N., Lajtha A. *Biochem. J.*, v. 97, p. 74—83, 1965.
6. Hackenthal E., Hackenthal R., Hilgenfeldt U. *Biochim. et biophys. acta*, v. 522, p. 561—573, 1978.
7. Benuck M., Grynbaum A., Marks N. *Brain Res.*, v. 143, p. 181—185, 1978.
8. Barkhudaryan N. A., Akopyan T. N., Galoyan A. A. *Biokhimiya (Moscow)*, v. 45, p. 1293—1297, 1980.
9. Azaryan A. V., Akopyan T. N., Buntatyan H. *Ch. Biomed. Biochem. Acta*, v. 42, p. 1237—1246, 1983.
10. Sadasivudu B., Lajtha A. *J. Neurochem.*, v. 17, p. 1299—1311, 1970.
11. Iqbal K., Tellez Nagel. *Brain Res.*, v. 45, 296—301, 1972.
12. Shrivastaw K. P., Phillip M., Chevallier P. *J. Neurosci. Res.*, v. 9, p. 1—14, 1983.
13. Norton W. T., Podusto S. E. *Science*, v. 167, p. 1144—1146, 1970.
14. Serra S. A., Grynbaum A., Lajtha A., Marks N. *Brain Res.*, v. 44, p. 579—592, 1972.
15. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265—275, 1951.
16. Poole B., Wibo M. *J. Biol. Chem.*, v. 248, p. 6221—6226, 1973.
17. Lajtha A.—In: *Regional Neurochemistry*, p. 25—36, (Kety S. S., Elkes J., Eds.) London, Pergamon Press, 1961.
18. Lajtha A., Dunlop D. *Life Sci.*, v. 29, p. 755—767, 1981.

Поступила 9. II, 1984



УДК 616—008.939.633.2—02:616—008.931:577.152.311

РОЛЬ ТИОЛОВЫХ ГРУПП В АКТИВАЦИИ ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ  
ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ КАЛЬМОДУЛИНОМ

ГАЛОЯН А. А., ГУРВИЦ Б. Я., ШАРОВА Н. П.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Многочисленные исследования продемонстрировали участие кальмодулина в осуществлении механизмов действия многих ферментов, в числе которых аденилатциклаза, гуанилатциклаза, киназа легких цепей миозина, киназа фосфоорилазы,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРаза, NAD-киназа, фосфолипаза  $\text{A}_2$ . Показана регуляторная роль кальмодулина в процессах высвобождения нейротрансмиттеров, ионного транспорта, деполитаризации микротрубочек и др. [1].

Фосфодиэстераза (ФДЭ) циклических аденозин- и гуанозин-3', 5'-монофосфатов также является объектом регуляции кальмодулина. В настоящее время считается установленным существование множественных форм ФДЭ, которые чаще всего сводят к двум основным: кальмодулинзависимой и циклонуклеотидактивируемой. Существенным отличием кальмодулинзависимой ФДЭ от других форм является ее способность активироваться белковым модулятором в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$ .

Была обнаружена, однако, чрезвычайная лабильность ФДЭ, проявляющаяся, в частности, в потере чувствительности фермента к активирующему действию кальмодулина уже через несколько часов с момента начала выделения фермента [2]. При этом наблюдалось изменение олигомерной структуры фермента и снижение молекулярной массы его субъединицы [3, 4].

В соответствии с современными представлениями подобное падение чувствительности к кальмодулину сопровождается повышением базальной активности фермента в результате отделения от него ингибирующего домена в процессе эндогенного протеолиза [3—5]. Подтверждением этому служит, в частности, действие на ФДЭ трипсина, повышающего активность фермента до уровня, характерного для действия кальмодулина [6]. Однако многочисленные попытки полностью подавить эндогенный протеолиз ингибиторами различных протеиназ при исследовании регуляторной роли кальмодулина до настоящего времени не увенчались успехом.

Нами были изучены некоторые особенности влияния кальмодулина на активность растворимых форм ФДЭ гипоталамуса.

Ткань гипоталамуса гомогенизировали в 20 мМ трис-НСl буфере, рН 8,0 (1:2), содержащем 2 мМ  $MgCl_2$  и 0,1 мМ ЭГТА, в отсутствие или в присутствии 10 мМ дитиотрейтола (ДТТ) (или 2-меркаптоэтанола). Супернатант гомогената (75000g, 60 мин) в количестве 8 мл наносили на колонку (1,2×27 см) с ДЭАЭ-целлюлозой. Элюцию фермента проводили тем же буфером (по 4 мл на фракцию) с использованием градиента концентраций NaCl (0,05—0,4 М). Активность ФДЭ определяли в 10 мкл инкубационной среды, содержащей 20 мМ трис-НСl

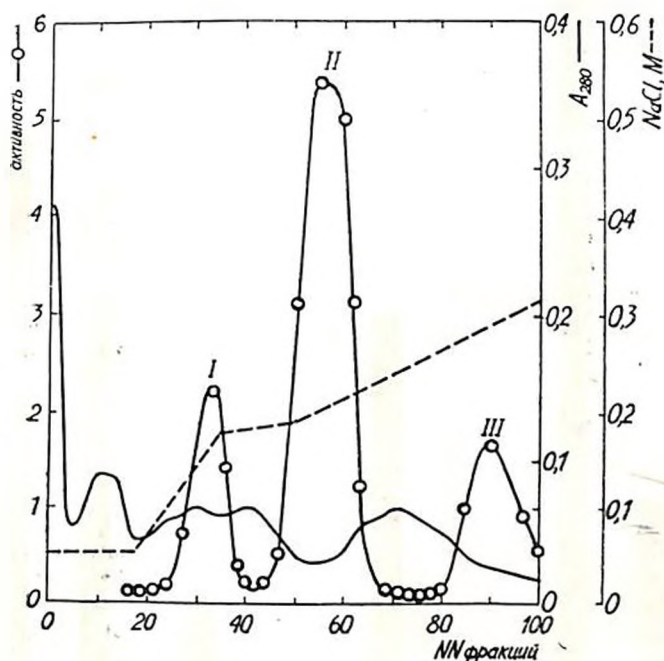


Рис. 1. Хроматография ФДЭ сГМР гипоталамуса быка на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой. По оси ординат (слева)—базальная активность фермента (нмоль сГМР/мг белка/мин), выделенного в отсутствие ДТТ

буфер, рН 8,0, 2 мМ  $MgCl_2$ , 3 мкМ сГМР, 0,2 мкКи  $[^3H]$  сГМР и определенное количество фермента элюированных фракций. После окончания инкубации пробы помещали в кипящую водяную баню, продукты реакции разделяли с помощью ТСХ на силикагеле и количество гидролизованного субстрата определяли с использованием жидкостного сцинтилляционного спектрометра.

На рис. 1 представлены результаты ИОХ на ДЭАЭ-целлюлозе ФДЭ, гидролизующей сГМР, свидетельствующие о наличии трех пиков активности (I, II и III) этого фермента. ФДЭ сГМР во всех трех пиках проявляла чувствительность к активации кальмодулином.

Как видно из данных, представленных на рис. 2, непосредственно после выделения фермента в присутствии восстановителей тиоловых



групп гомогенный препарат кальмодулина (5 мкг/мл) в комплексе с  $\text{Ca}^{2+}$  стимулировал ФДЭ I—III в 5—6 раз. После выдерживания фермента при  $4^\circ$  в течение нескольких суток он активировался кальмодулином в 2—3 раза и сохранял эту способность в течение длительного времени, в отличие от ФДЭ других тканей, которые полностью

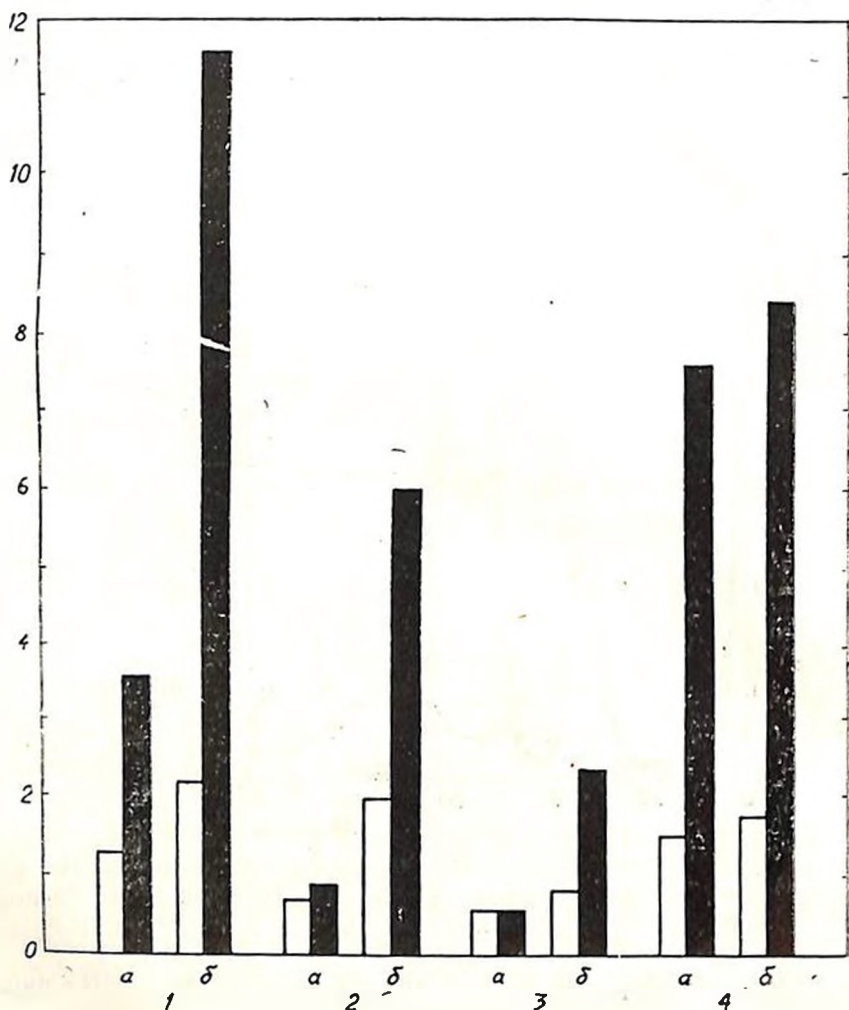


Рис. 2. Активность ФДЭ cGMP I в отсутствие (□) и в присутствии (■) кальмодулина через 2 ч (1), через неделю (2) и через 6 недель (3) после выделения фермента. 4—препарат фермента, в который через 6 недель после выделения (за 24 ч до определения чувствительности к кальмодулину) вносили 10 мМ ДТТ. Фермент выделяли в отсутствие (а) или в присутствии (б) ДТТ. По оси ординат—активность фермента (в нмоль cGMP/мг белка/мин). Характер активации кальмодулином ФДЭ cGMP II и III аналогичен ФДЭ I.

теряли чувствительность к кальмодулину уже через 24 ч с момента выделения фермента [3, 4]. Активацию кальмодулином ФДЭ, выделенной в отсутствие ДТТ, можно было наблюдать лишь в течение короткого периода времени. Однако было обнаружено, что даже при

Выделении фермента в отсутствие тиоловых соединений ФДЭ сохраняет латентную способность активироваться кальмодулином при ее хранении при 4° в течение 6—7 недель, которую можно выявить лишь после добавления к препарату фермента ДТТ (или 2-меркаптоэтанол) в концентрациях 1—10 мМ (рис. 2). Этим свойством обладали не только все три формы ФДЭ cGMP, но и ФДЭ cAMP.

Недавно было установлено, что ФДЭ cGMP приобретает способность активироваться под действием cAMP в условиях, в которых фермент утрачивает чувствительность к кальмодулину [7]. Восстановление способности ФДЭ активироваться кальмодулином в присутствии тиоловых соединений сопровождалось возникновением ингибирующего эффекта cAMP в концентрациях, оказывавших активирующее действие на гидролиз cGMP.

Можно предположить, что десенситизация ФДЭ гипоталамуса к кальмодулину не связана с необратимыми изменениями олигомерной структуры ферментного белка. Полученные результаты свидетельствуют о том, что ФДЭ гипоталамуса может претерпевать обратимые изменения регуляторных свойств под действием факторов, влияющих на состояние сульфгидрильных групп фермента, весьма существенных, как известно, для проявления его каталитической активности [8, 9].

## ROLE OF SH-GROUPS IN THE ACTIVATION OF PHOSPHODIESTERASE OF CYCLIC NUCLEOTIDES BY CALMODULIN

GALOYAN A. A., GURVITS B. Ya., SHAROVA N. P.

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

Multiple forms of phosphodiesterase (PDE) of cyclic GMP purified from bovine hypothalamus by ion-exchange chromatography proved to be calmodulin-dependent. Their susceptibility to activation by calmodulin has been partially lost on storage, but was recovered on addition of reducing agents for thiol groups. Data obtained indicate that loss of susceptibility of hypothalamic PDE to activation by calmodulin is caused by oxidation of free SH-groups.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Cheung W. Y. Science, v. 207, p. 19—27, 1980.
2. Ho H. C., Wirch E., Stevens F. C., Wang J. H. J. Biol. Chem., v. 252, p. 43—50, 1977.
3. Tucker M. M., Robinson J. B., Stellwagen E. J. Biol. Chem., v. 256, p. 905—958, 1981.

4. Дудкин С. М., Агаларова М. Б. Циклические нуклеотиды. Тезисы докладов IV Всесоюзного симпозиума, с. 54—55, Минск, 1982.
5. Brostrom C. O., Brostrom M. A., Wolff D. I. J. Biol. Chem., v. 252, p. 5677—5685, 1977.
6. Russel T. R., Terasaki W. L., Appleman M. M. J. Biol. Chem., v. 248, p. 1334—1340, 1973.
7. Cheung W. Y.—In: Advances in Biochem. Psychopharmacol., v. 3, p. 51—67, Raven Press, N. Y., 1970.
8. Van Inxegen R. G., Swafford R. L., Strada S. I., Thompson W. J. Arch. Biochem. and Biophys., v. 178, p. 58—63, 1977.
9. Gurvitz B. Ya., Galoyan A. A. 16th Meeting of FEBS, Abstr., XXII—050, Moscow, p. 448, 1984.

Поступила 12. VI 1984

## ШЕСТОЙ СЪЕЗД ЕВРОПЕЙСКОГО НЕЙРОХИМИЧЕСКОГО ОБЩЕСТВА—ПРАГА 1986. ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

В сентябре 1986 г. в Праге (ЧССР) намечается провести IV съезд Европейского нейрoхимического общества, программа которого будет состоять из симпозиумов, рабочих заседаний, дискуссий за круглым столом, стендовых сообщений и пленарных докладов, посвященных всем разделам нейрoхимии и молекулярной нейробиологии, включая нейрoфармакологические и нейрoпатологические аспекты.

Дополнительная информация о съезде будет разослана секретариатом ВБО АН СССР и опубликована в нашем журнале.



УДК 612.82.015.348

## СПЕРМИДИН И СПЕРМИН В ОТДЕЛАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ ГИПЕРОКСИИ

ЦВЕТНЕНКО Е. З.

Научно-исследовательский биологический институт при РГУ им. М. А. Суслова,  
Ростов-на-Дону

Среди вызываемых гипероксией нарушений различных сторон метаболизма у животных важную роль играют сдвиги в системе полиаминов. Полиамины спермидин и спермин выполняют в организме ряд важных функций—участвуют в механизмах регуляции роста, процессе воспроизведения генетической информации и биосинтеза белков, поддержании стабильности клеточных мембран и регуляции активности ряда ферментов [1—3]. Существуют данные и о специфических функциях полиаминов в ЦНС [4]. Ранее нами [5] было показано резкое снижение содержания спермидина и спермина в головном мозгу крыс при действии повышенного давления  $O_2$ . Введение же животным полиаминов перед сеансом гипероксии отдалало время наступления кислородных судорог [6]. Имеющиеся литературные данные свидетельствуют о разной чувствительности отделов головного мозга при развитии патологических явлений при гипероксии [7, 8]. В то же время содержание полиаминов в норме в значительной степени варьирует в разных отделах ЦНС [9]. В связи с этим было изучено содержание спермидина и спермина в мозжечке, среднем мозгу и коре больших полушарий крыс в норме и при действии повышенного давления  $O_2$ .

Объектом исследования служили половозрелые крысы-самцы массой 120—150 г. Животные были разделены на две группы—контрольную и подопытную, которую в барокамере подвергали воздействию повышенного давления  $O_2$  0,7 МПа до наступления судорожного приступа. После декомпрессии животных быстро декапитировали, извлекали мозг и помещали его в ледяной физиологический раствор. Выделяли мозжечок, средний мозг и кору больших полушарий. Спермидин и спермин отделяли на колонке с карбоксиметилцеллюлозой, как описано у Endo и Ogura [10] и измеряли количество этих полиаминов спектрофлуориметрически после реакции с О-фталевым альдегидом [11]. Стандартами служили спермидинтригидрохлорид и сперминтетрагидрохлорид фирмы «Merck».



Из таблицы видно, что наиболее богатыми по содержанию спермидина являются мозжечок и средний мозг. В коре больших полушарий количество спермидина достоверно ниже. Распределение спермина по отделам мозга крысы носит сходный характер: наибольшее его содержание обнаружено в мозжечке, наименьшее — в коре больших полушарий, что согласуется с данными Shaw [4], Shaskan и соавт. [9].

Таблица

Содержание полиаминов в отделах головного мозга крыс при гипероксии (нмоль/г свежей ткани)

| Условия опыта | Мозжечок                 |                         | Средний мозг             |                        | Кора больших полушарий   |                        |
|---------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|------------------------|--------------------------|------------------------|
|               | спермидин                | спермин                 | спермидин                | спермин                | спермидин                | спермин                |
| Контроль      | 517±16<br>(7)            | 324±12<br>(8)           | 540±12<br>(7)            | 275±23<br>(7)          | 454±15<br>(7)            | 242±22<br>(7)          |
| Гипероксия    | 160±15<br>(9)<br>p<0,001 | 178±8<br>(9)<br>p<0,001 | 243±18<br>(7)<br>p<0,001 | 261±18<br>(9)<br>p>0,5 | 223±25<br>(9)<br>p<0,001 | 264±37<br>(9)<br>p>0,5 |

Примечание. p—достоверность отличий по сравнению с контролем. В скобках—количество опытов

При действии на животных повышенного давления  $O_2$  (0,7 МПа) содержание спермидина снижалось во всех исследованных отделах мозга: в мозжечке на 69, в среднем мозгу на 55, в коре больших полушарий на 50 %.

Содержание спермина снижалось при гипероксии лишь в мозжечке (на 45%), а в среднем мозгу и в коре больших полушарий оставалось на уровне контроля.

Концентрация полиаминов в тканях регулируется сложной цепью ферментативных реакций, первым звеном которой можно считать расщепление аргинина. При гипероксии наблюдается снижение активности аргиназы мозга [12]. Это может привести к резкому снижению содержания орнитина, являющегося непосредственным предшественником полиаминов в мозгу. В этой связи привлекают внимание результаты исследования на линии клеток млекопитающих, в которых отсутствовала аргиназная активность: удаление из среды экзогенных орнитина и полиаминов приводило к полному исчезновению в этих клетках путресцина, спермидина, концентрация же спермина уменьшалась лишь в небольшой степени [13].

Следующим ферментом на пути синтеза полиаминов является орнитиндекарбоксилаза. В гомогенатах сердца крысы показано снижение активности этого фермента в присутствии высокоактивных форм  $O_2$  [14]. Поскольку на пути синтеза полиаминов орнитиндекарбоксилаза находится ближе к спермидину, чем к спермину, содержание спермидина в большей степени зависит от активности этого фермента, чем содержание спермина. Отсутствие изменений в уровне количества спермина в среднем мозгу и коре больших полушарий можно объяснять,

наконец, и большей устойчивостью спермидинсинтетазы по сравнению со спермидинсинтетазой.

Полиамины играют важную роль в метаболизме нуклеиновых кислот, оказывают стимулирующий эффект на скорость и точность белкового синтеза. В многочисленных исследованиях, проведенных на клеточных культурах, показано, что снижение внутриклеточного содержания полиаминов сопровождается подавлением репликации ДНК и синтеза белков [15, 16]. Неодинаковая компартиментализация спермидина и спермина в клетках млекопитающих позволяет предположить различие их функций. Так, спермин в большей степени, чем спермидин, ассоциирован с ядрами, в частности с хромосомами, что свидетельствует о его связи с метаболизмом ДНК [17, 18]. Содержание спермина в ядрах клеток резко повышается при стимуляции синтеза ДНК [17]. В нормальных условиях функционирования НС количество ДНК в ядрах как нейронов, так и глии отличается постоянством. Данные об изменении синтеза ДНК в ткани мозга взрослых крыс при гипероксии в литературе отсутствуют; у новорожденных же крыс гипероксия угнетала пролиферацию нервных клеток [19]. Исходя из полученных нами данных о неизменности содержания спермина в среднем мозгу и коре больших полушарий при действии на крыс повышенного давления  $O_2$  можно предположить, что в этих условиях изменений в синтезе ДНК в данных отделах не было. Снижение синтеза ДНК происходило, вероятно, только в клетках мозжечка.

Резкое снижение уровня количества спермидина во всех изученных отделах мозга может свидетельствовать о глубоких нарушениях в них синтеза тканевых белков. Полиамины влияют не только на скорость синтеза белка, но и на его точность, обеспечивая взаимодействие кодона с антикодоном, что объясняется способностью полиаминов влиять на конформацию тРНК и рибосом [20]. Имеющие место при гипероксии изменения аминокислотного состава белков мозга крыс [21, 22] могут быть обусловлены обнаруженным нами снижением содержания полиаминов, особенно спермидина, в мозгу.

## SPERMIDINE AND SPERMINE IN RAT BRAIN DIFFERENT REGIONS UNDER HYPERBAROXYGENATION

TSVETNENKO E. Z.

Research Institute of Biology of M. A. Suslov Rostov-on-Don State University

The effect of hyperbaric oxygenation (0,7 MPa) on the content of polyamines spermine and spermidine in rat cerebral hemispheres cortex, midbrain and cerebellum was studied. The spermidine content in all investigated brain regions decreased during oxygen convulsions. The most significant decrease of the spermidine content was revealed in the cerebellum. The spermine content during oxygen convulsions decreased as



well but this decrease took place only in cerebellum. The role of polyamines in the regulation of protein and DNA biosynthetic processes under hyperoxia is discussed.

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Bachrach U.* Function of naturally occurring polyamines. Academic Press, N. Y.,—L., 1973
2. *Clo C., Orlandini C., Casti A., Giarnieri C.* Ital. J. Biochem., v. 25, № 1, p. 94—114, 1976.
3. *Pegg A., McCann P.* Amer. J. Physiol., v. 243, № 5, p. 211—221, 1982.
4. *Shaw G.* Biochem. Pharmacol., v. 28, p. 1—6, 1979.
5. *Цветненко Е. З., Шугалей В. С.* Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 85, с. 28—30, 1978.
6. *Кричевская А. А., Цветненко Е. З., Шугалей В. С., Хижняк А. Г.* Укр. биохим. журн. т. 54, № 5, с. 568—571, 1982.
7. *Зальцман Г. Л.*—В кн.: Гипербарическая эпилепсия и наркоз, с. 129—136, Наука, 1968.
8. *Агаджанян Н. А., Калужный Л. В.* Успехи физиол. наук. т. 1, № 2, с. 26—40, 1970.
9. *Shaskan E., Haraszi J., Snyder S. J.* Neurochem., v. 20, № 5, p. 1443—1452, 1973.
10. *Endo Y., Ogura L.* Jap. J. Pharmacol., v. 25, p. 610—612, 1975.
11. *Endo Y.* Anal. Biochem., v. 89, p. 235—246, 1978.
12. *Кричевская А. А., Шугалей В. С., Ананян А. А., Степнина Е. Г.* Физиол. журн. СССР, т. 68, № 10, с. 1427—1437, 1982.
13. *Pohjanpelto P., Knuutila M.* Exp. Cell. Res., v. 141, № 2, p. 333—339, 1982.
14. *Guarnieri C., Lugares A., Flamigni F., Muscari C., Caldarera C.* Biochim. et biophys. acta, v. 718, № 2, p. 157—164, 1982.
15. *Teraoka H., Tsukada K.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 95, № 2, p. 638—643, 1980.
16. *Sidransky H., Verney E., Murty C.* Biochem. Med., v. 27, № 1, p. 68—81, 1982.
17. *Mach M., Ebert P., Popp R., Ogilvie A.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 104, № 4, p. 1327—1334, 1982.
18. *Goyns M. H.* Exp. Cell. Res., v. 122, № 2, 377—380, 1979.
19. *Grave G., Kennedy C. J.* Neurochem., v. 19, № 1, p. 187—194, 1972.
20. *Abracham A.* Med. Biol., v. 59, № 5—6, p. 368—373, 1981.
21. *Кричевская А. А., Синишкин А. А., Щербина Л. А., Шерстнев К. Б.*—В сб.: 6-я конференция по нейрохимии, с. 87, Л., 1972.
22. *Кричевская А. А., Бондаренко Т. И., Милютин Н. П., Маклецова М. Г.*—В кн.: Гипербарическая оксигенация в акушерстве и неонатологии, с. 118, М., 1981.

Поступила 1. III 1984



УДК 616.831—008:612.8.015

## СОДЕРЖАНИЕ ПЕРЕКИСЕЙ ЛИПИДОВ В ТКАНИ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ

ВОРОБЬЕВ Ю. В., ПРОМЫСЛОВ М. Ш.

Институт нейрохирургии им. Н. Н. Бурденко АМН СССР, Москва

Работами Промыслова и Тиграняна [1, 2] было показано, что при черепно-мозговой травме особенно сильно нарушаются процессы окислительного фосфорилирования, в то время как дыхание ткани мозга претерпевает не столь значительные нарушения. В зависимости от функционального состояния ЦНС травмированных животных отмечалась разная степень нарушений сопряженности процессов дыхания и окислительного фосфорилирования в ткани мозга. При этом нарушение сопряженности этих процессов у животных с преобладанием возбуждательных процессов в ЦНС было менее значительным и быстрее возвращалось к норме, чем у животных, у которых травма протекала на фоне торможения нервной деятельности.

Существует мнение, что гипоксия любой этиологии создает условия для интенсификации перекисного окисления липидов [3].

Горбунов и соавт. [4] нашли у больных ишемическим инсультом прямую зависимость интенсивности перекисного окисления липидов от тяжести течения инсульта.

Гулидова [5] сообщает, что повышение интенсивности образования перекисей липидов при воздействии сыворотки крови больных инфарктом сопровождается изменением энергетического метаболизма митохондрий головного мозга экспериментальных животных.

При исследовании артерио-венозной разницы по кислороду у больных с черепно-мозговой травмой нами [6] было обнаружено, что не весь поглощаемый мозгом кислород идет на образование углекислоты. Возможно, что при черепно-мозговой травме создаются условия для интенсификации перекисного окисления, в значительной степени влияющие на энергетический обмен мозга и на течение и исход патологического процесса в целом.

В связи с этим было исследовано образование перекисей липидов в ткани мозга кроликов, перенесших черепно-мозговую травму, и влия-

ние на этот процесс функционального состояния ЦНС травмированных животных.

Работа была проведена на кроликах-самцах породы шиншилла массой 2,5—3,0 кг. Черепно-мозговую травму наносили посредством свободного падения груза массой 500 г с высоты 2,2 м на голову фиксированного в станке животного. В качестве вещества, стимулирующего деятельность НС, использовали фенамин при внутримышечном введении его в дозе 0,6 мг/кг массы животного. Снотворную смесь (уретан 400 мг/кг с вероналом 30 мг/кг массы животного) вводили в краевую вену уха кролика. Производили двукратное введение указанных пре-

Таблица

Содержание перекисей липидов в разных участках мозга кроликов при черепно-мозговой травме (нмоль/г ткани)

|           | Контроль          | Травма через 1 сутки | Травма с введением фенамина | Травма с введением уретана с вероналом |
|-----------|-------------------|----------------------|-----------------------------|----------------------------------------|
| Ствол     | 7,28±0,38<br>(16) | 13,26±1,61<br>(11)   | 9,34±0,56<br>(8)            | 12,49±0,42<br>(9)                      |
| $p_1$     |                   | <0,001               | <0,01                       | <0,001                                 |
| $p_2$     |                   |                      | <0,05                       | >0,5                                   |
| Полушария | 8,22±0,49<br>(16) | 13,82±1,15<br>(11)   | 10,04±0,56<br>(8)           | 13,37±0,98<br>(9)                      |
| $p_1$     |                   | <0,001               | <0,01                       | <0,001                                 |
| $p_2$     |                   |                      | <0,01                       | >0,5                                   |

Примечание.  $p_1$ —сравнение с контролем;  $p_2$ —сравнение с травмой через 1 сутки.

паратов через 5 мин после нанесения черепно-мозговой травмы и за 2 ч до забоя животного. Забой животных проводили воздушной эмболией через 1 сутки после нанесения травмы. Извлечение мозга и все последующие операции с ним проводили на холоду.

Перекиси липидов определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой [7]. Содержание малонового диальдегида рассчитывали, используя величину молярного коэффициента экстинкции триметинового комплекса, и полученный результат выражали в нмоль/г ткани.

Через 1 сутки после нанесения черепно-мозговой травмы содержание перекисей липидов в ткани мозга нарастало по сравнению с их содержанием у интактных животных—в стволе на 82 и в полушариях на 68% (таблица).

При стимуляции НС травмированных животных фенамином содержание перекисей липидов через один сутки после травмы значительно снижалось, приближаясь к контролю. При введении травмированным животным снотворной смеси уровень перекисей липидов в ткани головного мозга практически не отличался от такового у животных с черепно-мозговой травмой без дополнительных вмешательств.

Результаты исследования позволяют сделать вывод о том, что при черепно-мозговой травме происходит усиленное образование перекисных соединений липидов в мозгу травмированных животных. Это яв-

ляется одной из причин повреждения структуры митохондрий, что в свою очередь приводит к нарушению энергетического обмена головного мозга.

Важно отметить, что процесс образования перекисных соединений липидов в мозгу при черепно-мозговой травме поддается регулированию направленным изменением функционального состояния ЦНС травмированных животных.

## LIPID PEROXIDES IN BRAIN OF ANIMALS WITH EXPERIMENTAL CRANIAL TRAUMA

VOROBIEV Yu. V., PROMYSLOV M. Sh.

N. N. Burdenko Institute of Neurosurgery, USSR Academy of Medical Sciences, Moscow

It's demonstrated that cranial trauma is accompanied by intensification of brain lipids peroxidation, especially in brain stem. Stimulation of CNS of injured animals by phenamine leads to a substantial decrease of lipid peroxides in brain tissue. On the contrary, in the case of administration of mixture of urethane with veronal the amount of lipid peroxides remains on the high level.

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Промыслов М. Ш., Тигранян Р. А. Вестн. АМН СССР, т. 17, № 11, с. 28—31, 1971.
2. Промыслов М. Ш. Вестн. АМН СССР, т. 28, № 9, с. 81—86, 1982.
3. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., Наука, 1972.
4. Горбунов Ф. Е., Гуканов В. А., Никонов А. А.—В кн.: Нарушения мозгового кровообращения, с. 45. М., Наука, 1979.
5. Гулидова Г. П. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 91, № 1, с. 42—48, 1981.
6. Воробьев Ю. В. Энергетический обмен головного мозга у нейрохирургических больных, канд. дис., М., 1972.
7. Стальная И. Д., Гаришвили Т. Г.—В кн.: Современные методы в биохимии (под ред. В. Н. Ореховича), с. 66—68. М., Медицина, 1977.

Поступила 15. I 1984





## ОБЗОРЫ

УДК 546.001.1:547.963:616.8.009

МЕТАБОЛИЗМ БИОГЕННЫХ МОНОАМИНОВ ПРИ  
ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ ЦНС

ГОРКИН В. З.

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

В обзоре представлены новые сведения о природе и свойствах ферментов, участвующих в метаболизме биогенных моноаминов в ЦНС, которые имеют не только теоретический интерес, но находят также непосредственное практическое применение в невропатологии и психиатрии.

Как достижения в изучении биогенных моноаминов и их производных в качестве химических медиаторов или модуляторов нервных импульсов, так и новая информация о природе и специфическом ингибировании ферментов, участвующих в метаболизме биогенных моноаминов в ЦНС, очень быстро находят непосредственное практическое применение в клинической медицине, в частности в невропатологии и психиатрии [1, 2].

Ферменты, окисляющие биогенные амины, или аминоксидазы, в частности МАО [амин: кислород оксидоредуктаза (дезаминирующая) (содержащая флавин); КФ 1.4.3.4], открытые более 50 лет тому назад, с годами привлекают все больший интерес исследователей именно в связи с разработкой актуальных вопросов невропатологии и психиатрии [3—5]. Какие же биохимические проблемы в этой области науки можно считать особенно важными в настоящее время и в перспективе, по крайней мере, на ближайшие годы? Таковыми представляются следующие четыре проблемы: 1) множественность типов аминоксидаз; 2) их специфическое избирательное ингибирование; 3) функциональные взаимосвязи между различными аминоксидазами и другими ферментами азотистого обмена; 4) стимулирование активности аминоксидаз.

Согласно современным представлениям, различают МАО типа А, специфически окисляющие важнейшие нейромедиаторы серотонин и норадреналин и избирательно блокируемые низкими концентрациями (дозами) ацетиленового амина хлоргиллина [N-(2, 4-дихлорфеноксипропил-N-метил-2-пропилиламин гидрохлорид)] и МАО типа Б, для которых специфическими субстратами служат бензиламин,  $\beta$ -фенилэтил-



амин, теле-метилгистамин, а избирательным ингибитором—другой ацетиленовый амин депренил (N-1-фенилизопропил-N-метил-2-пропиламин гидрохлорид) в низких концентрациях (дозах) [6, 7]. Многим важным биогенным аминам (тирамин, триптамин, дофамин) часто приписывают свойства так называемых «смешанных субстратов», окисляемых MAO обоих типов. Следует, однако, иметь в виду, что в различных биологических объектах доля участия MAO разных типов в окислении одного и того же амина может быть совершенно иной [8]. Разноречивые данные об участии MAO того или иного типа в окислении аминов были получены также в зависимости от условий инкубирования (в особенности, от концентрации амина в пробах) [2, 6].

В тканях мозга взрослого здорового человека MAO типа Б составляют 80% общей аминоксидазной активности [3, 7]. Интересно, что MAO типа Б сосредоточены преимущественно не в нейронах, как MAO типа А, а в клетках нейроглии [4, 9].

Работами ряда лабораторий было установлено, что в ткани мозга человека окисление дофамина, имеющего важное значение в центральной регуляции тонуса скелетной мускулатуры, катализируют преимущественно MAO типа Б, избирательно блокируемые депренилом [10, 11]. На этих данных основано успешное применение депренила при лечении паркинсонизма [12]. В сочетании с метаболитическим предшественником дофамина L-3, 4-диоксифенилаланином (ДОФА) и ингибиторами периферических декарбоксилаз ароматических аминокислот (например, L- $\alpha$ -метил- $\alpha$ -гидразин-3,4-диоксифенилпропионовой кислоты) депренил способствует повышению содержания дофамина в стволовой части мозга больных паркинсонизмом [10].

По мере старения организма, когда соотношение между нейрональными и глияльными нервными элементами постепенно изменяется в пользу последних, активность MAO типа Б в тканях мозга относительно нарастает (по сравнению с активностью MAO типа А), что сопровождается снижением тканевой концентрации дофамина, нарушающим функционирование дофаминергических нейронов [10]. В этих условиях введение в организм депренила оказывало определенные благотворные эффекты на важные физиологические функции [7]. В самой общей форме изложенные соображения и основанные на них рекомендации применимы также к возрастной деменции, когда активность MAO типа Б в тканях мозга также относительно увеличена (по сравнению с активностью MAO типа А) [13].

Природа множественных форм MAO еще не раскрыта. Имеются данные о различной локализации MAO разных типов на митохондриальных мембранах. Так, MAO типа Б локализованы на наружной поверхности наружных митохондриальных мембран клеток печени крысы, но MAO типа А—на внутренней поверхности этих биомембран [14].

Данные целого ряда авторов свидетельствуют о различии величины  $M_r$  (примерно 60 кД для MAO типа А; 55 кД для MAO типа Б) и, очевидно, первичных структур субъединиц MAO типов А и Б, что прин-

ципнально важно как доказательство не только функциональных, но и структурных различий между МАО типов А и В [15—18]. Наконец, в 1982 г. удалось получить моноклональные антитела против препарата МАО типа В из тромбоцитов человека [19, 20]. Эти антитела были использованы для приготовления иммуносорбента, который эффективно связывал МАО типа В, но не связывал МАО типа А в детергентных экстрактах митохондрий печени человека, что позволяет физически разделять эти ферменты. Очевидно, МАО типов А и В печени представляют собой эволюционно родственные белки, не идентичные друг другу ни по структуре, ни по функции. Их биосинтез, вероятно, кодируют различные гены [18]. Следует, однако, отметить, что существуют также иные представления о природе МАО типов А и В [21].

Рассматривая проблему множественности МАО, следует подчеркнуть, что общепринятое в настоящее время представление о МАО типов А и В (так называемая «бинарная классификация» Johnston [22]) не исчерпывает всей сложности вопроса [3, 8]. Так, например, при исследовании кинетики ингибирования изопропилгидразидом D, L-серина активности МАО митохондриальной фракции из стволовой части мозга быка были получены указания на существование еще одной формы МАО, не предусмотренной обычной бинарной классификацией и специфически окисляющей тирамин, который принято считать «смешанным» субстратом, окисляемым как МАО типа А, так и МАО типа В [23]. Оказалось, что изопропилгидразид D, L-серина тормозит в такой системе дезаминирование тирамина при значительно более низкой концентрации, по сравнению с концентрациями, нужными для ингибирования дезаминирования серотонина и  $\beta$ -фенилэтиламина, но не при промежуточной, как следовало бы ожидать на основании бинарной классификации.

В дальнейшем были разработаны методы солиubilизации и препаративного разделения путем аффинной хроматографии 4-х форм митохондриальной МАО из стволовой части мозга быка [24] или человека [25]. Из этих множественных форм МАО мозга наиболее интересна форма III; при шизофрении она либо полностью отсутствует, либо составляет не более 25% от количества этой формы фермента (в расчете на белок) в норме.

Высокоочищенные (гомогенные при электрофорезе в ПААГ) множественные формы МАО из коры и подкорковых образований левого и правого полушарий головного мозга человека окисляют оптимальные концентрации тирамина, серотонина,  $\beta$ -фенилэтиламина, дофамина с такими соотношениями скоростей, которые указывают на невозможность идентификации ни одной из этих форм МАО с предусмотренными обычной бинарной классификацией МАО типов А и В [25]. С этим заключением согласуются результаты кинетических исследований зависимости скорости окисления биогенных аминов от их концентрации в пробах с различными формами МАО [26], а также данные кинетического анализа, проведенного с применением хлоргидина и депренила в низ-



ких концентрациях [27]. Таким образом, по субстратной и ингибиторной специфичности множественные формы МАО не идентичны постулируемым современной бинарной классификацией МАО типов А и В. Сходный вывод о несовершенстве этой бинарной классификации на основании иных данных был сделан и другими авторами [28].

Проблему множественности МАО по традиции логически связывают с проблемой избирательного специфического ингибирования их активности [29]. По современным представлениям, среди соединений, взаимодействующих не с отдельными функциональными группами МАО (и поэтому изменяющими их активность, но не являющимися специфическими ингибиторами), а с активными центрами МАО как таковыми, наиболее важны следующие группы веществ: ацетиленовые амины (например, хлоргиллин или депренил), образующие аддукты с флавиновым компонентом МАО; производные циклопропиламина (например, транилциклопропиламин), образующие аддукты как с флавиновым компонентом, так и с SH-группами; производные гидразина (например, фенилэтилгидразин), также образующие аддукты с флавиновым компонентом и модифицирующие SH-группы [4, 30]. Установлено, что представители этих трех групп соединений являются типичными «фермент-активируемыми» ингибиторами, то есть, иными словами, взаимодействуя с активными центрами МАО, они подвергаются превращениям, которые катализируют сами МАО, с образованием веществ, непосредственно уже ответственных за наблюдаемые эффекты блокирования ферментативной активности [6, 30].

Важную группу специфических ингибиторов МАО составляют полициклические соединения, в частности новые эффективные отечественные психотропные лекарственные средства тетрациклической структуры (пиразидол, никазан и родственные соединения) [3, 31, 32]. Замечательная особенность этих соединений как ингибиторов МАО заключается в том, что свойство, например, пиразидола (пирлиндола) избирательно блокировать активность МАО типа А, но не МАО типа В сохраняется при любых концентрациях (или дозах), а не только при низких, как это характерно для ацетиленовых аминов [33, 34]. Интересно отметить, что избирательное блокирование полициклическими азотсодержащими соединениями реакции окислительного дезаминирования серотонина не обусловлено структурным сходством этих ингибиторов с индолалкиламинами, как это можно было бы предположить по аналогии с современными представлениями о причинах, лежащих в основе избирательного ингибирования МАО типа А индолсодержащими производными гидразина [35]. Оказалось, что тетрациклические ингибиторы, в частности пиразидол, избирательно блокируют активность хлоргиллинчувствительных МАО типа А и в тех ситуациях (природа биологических объектов, состав экспериментальных проб), когда субстратами МАО типа А служат не индолалкиламины, а фенилалкиламины, например,  $\beta$ -фенилэтиламин в относительно высоких концентрациях [34].

К числу специфических ингибиторов МАО относятся также неко-

торые сравнительно простые структурные аналоги биогенных аминов, действующие в качестве «квази-субстратов», конкурентно блокирующих активные центры аминоксидаз, но, по-видимому, не подвергающихся при этом ферментативным превращениям (в отличие от рассмотренных выше «ферментактивируемых» ингибиторов) [3]. Примеры таких структурных аналогов аминов может служить производное фенилэтиламина—2,6-дихлор-4-диметиламинофенилэтилметиламин гидрохлорид [36]. Это соединение тормозит активность МАО в организме в более низких концентрациях, чем все хорошо известные в настоящее время ингибиторы этого фермента, включая хлоргилин и депренил [4]. Полагают, что подобные избирательные обратимо действующие ингибиторы МАО найдут значительно более широкое применение в клинике, в частности при лечении депрессивных состояний, чем применявшиеся ранее ингибиторы (производные гидразина или фенилциклопропиламина), не оказывавшие избирательного ингибирующего эффекта на окисление различных биогенных аминов в организме [37]. Уже в настоящее время пересматривается представление, бывшее еще недавно общепринятым, о недопустимости сочетаний трициклических антидепрессантов при лечении депрессивных состояний с ингибиторами МАО; использование ингибиторов МАО субстратно-избирательного действия делает такие сочетания в ряде случаев не только допустимыми, но и желательными [38, 39].

Особенно сложными представляются проблемы функциональной взаимосвязи между различными аминоксидазами и другими ферментами азотистого обмена [40]. Как МАО, так и диаминоксидазы (ДАО) [амин:кислород оксидоредуктаза (дезаминирующая) (содержащая пиридоксаль)], КФ 1.4.3.6 катализируют одну и ту же реакцию окислительного дезаминирования аминов [41]. Однако эти ферменты существенно различаются между собой не только по субстратной и ингибиторной специфичности, но также по множеству физико-химических свойств [3—6]. В противоположность медьсодержащим аминоксидазам (или ДАО), флавоинзависимые аминоксидазы (или МАО) относятся к числу типичных тиоловых ферментов [3, 42]. Алкилирование или меркаптидирование тиоловых групп МАО приводит к снижению их активности, но частичное обратимое окисление тиоловых групп (с образованием, по-видимому, остатков сульфеновых кислот—SOH) не только снижает активность МАО, но также вызывает ее качественное изменение (трансформацию или конверсию), в результате чего МАО приобретают свойство дезаминировать гистамин, кадаверин, путресцин (субстраты ДАО) и даже такие азотистые соединения как ГАМК, аминоксахара, АМР, которые вообще не являются субстратами аминоксидаз [3, 4, 43—45]. Это замечательное свойство МАО, присущее, очевидно, только МАО типа А [46—48], реализуется и в таких сложных биологических системах как митохондриальные мембраны, а также в целом организме при многих патологических состояниях, сопровождаемых стимуляцией перекисного окисления липидов [3, 4]. Недавно



это явление было обнаружено в митохондриальной фракции мозга при стрессорных воздействиях в эксперименте [49]. Было показано также, что относительно быстрое введение в организм целого ряда психотропных препаратов, обладающих высоким сродством к активным центрам МАО и обнаруживающих свойства прооксидантов, может сопровождаться индуцированием в митохондриях мозга (на фоне полного блокирования активности МАО типа А) мощной гистаминдезаминирующей активности [46, 50—54]. Одновременно в мозгу снижалось содержание гистамина и нарастало содержание серотонина [50, 53]. Можно предполагать, что подобной трансформации МАО принадлежит определенная патогенетическая роль при ряде заболеваний и интоксикаций [3, 4, 54].

При многих патологических состояниях в эксперименте и в клинике было обнаружено статистически достоверное снижение активности МАО [3, 4]. В клинических исследованиях объектом изучения служили тромбоциты, при исследованиях ферментов которых были отмечены определенные черты сходства с нейронами мозга [55]. Однако, по современным представлениям, тромбоциты крови человека содержат только МАО типа В и не обнаруживают активности, характерной для МАО типа А [4].

Хорошо известные, хотя и не всеми воспроизведенные данные о снижении активности МАО в тромбоцитах периферической крови, в частности при шизофрении [56, 57], в настоящее время рассматривают не как диагностический признак, а как указание на генетически детерминированную недостаточность моноаминергических систем мозга, что способствует при неблагоприятных ситуациях развитию разнообразных дисфункций мозга [57, 58].

За последние годы особенно большой интерес привлекают корреляции между активностью МАО тромбоцитов периферической крови (отражающей в известной мере активность МАО типа В головного мозга) и особенностями поведения не только больных с маниакально-депрессивными состояниями [58], но и клинически здоровых людей [59—61]. Были получены, в частности, данные о том, что сниженная активность МАО в тромбоцитах периферической крови характерна для практически здоровых людей, особенность которых заключается в стремлении к острым ощущениям (например для альпинистов) [61].

Проблема стимуляции аминоксидазной активности, хотя и представляется очень важной, фактически еще не была предметом систематического изучения [3, 62]. Некоторые индолилгидразиды, например, гидразид  $\beta$ -(2-метилиндолил-3) пропионовой кислоты или дигидразид  $\alpha$ -бутил- $\beta$ -(2-метил-5-карбоксиндолил-3) пропионовой кислоты стимулировали активность МАО в тканях мозга крыс при относительно низкой исходной активности этого фермента [63]. Так, например, стимулирующее действие индолилгидразидов выявилось на фоне сниженной исходной серотониндезаминирующей активности в тканях мозга, что обеспечивалось предварительным введением животным низких доз



ипронназида (не вызывавших полного блокирования активности МАО); достигаемая при стимуляции индолилгидразидами серотонийдезаминазная активность не превышала скорости деаминации этого амина в тканях мозга крыс, которым ипронназид не вводили. Индолилгидразиды в условиях этих опытов потенцировали действие резерпина на животных, что можно рассматривать как фармакологическое проявление стимуляции активности МАО [62].

Имеются сведения о возможном существовании соединений, стимулирующих аминоксидазную активность, в рядах производных хинуклидина [64].

Важное значение в метаболизме нейромедиаторов имеет также катехоламин-О-метилтрансфераза (катехол-метилтрансфераза, S-аденозил-L-метионин: катехол-О-метилтрансфераза, КФ 2.1.1.6), хотя этот фермент и локализован в нервной системе вне нейронов [65]. Высокий уровень величины отношения активности этого фермента в эритроцитах к сумме активностей МАО типа Б тромбоцитов периферической крови и растворимой аминоксидазы плазмы крови позволяет прогнозировать с высокой степенью вероятности возможность возникновения психотических расстройств в условиях торможения активности дофамин-β-гидроксилазы [дофамин-β-монооксигеназа: 3,4-дигидроксифенилэтиламин, аскорбат: кислород оксидоредуктаза (β-гидроксилирующая), КФ 1.14.17.1], что обусловлено накоплением галлюциногенных продуктов метилирования дофамина [66]. Такое торможение гидроксилирования дофамина до норадреналина имеет место, в частности, при лечении алкоголизма препаратами, являющимися производными диэтилдитиокарбамата (дисульфирам, антабус) [67].

Важное значение имеет изыскание новых ингибиторов катехоламин-О-метилтрансферазы, более эффективных, чем производные пропанофенона (и тем более, пирогаллола), для предотвращения накопления продуктов метилирования катехоламинов в тканях мозга при лечении паркинсонизма препаратами L-ДОФА [68].

В биосинтезе нейромедиаторов роль ферментов, активность которых ограничивает скорость всего процесса в целом, обычно приписывают тирозингидроксилазе [тирозин-3-монооксигеназа; L-тирозин, тетрагидроптеридин: кислород оксидоредуктаза (3-гидроксилирующая), КФ 1.14.16.2] и триптофангидроксилазе [триптофан-5-монооксигеназа, L-триптофан, тетрагидроптеридин: кислород оксидоредуктаза (5-гидроксилирующая), КФ 1.14.16.4] [69]. За последние годы было установлено, что микроокружение активных центров этих ферментов обычно не насыщено субстратами [70]. Эти данные обосновывают целесообразность применения тирозина и триптофана при депрессивных состояниях [71].

Имеются данные о том, что избыток моноаминомонокарбоновых аминокислот при гиперактивации катехоламинергических нейронов снижает содержание тирозина в тканях мозга, ограничивая синтез катехоламинов [72].

В тканях мозга человека скорость синтеза нейромедиаторов могут ограничивать, как оказалось, не только гидроксилазы, но и декарбоксилазы ароматических аминокислот (карбоксилаза ароматических L-аминокислот, КФ 4.1.1.28) [73]. Недостаточность этих интранейрональных ферментов как полагают, генетически сопряжена с предрасположенностью к развитию маниакально-депрессивного психоза [74].

Практически не проникающие через ГЭБ специфические фермент-активируемые ингибиторы декарбоксилазы ароматических аминокислот, представляющие собой фторпроизводные  $\alpha$ -метил-3,4-диоксифенилаланина, созданы за последние годы для лечения паркинсонизма в сочетании с L-ДОФА [75].

Новые данные о свойствах дофамин- $\beta$ -гидроксилазы, а также достижения в изыскании новых ингибиторов (как синтетических, так и природного происхождения) активности этого фермента важны, в частности, в связи с обнаружением повышения его активности в плазме крови при нейрогенной гипертензии, тогда как при шизофрении, но не при маниакально-депрессивном психозе, дофамин- $\beta$ -гидроксилазная активность в плазме крови была снижена [76]. Если дофамин- $\beta$ -гидроксилазная активность крови действительно отражает скорость биосинтеза норадреналина в тканях мозга, то эти данные особенно важны в свете представлений о недостаточности норадреналина в тканях мозга при шизофрении [77].

В биохимии фенилэтаноламин-N-метилтрансферазы (норадреналин-N-метилтрансфераза; S-аденозил-L-метионин: фенилэтаноламин-N-метилтрансфераза, КФ 2.1.1.28) как фермента, катализирующего синтез адреналина из норадреналина, за последние годы достигнуты новые успехи, имеющие важное значение для нейробиологии [69]. Установлено, что этот фермент имеется не только в мозговом слое надпочечников, как полагали прежде, но и в головном мозгу, особенно в тех зонах стволовой его части, которые участвуют в центральной регуляции кровяного давления [78]. Удалось показать существование взаимосвязи между изменениями кровяного давления, поведенческих параметров и активностью фенилэтаноламин-N-метилтрансферазы [79]. Определенные перспективы в избирательном блокировании синтеза адреналина в организме открывают работы по изысканию новых специфических ингибиторов активности фенилэтаноламин-N-метилтрансферазы [80].

Приведенные в настоящем обзоре примеры свидетельствуют о том важном значении, которое имеют и могут иметь достижения в области биохимии аминов для нейробиологии, невропатологии, психиатрии и других медицинских дисциплин.

# METABOLISM OF BIOGENIC MONOAMINES IN PATHOLOGY OF CNS

GORKIN V. Z.

Institute of Biological and Medical Chemistry, USSR Academy of Medical Sciences, Moscow

Paper reviews new data on the nature and properties of enzymes involved in the metabolism of biogenic monoamines in CNS that are gaining importance for neuropathology and psychiatry.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Catecholamines: Basic and Clinical Frontiers (eds. E. Usdin, I. J. Kopin, J. Barchas), New York, Pergamon Press, 1979.
2. Monoamine Oxidase: Basic and Clinical Frontiers. Eds. K. Kamijo, E. Usdin, T. Nagatsu. Amsterdam, Excerpta Medica, 1982.
3. Горкин В. З. Аминоксидазы и их значение в медицине, М., Медицина, 1981.
4. Gorkin V. Z. Amine Oxidases in Clinical Research, Oxford, Pergamon Press, 1983.
5. Monoamine Oxidase: Structure, Function, and Altered Functions. Eds. T. P. Singer, R. W. von Korff, D. L. Murphy. New York, Academic Press, 1979.
6. Горкин В. З. Вопросы мед. химии, т. 28, № 2, с. 2—9, 1982.
7. Knoll J.—In: Strategy in Drug Research (ed. J. A. Kaverling Buisman) p. 107—131, Amsterdam, Elsevier, 1982.
8. Fowler C. J., Callingham B. A., Mantle T. J., Tipton K. F. Biochem. Pharmacol., v. 27, p. 97—101, 1978.
9. Orelund L., Fowler C. J., Carlsson A., Magnusson T. Life Sci., v. 26, p. 139—146, 1980.
10. Knoll J.—In: Monoamine Oxidase Inhibitors. The State of the Art. (eds. M. B. H. Youdim, E. S. Paykel. Chichester, John Wiley and Sons), p. 45—62, New York, 1981.
11. Glover V., Elsworth J. D., Sandler M. J. Neural Transmission, v. 16, p. 163—168, 1980.
12. Youdim M. B. H., Riederer P., Birkmayer W., Mendlewicz J.—In: Monoamine Oxidase: Structure, Function, and Altered Functions. (eds. T. P. Singer, R. W. von Korff, D. L. Murphy, p. 477—485, New York, Academic Press, 1979.
13. Orelund L., Adolfsson R., Fowler C. J., Gottfries C. G., Wiberg A., Winblad B.—In: Biological Psychiatry 1981, (eds. C. Perris, G. Struwe, B. Jansson), p. 973—981, Amsterdam, Elsevier, 1981.
14. Russell S. M., Davey J., Mayer R. J.—In: Monoamine Oxidase: Structure, Function, and Altered Functions, (eds. T. P. Singer, R. W. von Korff, D. L. Murphy), p. 265—274, New York, Academic Press, 1979.
15. Cawthon R. M., Breakefield X. O. Nature, v. 281, p. 692—694, 1979.
16. Brown G. K., Powell J. F., Craig I. W. Biochem. Pharm., v. 29, p. 2595—2599 1980.
17. Callingham B. A., Parkinson D.—In: Monoamine Oxidase: Structure, Function, and Altered Functions (eds. T. P. Singer, R. W. von Korff, D. L. Murphy, p. 81—95, New York, Academic Press, 1979.
18. Nagatsu T., Nakano T., Kato T., Kano-Tanaka K., Higashida H.—In: Monoamine Oxidase: Basic and Clinical Frontiers (eds. K. Kamijo, E. Usdin, T. Nagatsu), p. 279—288, Amsterdam, Excerpta Medica, 1982.
19. Denney R. M., Fritz R. R., Patel N. T., Abell C. W. Science, v. 215, p. 1400—1404, 1982.



20. Denney R. M., Patel N. T., Fritz R. R., Abell C. W. *Molec. Pharm.*, v. 22, p. 500--509, 1982.
21. Северина Н. С. *Биохимия*, т. 44, с. 195—206, 1979.
22. Johnston J. P. *Biochem. Pharm.*, v. 17, p. 1285—1297, 1968.
23. Бауманис Э. А., Калинин Н. Э., Москвитина Т. А., Козлов Л. В., Горкин В. З. *Биохимия*, т. 43, с. 1496—1503, 1978.
24. Moskvitina T. A., Kamyschanskaya N. S., Garishvili T. G., Gorkin V. Z. *Preparative Biochemistry*, v. 9, p. 171—196, 1979.
25. Камышанская Н. С., Москвитина Т. А. *Вопр. мед. химии*, т. 27, № 2, с. 261—266, 1981.
26. Москвитина Т. А., Кучина Н. Е., Горкин В. З. *Вопр. мед. химии*, т. 28, № 5, с. 127—130, 1982.
27. Москвитина Т. А., Кучина Н. Е., Горкин В. З. *Биохимия*, т. 48, с. 119—124, 1983.
28. Eiduson S., Buckman T.—In: *Monoamine Oxidase: Structure, Function, and Altered Functions* (eds. T. P. Singer, R. W. von Korff, D. L. Murphy.), p. 213—229 New York, Academic Press, 1979.
29. Горкин В. З. *Журн. Всесоюзн. хим. общ-ва им. Д. И. Менделеева*, т. 9, с. 405—416, 1964.
30. Singer T. P.—In: *Monoamine Oxidase: Structure, Function, and Altered Functions* (eds. T. P. Singer, R. W. von Korff, D. L. Murphy.), p. 7—28, New York, Academic Press, 1979.
31. Машковский М. Д., Андреева Н. Н., Полежаева А. Н. *Фармакология антидепрессантов*, М., Медицина, 1983.
32. Глушков Р. Г., Васильевых Л. Г., Каган Х. С., Горкин В. З. *Хим.—фармацевт. журн.*, т. 15, № 5, с. 58—62, 1981.
33. Машковский М. Д., Горкин В. З., Вережкина Н. В., Аснина Е. В., Тушикина С. М. *Бюл. экперим. биол. и мед.*, т. 91, № 2, с. 169—171, 1981.
34. Вережкина Н. В., Аснина Е. В., Горкин В. З., Машковский М. Д. *Вопр. мед. химии*, т. 29, № 5, с. 118—123, 1983.
35. Gurpegui M., Monge A., Fuentes J. A., *Arzneimittel-Forsch.*, v. 31, p. 1710—1713, 1981.
36. Florvail L., Ask A.—L., Ogeron S. O., Ross S. B. *J. Medic. Chem.*, v. 21, p. 56—63, 1978.
37. Murphy D. L., Lipper S., Campbell I. C., Major L. F., Slater S. L., Buchsbaum M. S.—In: *Monoamine Oxidase: Structure, Function, and Altered Functions* (eds. T. P. Singer, R. W. von Korff, D. L. Murphy.), p. 457—468, New York, Academic Press, 1979.
38. Fuller R. W. *Progr. Neuro-Psychopharmacol.*, v. 2, p. 303—311, 1978.
39. Ponto L. B., Perry P. J., Liskow B. I., Seaba H. H. *Amer. J. Health Pharmacy*, v. 34, p. 954—961, 1977.
40. Blaschko H. *Rev. Physiol. Biochem. Pharm.*, v. 70, p. 83—148, 1974.
41. Браунштейн А. Е. *Биохимия аминокислотного обмена*, М., Изд-во АМН СССР, 1949.
42. Mondovi B., Guerrieri P., Costa M. T., Sabatini S.—In: *Adv. In Polyamine Res.*, v. 3. (Eds. C. M. Calderera, V. Zappia, U. Bachrach), p. 75—89, New York, Raven Press, 1981.
43. Gorkin V. Z.—In: *Adv. in Pharm. and Chemotherapy*, v. 11. (eds. S. Garattini, F. Hawking, A. Goldin, I. J. Kopin), p. 1—50, New York, Academic Press, 1973.
44. Gorkin V. Z.—In: *Horizons in Biochem. and Biophys.*, v. 3, (eds. E. Quagliariello, F. Palmieri, T. P. Singer. Reading, Mass.) Addison-Wesley Publ. Co. p. 1—28, 1977.
45. Горошинская Н. А., Бронюцкая З. Г. *Вопр. мед. химии*, т. 22, с. 558—562, 1976.
46. Baumanis E. A., Kalnina I. E., Moskvitina T. A., Gorkin V. Z. *Biochem. Pharm.*, v. 26, p. 1059—1063, 1977.

47. *Geroshinskaya I. A., Bronovitskaya Z. G., Gorkin V. Z.* Comm. in Psychopharm., v. 1, p. 39—47, 1977.
48. *Шатемирова К. К., Веревкина Н. В., Горкин В. З.* Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 83, № 6, с. 669—671, 1977.
49. *Горошинская И. А., Грабовскова Л. Л., Бронуицкая З. Г., Кричевская А. А.* Физiol. журн. СССР, т. 67, с. 1611—1615, 1981.
50. *Машковский М. Д., Каминка М. Э., Горкин В. З., Калинин Н. Э., Бауманис Э. А.* Хим.—фармацевт. журн., т. 14, № 6, с. 11—14, 1980.
51. *Калинина Н. Э., Бауманис Э. А., Кайране Ч. Б., Горкин В. З.* Вопр. мед. химии, т. 27, № 6, с. 773—779, 1981.
52. *Бауманис Э. А., Калинин Н. Э., Иристе А. А., Горкин В. З.* Вопр. мед. химии, т. 27, № 1, с. 72—77, 1981.
53. *Baumanis E. A., Kalnina I. E., Kaminka M. E., Mashkovsky M. D., Gorkin V. Z.* Agents and Actions, v. 11, № 67, p. 685—692, 1981.
54. *Горкин В. З.* Вестн. АМН СССР, т. 28, № 9, с. 78—81, 1982.
55. *Murphy D. L.*—In: *Frontiers in Catecholamine Research* (eds: E. Usdin, M. Sandler.), p. 1077—1081, Oxford, Pergamon Press, 1973.
56. *Murphy D. L., Wyatt R. J.* Nature, v. 238, p. 225—226, 1972.
57. *Murphy D. L., Buchsbaum M. S.*—In: *Critical Issues in Psychiatric Diagnosis* (eds: R. L. Spitzer, D. F. Klein), p. 305—321, New York Raven Press, 1978.
58. *Oreland L., Wiberg A., Asberg M., Traskman L., Sjostrand L., Thoren P., Bertilsson L., Tybring G.* Psychiatry Research, v. 4, p. 21—26, 1981.
59. *Murphy D. L., Belmaker R. H., Buchsbaum M., Martin N. F., Ciaranello R., Wyatt R. J.* Psychological Medicine, v. 7, p. 149—157, 1977.
60. *Donnelly E. F., Murphy D. L., Waldman I. N., Buchsbaum M., Coursey R. D.* Biological Psychiatry, v. 14, p. 375—383, 1979.
61. *Fowler C. J., von Knorring L., Oreland L.* Psychiatry Research, v. 3, p. 273—279, 1980.
62. *Сафразбекян Р. Р.* Особенности изучения активации моноаминоксидазы, Ереван, 1983.
63. *Сафразбекян Р. Р., Сукасян Р. С., Арзунц Э. М.* Вопр. мед. химии, т. 25, с. 311—314, 1979.
64. *Бауманис Э. А., Горкин В. З., Калинин Н. Э., Каминка М. Э., Машковский М. Д.* Фармакология и токсикология, т. 43, № 1, с. 36—41, 1980.
65. *Kaplan G. P., Hartman B. K., Creveling C. R.*—In: *Catecholamines: Basic and Clinical Frontiers* (eds: E. Usdin, I. J. Kopin, J. Barchas), p. 1354—1358, New York, Pergamon Press, 1979.
66. *Major L. F., Murphy D. L., Gershon E. S., Brown G. L.* Amer. J. Psychiatry v. 136, p. 679—684, 1979.
67. *Кривченкова Р. С.* Вопр. мед. химии, т. 29, № 4, с. 7—13, 1983.
68. *Fahn S., Comi R., Snider S. R., Prasad A. L. N.*—In: *Catecholamines: Basic and Clinical Frontiers*. Eds. E. Usdin, I. J. Kopin, J. Barchas, p. 225—228, New York, Pergamon Press, 1979.
69. *Горкин В. З.* Вопр. мед. химии, т. 20, № 3, с. 227—238, 1974.
70. *Wurtman R. J., Scally M. C., Gibson C. J., Hefti F.*—In: *Catecholamines: Basic and Clinical Frontiers* (eds: E. Usdin, I. J. Kopin, J. Barchas.), p. 64—67, New York, Pergamon Press, 1979.
71. *Sourkes T. L.*—In: *The Brain's Mind. A Neuroscience Perspective on the Mind-Body Problem* (ed. D. Bindra), p. 53—69, New York, Gardner Press, 1980.
72. *Wurtman R. J.*—In: *Aromatic Amino Acids in the Brain* (eds: G. E. W. Wolstenholm, D. W. Fitzsimons), p. 381—389, Amsterdam, Elsevier, 1974.
73. *Sacks W., Vogel W. H., Nagatsu T., Lloyd K. G., Sandler M.*—In: *Catecholamines: Basic and Clinical Frontiers*, (eds: E. Usdin, I. J. Kopin, J. Barchas), p. 127—131, New York, Pergamon Press, 1979.



74. Carlsson A.—In: Catecholamines: Basic and Clinical Frontiers (eds. E. Usdin, I. J. Kopin, J. Barchas), p. 4—12, New York, Pergamon Press, 1979.
75. Palfreyman M. G., Jung M. J., Danzin C., Ribereau-Gayon G., Bey P., Zraika M., Sjoerdsma A.—In: Catecholamines: Basic and Clinical Frontiers. (eds. E. Usdin, I. J. Kopin, J. Barchas), p. 132—135, New York, Pergamon Press, 1979.
76. Fujita K., Ito T., Maruta K., Teradiara R., Beppu H., Nakagami Y., Kato Y., Nagatsu T., Kato T.—In: Catecholamines: Basic and Clinical Frontiers. (eds. E. Usdin, I. J. Kopin, J. Barchas), p. 1940—1945, New York, Pergamon Press, 1979.
77. Buchsbaum M. S., Murphy D. L., Coursey R. D., Lake C. R., Ziegler M. G.—In: Attention and Information Processing in Schizophrenia. (eds. S. Matthysse, B. J. Spring, J. Sugarman), p. 215—228, Oxford, Pergamon Press, 1979.
78. Sauter A. M., Baba Y., Stone E. A., Goldstein M. Brain Res., v. 144, p. 415—421, 1978.
79. Saavedra J. M., Grobecker H., Axelrod J. Science, v. 191, p. 433—436, 1975.
80. Grunewald G. L., Vincek W. C., Davis D. P., Borchardt R. T.—In: Catecholamines: Basic and Clinical Frontiers (eds. E. Usdin, I. J. Kopin, J. Barchas), p. 189—193, New York, Pergamon Press, 1979.

Поступила 5. III 1984



УДК 577.12.02:577.152

МЕМБРАННЫЕ ЛИПИДЫ КАК РЕГУЛЯТОРЫ  
МЕЖБЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

БОЛДЫРЕВ А. А., ЛОПИНА О. Д., ПРОКОПЬЕВА В. Д.

Кафедра биохимии МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

В обзоре рассмотрены способы, посредством которых липидная фаза мембраны может регулировать работу переносимых систем— $\text{Ca}^{2+}$ - и  $\text{Na}^{+}$ -насосов. Конкретизированы понятия «микровязкость» и «гидрофобный объем» липидного бислоя и показано, что эти параметры взаимосвязаны и играют существенную роль в регуляции межбелковых взаимодействий в олигомерных ансамблях транспортных АТРАЗ. Приведены доказательства в пользу того, что АТР в миллимолярных концентрациях модифицирует взаимоотношения между транспортными АТРАзами и липидным бислоем, устраняя контроль за работой ферментов со стороны липидной фазы.

Рассмотренные закономерности, в общем, должны иметь место в случае различных мембранных структур, в том числе и в нервной ткани.

В конце 60-х—начале 70-х годов сформировалась гипотеза, согласно которой биологические мембраны представляют собой липидный бислой со встроенными в него молекулами интегральных белков («мозаичная структура»). Одновременно были разработаны методы выделения мембранных белков [1—3]. Первым крупным успехом в развитии этого направления явилась очистка интегрального белка митохондриальной мембраны—цитохромоксидазы [4]. Позднее в виде изолированных белок-липидных комплексов удалось получить целый ряд других мембранных белков, в том числе и транспортные АТРАЗы:  $\text{Na}^{+}$ ,  $\text{K}^{+}$ -АТРАЗу [5] и  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРАЗу из мембраны саркоплазматического ретикулума [6]. Было установлено, что для проявления активности мембранных ферментов необходимо присутствие липидов: их удаление приводит к агрегации белка, сопровождающейся потерей ферментативной активности. Минимальное количество фосфолипидов, необходимое для поддержания белка в активном состоянии, составляет 25—30 моль фосфолипидов/моль белка.

На основании этих опытов была сформулирована концепция аннулярных (пограничных) липидов, связанных с интегральным белком и играющих специфическую роль в его функционировании. Она была подтверждена экспериментами, в которых установлено структурирующее воздействие белка на состояние липидного бислоя (это, в част-

ности, было показано методами ЭПР-спектроскопии). Кроме того, была обнаружена корреляция между критическими температурами для ферментативной активности мембранных белков и состояния их липидного окружения. Основываясь на этой концепции, неудачи, возникшие при реконструкции функций отдельных мембран в случае встраивания белков в липосомы из индивидуальных липидов (чаще всего лецитина), исследователи объясняли отсутствием специфического липидного окружения [7, 8].

Однако стали появляться факты, не соответствовавшие концепции аннулярных липидов. Так, оказалось, что гидролитическая активность  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы может быть восстановлена самыми разными фосфолипидами кислой природы [9]. После удаления липидов  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазу можно было реактивировать как кислыми фосфолипидами, так и различными детергентами, причём степень реактивации хорошо коррелировала с величиной гидрофильно-липофильного коэффициента для используемых детергентов [10, 11].

Для характеристики белок-липидных взаимодействий использовали физические методы (ЭПР-спектроскопию, протонный ЯМР, флуоресцентную спектроскопию), получая противоречивые результаты. Так, измерение поляризации флуоресценции зондов, погружённых в бислой, позволяет оценить подвижность порядка  $10^8$ — $10^{10}$  с<sup>-1</sup>, данные протонной и дейтериевой ЯМР-спектроскопии— $10^6$ — $10^{10}$  и  $10^4$ — $10^5$  с<sup>-1</sup> соответственно, в то время как ЭПР-спектроскопия характеризует движение с частотой  $10^7$ — $10^9$  с<sup>-1</sup>. Все это не позволяло сделать однозначного вывода о роли аннулярных липидов в функционировании мембранных ферментов.

Измеряя подвижность фосфолипидов в мембране саркоплазматического ретикулума, Шарпан и соавт. установили, что обмен между аннулярными и общими липидами бислоя происходит с частотой большей, чем  $10^3$  с<sup>-1</sup> (то есть, один оборот за 0,001 с) [12]. Число оборотов мембранных ферментов оценивается в  $10^2$  с<sup>-1</sup>. Это означает, что превращение одной молекулы субстрата происходит за 0,01 с. Таким образом, расчёт времени жизни аннулярного слоя липидов показывает, что за время превращения ферментом одной молекулы субстрата слой липидов вокруг него успевает многократно смениться. Эти факты заставили сомневаться в том, что именно аннулярный слой липидов специфическим образом регулирует активность мембранных ферментов, скорее всего, на неё влияет состояние всей (или значительной части) липидной фазы мембраны.

Результаты опытов по реактивации мембранных ферментов различными детергентами и липидами позволяют считать, что главная функция липидов заключается в создании определенного гидрофобного окружения вокруг белка, без которого невозможно поддержание нативной конформации фермента. Степень реактивации  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы, например, существенным образом зависит от толщины липидного бислоя, в который этот фермент встраивается, а при оптимальной толщине бислоя—от вязкости (упорядоченности) липидного окружения [13].



Это обусловлено, по-видимому, тем, что для осуществления ферментативной реакции молекула белка должна обладать определённой подвижностью в плоскости мембран (так называемая вращательная подвижность). Для  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРаза вращательная подвижность, соответствующая оптимальной активности фермента, характеризуется величиной времени корреляции  $\sim 5 \cdot 10^{-8}$  с [14]. Снижение вращательной подвижности (увеличение времени корреляции до  $\sim 8 \cdot 10^{-4}$  с) при встраивании АТРаза в упорядоченный бислой, состоящий из динальмитониллецитина при той же температуре ( $0^\circ$ ) приводило к почти полному ингибированию ферментативной активности [14]. В этих условиях добавление детергента активировало  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРаза не за счёт её солиubilизации ( $\text{Ca}^{2+}$ -АТРаза остается встроеной в мембранные фрагменты), а благодаря изменению микровязкости гидрофобного окружения, что восстанавливало вращательную подвижность почти до исходного уровня. Такого рода факты заставляют по-новому взглянуть на дискуссию, развернувшуюся в последнее время, по поводу причины вызываемых температурой переходов в мембранных ферментах.

Эти исследования начались с экспериментов, в которых была установлена корреляция между влиянием температуры на ферментативную активность и состоянием окружающего белок бислая. Было показано, в частности, что графики Аррениуса для  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРаза имеют такой же вид, как и для параметров, характеризующих состояние бислая (измерения проводили с использованием метода ЭПР-спектроскопии и спиновых меток, погружённых в бислой на различную глубину [15]). Авторы, обнаружившие это явление, предположили, что липиды бислая при изменении температуры претерпевают фазовый переход, который резко изменяет ферментативную активность мембранных белков. Однако последующие эксперименты с использованием других физических методов (ЯМР-спектроскопии, дифракции рентгеновских лучей) показали, что липиды в мембране саркоплазматического ретикулума остаются жидкими даже при температуре  $5^\circ$ , хотя подвижность их жирнокислых цепей менялась с её понижением [16].

В последнее время появилась другая точка зрения, согласно которой изменения конформации мембранных ферментов при изменении температуры возникают сами по себе, а не вызываются изменением состояния бислая [17, 27]. Эта гипотеза подтверждалась тем, что использование некоторых апробированных методов (например, регистрация поляризации флуоресценции липидного зонда дифенилгексатриена) не обнаруживало критических изменений в упорядоченности липидов в мембране саркоплазматического ретикулума при температурах  $10\text{--}40^\circ$  [18]. С другой стороны, это предположение было подтверждено результатами экспериментов, в которых наблюдали зависевшее от температуры изменение конформации солиubilизированной  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРаза при температуре  $20\text{--}22^\circ$  [17].

Подробный анализ итогов работ такого рода показал, что эту проблему нельзя считать решённой. Действительно, солиubilизован-

ные препараты мембранных ферментов часто содержат значительное количество мембранных липидов (до 30 моль липидов/моль белка), а в цитированной выше работе Andersen и соавт. [17] содержание липидов в солюбилизированных препаратах АТРа́зы проверено не было. Определение параметров, характеризующих состояние нового липид-детергентного окружения солюбилизированного белка, проводили лишь в редких случаях, и тогда в них выявлялась корреляция между температурами, при которых изменялась конформация солюбилизированного белка и свойства его гидрофобного окружения.

Анализируя состояние этой проблемы, мы пришли к заключению, что в настоящее время описаны как собственно термолуцированные изменения конформации мембранных ферментов (например,  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРа́зы при 38—40° [15]), так и конформационные переходы, вызываемые изменением состояния (упорядоченности) липидного окружения (например,  $\text{Na}^{+}$ ,  $\text{K}^{+}$ -АТРа́зы при температуре 20° [19]). Для цитохромоксидазы описаны оба случая [20—22]. Что касается вызванного температурой изменения конформации  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРа́зы при температуре 20°, то этот вопрос нельзя считать окончательно решённым. Однако мы полагаем, что имеющиеся в настоящее время экспериментальные факты свидетельствуют о согласованных изменениях в области 20° как подвижности (упорядоченности) углеводородных цепей липидов, так и конформации  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРа́зы. Поскольку известно, что в некоторых случаях эта согласованность может нарушаться (см. далее), мы склонны считать, что регуляция ферментативной активности  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРа́зы может осуществляться за счёт изменения состояния окружающего белок липидного бислоя. В настоящем обзоре рассмотрены собственные экспериментальные данные, подтверждающие эту концепцию.

Для оценки состояний липидной фазы в мембране саркоплазматического ретикула́ма нами были избраны два независимых подхода, рекомендуемых в литературе [23—25]. Один из них связан с изменением поляризации флуоресценции дифенилгексатриена (ДФГ). После преникубации ДФГ с мембранными ферментами он обнаруживается преимущественно в области, занятой гидрофобными (жирнокислотными) цепями липидов, хотя при наличии большого количества белка и высокой концентрации ДФГ этот зонд может связываться и с гидрофобными областями белка [24]. Однако при соблюдении определённых ограничений поляризация флуоресценции ДФГ характеризует плотность упаковки углеводородных цепей бислоя. Второй подход заключается в регистрации поведения другого флуоресцентного зонда — пирена, который также располагается между цепями жирных кислот. Столкновение возбужденной и невозбужденной молекул пирена приводит к образованию эксимера, флуоресцирующего в иной области, чем мономер. Степень эксимеризации пирена зависит от того, насколько велика вероятность встречи его молекул в гидрофобном участке мембраны, что, в свою очередь, определяется не только плотностью упаковки жирнокислотных цепей липидов, но и концентрацией пирена в данном участ-



ке. Изменение плотности упаковки липидов сопровождается изменением так называемого «гидрофобного объема» мембраны, доступного для пирена, а, значит, и изменением активной концентрации пирена. Таким образом, степень эксимеризации пирена характеризует два взаимосвязанных, но неодинаково изменяющихся параметра—плотность упаковки углеводородных цепей липидов и гидрофобный объем бислоя [23, 25]. В эксперименте степень эксимеризации оценивают по соотношению пиков флуоресценции, присущих мономерной и эксимерной формам пирена. При сравнении графика Аррениуса для поляризации флуоресценции ДФГ и эксимеризации пирена в мембранах саркоплазматического ретикулума с графиком для ферментативной активности  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы, локализованной в этих мембранах (рис. 1), ока-

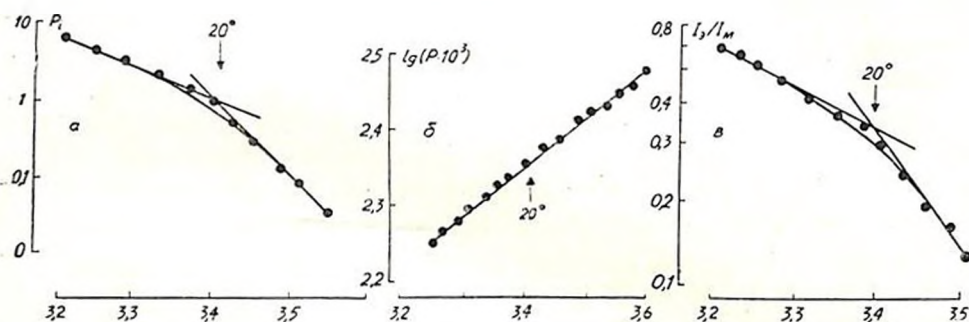


Рис. 1. График Аррениуса для гидролиза АТФ  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазой (а), поляризации флуоресценции дифенилгексатриена (б) и эксимеризации пирена, выражаемой соотношением флуоресценции эксимерной и мономерной форм ( $I_e/I_m$ ) (в) в мембранах саркоплазматического ретикулума. По оси абсцисс— $1/T \cdot 10^{-3}$ , по оси ординат— $v_0$ ,  $\mu\text{моль} / \text{мг белка} / \text{мин}$ . Подробности проведения экспериментов опубликованы ранее [41, 44, 50]

залось, что последний похож на график, описывающий температурную активность эксимеризации пирена: оба процесса зависят от температуры нелинейно, и на обоих графиках обнаруживается перегиб в одной и той же (в пределах точности измерения) области температур (20°). В то же время, зависимость поляризации флуоресценции ДФГ в координатах Аррениуса была строго линейной, что согласуется с литературными данными [18]. Поскольку последняя величина характеризует плотность упаковки углеводородных цепей в бислое, можно заключить, что в исследуемом интервале температур (10—40°) не происходило критического изменения состояния мембранных липидов.

Поскольку графики, описывающие температурную зависимость поляризации флуоресценции ДФГ и эксимеризации пирена, различаются, вероятно, появление перегиба на графике Аррениуса для реакции эксимеризации пирена связано с изменением не плотности упаковки углеводородных цепей, а другого параметра, влияющего на степень эксимеризации,—гидрофобного объема бислоя. Сходство графиков Аррениуса для параметров эксимеризации пирена и для активности фермента также свидетельствует о корреляции между изменениями фер-

ментативной активности  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы и гидрофобного объема липидного бислоя, что согласуется с полученными ранее данными о влиянии толщины мембраны и площади гидрофобных контактов фермента с липидным окружением на его активность [13].

Зависимость ферментативной активности мембранных белков от состояния (упорядоченности) липидного бислоя продемонстрирована и на другой понтранспортирующей системе— $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазе. Эта проблема была обсуждена нами ранее [19]. График Аррениуса для активности  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы аналогичен таковому для  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы (рис. 1, а). Изучение состояния липидов в препаратах  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы с использованием различных физических методов показало, что имеется корреляция между графиками Аррениуса для ферментативной активности и для параметров, характеризующих состояние бислоя. Необходимо отметить, что для препаратов  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы изменение состояния бислоя при температуре  $20^\circ$  регистрируется с использованием двух флуоресцентных методов, примененных нами и для исследования  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы саркоплазматического ретикулума—поляризации флуоресценции ДФГ и степени эксимеризации пирена. По-видимому, в плазматической мембране, в отличие от мембраны ретикулума, в области  $20^\circ$  одновременно изменяется как гидрофобный объем, так и плотность упаковки липидов в бислое. Более того, различные воздействия, изменяющие плотность упаковки липидов, аналогичным образом изменяли и графики Аррениуса как для ферментативной активности, так и для параметров, характеризующих физическое состояние бислоя.

Важным фактором, регулирующим плотность упаковки липидов в бислое, является содержание в нем холестерина, изменение концентрации которого приводит к изменению плотности упаковки липидов, что, в свою очередь, может отразиться на активности встроенных в мембрану ферментов. Удобным объектом для изучения этих взаимоотношений являются эритроциты. В норме содержание холестерина в мембране эритроцитов колеблется, причём обнаруживается корреляция между активностью  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы эритроцитарных мембран и содержанием в них холестерина: чем выше количество холестерина и, соответственно, выше микровязкость бислоя, тем ниже ферментативная активность [26]. Исследование больных атеросклерозом показало, что такая корреляция характерна и для эритроцитов пациентов с разной тяжестью заболевания. Мембрана эритроцитов контактирует с липопротеидами крови, являющимися переносчиками холестерина. Липопротеиды низкой плотности встраиваются в мембраны, а липопротеиды высокой плотности извлекают его оттуда. Таким образом, содержание холестерина в мембране эритроцитов определяется как его содержанием в крови, так и соотношением в ней указанных липопротеидов. Удалось создать модель зависимости активности  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы от состояния мембраны, инкубируя эритроциты в среде с липопротеидами низкой, а затем высокой плотности. В первом случае имело место ингибирование ферментативной активности, которое



почти полностью устранялось после обработки эритроцитов липопротендами высокой плотности (рис. 2). Аналогичные эксперименты были поставлены и с  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазой саркоплазматического ретикулула: увеличение количества холестерина в мембране вызывало пропорциональное снижение активности этого фермента [28].

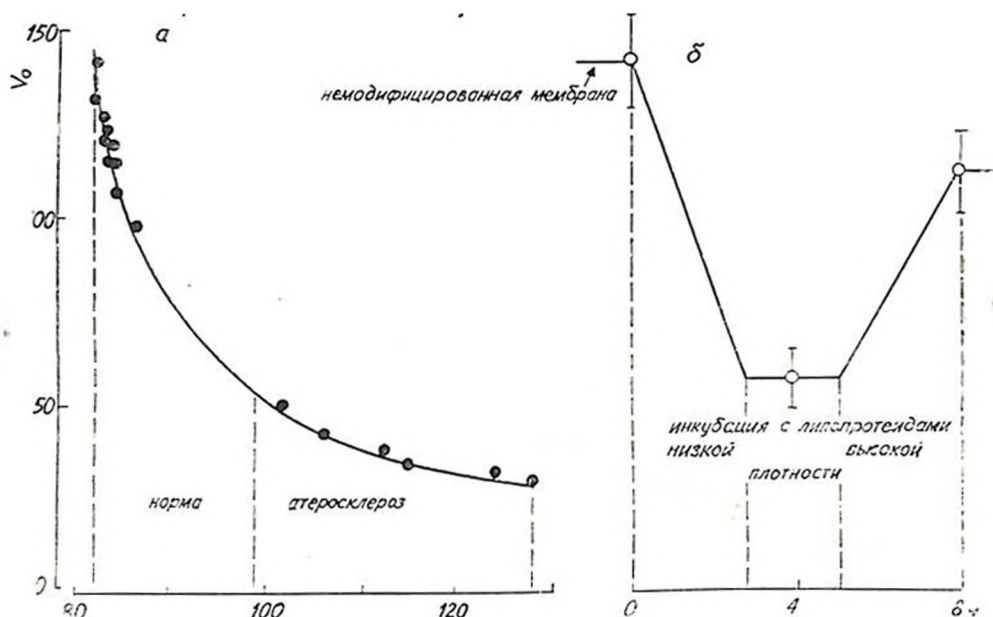


Рис. 2. Зависимость активности  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы эритроцитов от содержания холестерина в мембранах [26] (мкмоль  $\text{P}_i$ /мг белка/ч.  $10^{-2}$ , по оси ординат). а—корреляция между удельной активностью и соотношением холестерин/фосфолипиды (по оси абсцисс мкг/мг) в эритроцитах пациентов с разной степенью выраженности атеросклероза. б—уровень активности  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы в нормальных эритроцитах, после их инкубации с липопротендами низкой плотности и последующей инкубации обработанных таким образом эритроцитов с липопротендами высокой плотности: по оси абсцисс—время инкубации эритроцитов с липопротендами, проводимой перед определением активности фермента

Таким образом, изменение, по крайней мере, двух параметров, характеризующих бислой—его структурной упорядоченности (микровязкости) и гидрофобного объема, может влиять на активность мембранных ферментов. Существует два способа, с помощью которых может осуществляться такое регуляторное влияние. Во-первых, изменение плотности упаковки липидного бислоя может сказаться на собственной подвижности молекулы белка. Во-вторых, что не исключает первый способ регуляции, многие мембранные белки образуют олигомерные комплексы, и изменение состояния липидной фазы, по-видимому, отражается на характере межбелковых взаимодействий в них.

Данные о формировании олигомерных комплексов транспортных АТФаз получены с использованием различных методов (некоторые из них представлены в таблице). Однако физиологическое значение олиго-

меризации пока не выяснено. Первоначально были высказаны соображения, что ионные насосы способны осуществлять транспортную функцию лишь в олигомерном состоянии [19, 29]. Однако в настоящее время появились данные о том, что мономер  $\text{Ca}^{2+}$ -насоса также может транспортировать ионы [30]. Предполагалось также, что в олиго-

Таблица

Доказательства олигомерной организации транспортных АТРАЗ

| Способ определения функционально активной единицы | Обнаруженный феномен                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Интерпретация                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Ссылки               |
|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| Метод молекулярной мишени                         | Mg $\text{Ca}^{2+}$ -АТРАЗы вдвое превышают её размеры, определённые методом электрофореза в присутствии додецилсульфата; то же обнаружено для $\text{Na}^{+}$ , $\text{K}^{+}$ -АТРАЗы                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | В мембране транспортных АТРАЗы образуют димеры                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | [32]<br>[19]         |
| Электронно-микроскопический анализ                | $\text{Ca}^{2+}$ -АТРАза в мембране образует глобулы, размер которых в 2—4 раза превышает Mg индивидуальной молекулы; то же обнаружено для $\text{Na}^{+}$ , $\text{K}^{+}$ -АТРАЗы                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Молекулы транспортных АТРАЗ образуют в мембране олигомерные ансамбли                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | [19, 29,<br>32—36]   |
| Индуктивно-резонансный межбелковый перенос        | Молекулы $\text{Ca}^{2+}$ -АТРАЗы, меченные флуорофорами, составляющими донорно-акцепторную пару, при реконструкции в липосомы демонстрируют способность к резонансной миграции энергии                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | При реконструкции молекулы АТРАЗы спонтанно ассоциируют в олигомерные ансамбли                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | [37]                 |
| Использование сшивающих агентов                   | Образование межбелковых сшивок в мембранном препарате $\text{Na}^{+}$ , $\text{K}^{+}$ -АТРАЗы почек зависит от уровня их фосфорилирования                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | $\text{Na}^{+}$ , $\text{K}^{+}$ -АТРАза является тетрамером с функционально неравноценными протомерами                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | [38]                 |
| Кинетические исследования                         | <p>по АТР для <math>\text{Na}^{+}</math>, <math>\text{K}^{+}</math>-АТРАЗы головного мозга в оптимальных условиях равен 3,1—3,6, а по ИТР, GTP, UTP-1; количество участков связывания <math>\text{Na}^{+}</math>, <math>\text{K}^{+}</math>-АТРАЗой почек разных лигандов (АТР уабаина, ванадата) вчетверо отличается от количества центров фосфорилирования фермента</p> <p>Ингибирование <math>\text{Ca}^{2+}</math>-АТРАЗы саркоплазматического ретикулаума реагентами на <math>-\text{COOH}</math> и <math>-\text{SH}</math> группы осуществляется кооперативно, так что <math>K_i</math> в 2—4 и более раз превышает величину константы модификации соответствующих групп фермента</p> | <p><math>\text{Na}^{+}</math>, <math>\text{K}^{+}</math>-АТРАза головного мозга функционирует как тетрамер при гидролизе АТР; при использовании других субстратов протомеры комплекса работают независимо; <math>\text{Na}^{+}</math>, <math>\text{K}^{+}</math>-АТРАза почек представляет собой олигомер, содержащий 4 функционально различающихся протомера</p> <p>При взаимодействии с ингибиторами <math>\text{Ca}^{2+}</math>-АТРАза выступает как олигомер, состоящий из 2—4 и более протомеров</p> | [19]<br>[39]<br>[34] |

мерном состоянии ионные насосы более устойчивы по отношению к температурным и другим внешним воздействиям. Но проведённые недавно эксперименты показали, что увеличение содержания липидов в мембране со встроенной в неё  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРАЗой, приводившее к диссе-



инации олигомерных комплексов, напротив, повышало термостабильность этого фермента [31]. Скорее всего, как в случае с водорастворимыми ферментами, образование олигомеров необходимо для более тонкой регуляции ферментативной активности транспортных АТФаз. В связи с этим можно выяснить, какие факторы влияют на взаимодействие белков в олигомерном комплексе и какие параметры в работе ионных насосов затрагиваются при этих изменениях.

Однако прежде мы вернёмся к вопросу, на что влияет изменение состояния липидной фазы: на свойства (подвижность) каждой белковой субъединицы или на их взаимодействие? В настоящей ситуации, когда практически нет данных о функциональном значении олигомерной конструкции транспортных АТФаз, последний вопрос требует экспериментальной проверки. Мы попытались провести её с использованием  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы саркоплазматического ретикулума, измеряя вращательную подвижность этого фермента, меченого эритрозином или N-3-пиренилмаленимидом [40, 41]. Эксперименты были проведены совместно с сотрудниками Лондонского университета С. Restall, Р. Quinn и Ch. Stubbs.

При использовании  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы, меченой N-3-пиренилмаленимидом, измеряли поляризацию флуоресценции, характеризующую вращательную подвижность молекулы (или той её части, к которой прикреплена метка) в диапазоне  $10^6 \text{ с}^{-1}$ . Оказалось, что в широком интервале температур (от 8 до  $42^\circ$ ) существенных изменений этот параметр не претерпевает (рис. 3, а). Однако в области  $15\text{--}35^\circ$  можно было заметить слабое, но повторявшееся от эксперимента к эксперименту снижение поляризации флуоресценции. Предполагая, что этот факт отражает определенные структурные перестройки белка, вызванные изменением температуры, мы обратились к методу флэш-фотолиза, позволяющему определить вращательную подвижность белка в диапазоне  $10^5\text{--}10^3 \text{ с}^{-1}$  (особенности метода флэш-фотолиза, разобранные в лаборатории D. Chapman, подробно описаны ранее [40]). В этой серии экспериментов была измерена быстрая компонента времени корреляции ( $\tau_1$ ), характеризующая подвижность молекулы в микросекундной временной шкале. В этих опытах наблюдается существенное изменение подвижности белка в области температур  $15\text{--}35^\circ$ , что можно объяснить изменением как подвижности мономера  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы, так и четвертичной структуры фермента (переходом из олигомерного в мономерное или другое менее ассоциированное состояние) (рис. 3, б).

В экспериментах с  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазой мы использовали другой подход. Известно, что протомер этого фермента состоит минимум из двух субъединиц:  $\alpha$ -субъединицы с  $M_r$  100 кД, имеющей АТФ-связывающий центр, и  $\beta$ -субъединицы—гликопротеида с  $M_r \sim 45$  кД. Эксперименты последних лет (в частности, опыты со сшивающими агентами) свидетельствовали, что  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза образует и более сложные олигомерные комплексы ( $\alpha_2\beta_2$ ) [42]. Определяя зависимость  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазной активности от концентрации АТФ при различных

температурах и рассчитывая величину  $\rho$ , мы обнаружили, что с понижением температуры величина этого коэффициента уменьшалась с 3,4 до 1,0 [19]. Поскольку каждая  $\alpha$ -субъединица содержит только один АТР-связывающий центр, величина  $\rho$ , равная 3,4, может свидетельствовать о взаимодействии в процессе гидролиза АТР 4  $\alpha$ -субъединиц, что соответствует (при температурах выше 20°) структуре  $\alpha_4\beta_2$ . При

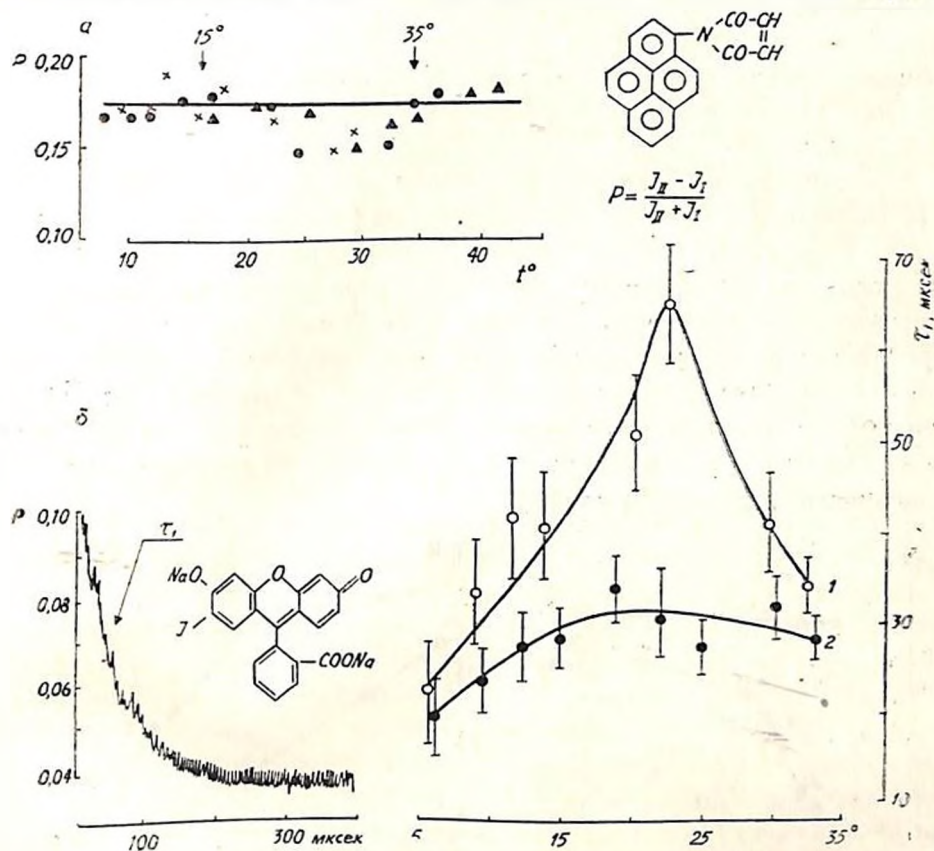


Рис. 3. Определение вращательной подвижности  $Ca^{2+}$ -АТФазы саркоплазматического ретикулума разными способами. а — измерение поляризации флуоресценции ( $P$ ) препаратов,  $Ca^{2+}$ -АТФазы которых ковалентно помечена N-3-пиренилмаленимидом (приведена также структура метки и формула расчета  $P$ ); условия экспериментов опубликованы ранее [44]. б — измерение поляризации (анизотропии) флуоресценции эритрозиновой метки, ковалентно связанной с  $Ca^{2+}$ -АТФазой тех же препаратов ретикулума: пример записи одной кривой, полученной методом флэш-фотолиза, и измерение величины  $\tau_1$  при разных температурах в контроле (1) и в присутствии 2 мМ АТР (2). Величины  $\tau_1$  рассчитаны из экспериментальных кривых с помощью машинной обработки [40]

температуре ниже 20° величина  $\rho$  близка к 1, что свидетельствует об отсутствии взаимодействия между протомерами. Необходимо отметить, что резкое изменение величины  $\rho$  наблюдается в области 20°, то есть при той температуре, которая резко сказывается на плотности упаковки липидов в бислой. Эти данные свидетельствуют о том, что состоя-

ние бислоя может регулировать взаимодействия между протомерами в олигомерном комплексе.

Одновременно с этим было замечено, что реакция гидролиза АТФ  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазой нелинейна во времени. Через 1,5—3 мин после начала реакции скорость уменьшалась и сохраняла постоянное значение на протяжении последующих 15—20 мин. График Аррениуса для начальной фазы реакции имел перегиб при 20°, причину которого мы обсуждали выше. Вторая фаза гидролиза характеризуется линейным графиком Аррениуса [43]. Авторы, обнаружившие это явление, предположили, что существуют две изоформы фермента с различной величиной  $U.A.$

Аналогичная особенность характерна и для  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы. Скорость гидролиза АТФ этим ферментом изменяется во времени так же, как и в случае с  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазой. График Аррениуса для гидролиза АТФ (как и для аккумуляции  $\text{Ca}^{2+}$ ) в начальной фазе реакции имеет типичный вид, обсужденный ранее (рис. 1, а). Температурная зависимость второй фазы реакции в координатах Аррениуса была линейной (рис. 4, б). Нелинейность гидролитической и  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортирующей активностей во времени проявлялась лишь в температурном интервале 15—35°, то есть в той области, в которой было обнаружено изменение подвижности  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы [44].

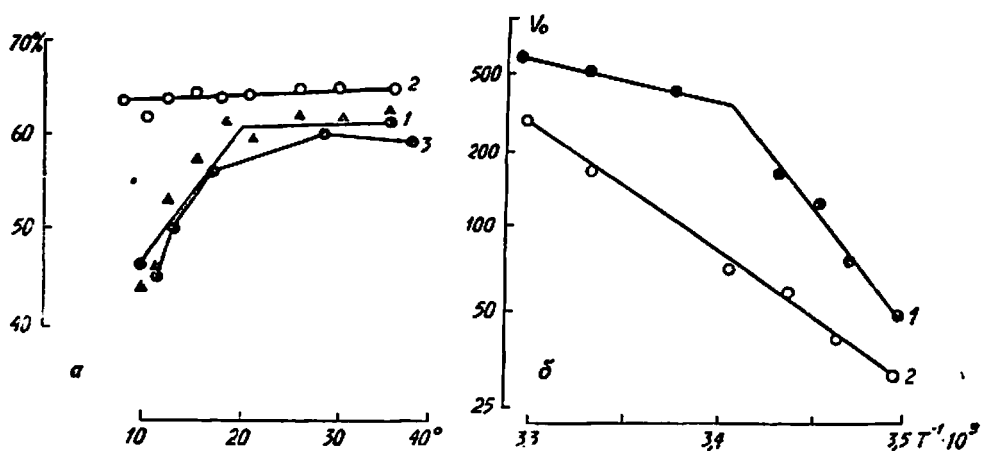


Рис. 4. Температурная зависимость тушения флуоресценции триптофанильных радикалов  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы ретикулума (а) в контроле (1) и в присутствии 1,5 мМ АТФ (2) или ГТФ (3) и активности  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы (в мкмоль  $\text{Ca}^{2+}$ /мг белка/мин, по оси ординат) тех же препаратов (б), измеренной по начальной скорости до и после преннукубации фермента с 1,5 мМ АТФ (-1- и -2- соответственно)

Эти факты позволили нам предположить, что после взаимодействия  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы с АТФ происходило медленное изменение конформации фермента, причем в новом конформационном состоянии фермент, по-видимому, не обладал чувствительностью к изменению фазового состояния бислоя. Нельзя исключить, что это изменение конформации пред-

ставляет собой переход фермента в иное олигомерное состояние, происходящее под влиянием АТР.

Мы обратили внимание на тот факт, что перегибы на кривых, описывающих нарастание количества продукта ферментативной реакции во времени (как для  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРазы, так и для  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРазы) появляются лишь в том случае, если в качестве субстрата используют АТР в миллимолярных концентрациях. Другие субстраты транспортных АТРАЗ—GTP, ITP, UTP, как и АТР в низких концентрациях,—гидролизуются линейно.

Эти данные вновь обращают внимание на значение АТР, как модификатора транспортных АТРАЗ, впервые отмеченное в конце 60-х годов для  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРазы J. Skou, который сравнивал гидролиз двух субстратов: АТР и ацетилфосфата. Оба вещества представляют собой макроэргические соединения, способные обеспечивать образование промежуточного фосфорилированного производного  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРазы. Однако активный транспорт ионов был обнаружен лишь в том случае, когда фермент использовал в качестве субстрата АТР, ацетилфосфат же гидролизовался «вхолостую». Skou [45] заключил, что АТР является не только субстратом  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРазы, но и модифицирует фермент, причем другие соединения, гидролизующиеся  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРАЗой, модифицирующим действием не обладают.

Позднее было установлено, что гидролиз АТР транспортными АТРАзами не описывается уравнениями Михаэлиса-Ментен, в то время как UTP, GTP, ITP и ацетилфосфат гидролизуются теми же ферментами в соответствии с классической «гиперболической» кинетикой [19, 34, 46]. Это подтверждало, что АТР проявляет дополнительное, модифицирующее действие. Однако как осуществляется этот эффект АТР—путем непосредственного влияния нуклеотида на белок или посредством его воздействия на липидный бислой мембраны—оставалось неясным. Выбрать одну из этих возможностей мы могли лишь после сравнительного исследования действия АТР на липидный бислой и на конформацию фермента (например,  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРазы).

Для этой работы были использованы различные флуоресцентные методы: поляризация флуоресценции ДФГ, эксимеризация пирена, флуоресценция дансильного радикала, ковалентно связанного с фосфатидилэтаноламинном бислоем, флуоресценция пиренильного радикала, ковалентно связанного с  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРАЗой, а также собственная флуоресценция  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРазы. Следует отметить, что различные области мембраны характеризовались неодинаковым температурным поведением. Если в гидрофобной части бислоя вызванные температурой перестройки происходили при  $20^\circ$ , то поверхности бислоя и молекулы  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРазы характеризовались наличием двух критических температур. 15 и  $35^\circ$ . В гидрофобной области белка мы не обнаружили резких конформационных перестроек в интервале температур  $8\text{--}40^\circ$  [47].

Во всех перечисленных случаях АТР не оказывал влияния на термoinдуцированные перестройки мембраны. Мы предположили, что



АТР изменяет характер белок-липидных взаимодействий, вследствие чего, невзирая на изменения, происходящие в бислое, не происходят конформационные сдвиги белка, сказывающиеся на активности ферментативного белка, то есть он перестает реагировать на изменения, происходящие в гидрофобной области липидного бислоя.

Для подтверждения этой концепции мы использовали метод индуктивно-резонансного переноса энергии с остатков триптофана, находящихся в гидрофобной части молекулы  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРазы, на пирен, локализованный между углеводородными цепями липидов [41]. Оказалось, что эффективность переноса энергии, измеряемая по тушению собственной флуоресценции белка (донора энергии) при добавлении к мембранам ретикулума пирена (акцептора энергии) почти не изменялась при снижении температуры от 40 до 20° (рис. 4, а). Дальнейшее понижение температуры сопровождалось уменьшением эффективности переноса. Так, если в интервале температур от 40 до 20° интенсивность флуоресценции белка была снижена на 60—65%, то при температуре 18° эффективность переноса составляла лишь 40%, а при 10—12°—25—30%. Резкое снижение эффективности переноса энергии при температурах ниже 20° может быть обусловлено уменьшением доступности для молекул пирена триптофанилов белка вследствие образования в этих условиях тесных белковых ассоциатов [23, 33, 41, 47].

В присутствии АТР в высоких концентрациях эффективность тушения собственной флуоресценции  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРазы в области высоких температур не изменялась. Однако резкого снижения эффективности переноса, наблюдаемого в среде без АТР при температурах ниже 20°, в этом случае не происходило (рис. 4, а). Добавление в кювету 1,5—3 мМ АТР приводило к тому, что при температурах от 8 до 40° степень тушения флуоресценции составляла 60—70% [41]. Низкие концентрации АТР (10—100 мкМ) или 1,5—2,5 мМ GTP такого действия не оказывали.

Снижение эффективности переноса энергии в среде без АТР при низких температурах свидетельствует об уменьшении белок-липидных контактов в мембране, причем АТР препятствует такому изменению.

В независимых экспериментах по изучению конформации  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРазы с использованием SH-реагентов в нашей лаборатории было установлено, что АТР менял конформацию фермента, по-видимому, изменяя его четвертичную структуру [34].

Суммируя вышеизложенное, мы можем заключить, что действие АТР направлено на изменение конформации транспортных АТРАЗ (возможно, их четвертичной структуры), что приводит к изменению характера белок-липидных взаимодействий и освобождает фермент от контроля со стороны липидной части мембраны.

Подтверждением этого вывода являются эксперименты, в которых определяли температурную зависимость  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРазы после обработки препарата фосфолипазой С. Такая обработка приводила к выпрямлению температурной зависимости в координатах Аррениуса,

но не устраняла индуцируемого температурой изменения состояния бислоя (график Аррениуса для параметра, характеризующего подвижность углеводородных цепей бислоя, сохранял перегиб). Другими словами, обработка мембран фосфолипазой С не влияла на характер ответа липидной фазы на изменение температуры, но приводила к нарушению белок-липидных взаимодействий таким образом, что  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРаза переставала на них реагировать [48]. Этот факт еще раз подтверждает, что конформация белка изменяется не непосредственно под влиянием температуры, а в результате изменения состояния липидной фазы. Таким образом, олигомерная организация ионных насосов предоставляет возможность для регуляции ферментативной активности за счет изменения плотности упаковки липидов в мембране или гидрофобного объема липидного окружения.

В заключение следует сказать, что рассмотрение межбелковых взаимодействий в качестве механизма регуляции работы мембранных ферментов не ограничивает роль липидов мембраны лишь созданием определенной специальной среды, в которой функционирует фермент, а отводит им решающее место в обеспечении приспособительной реакции клетки [49].

Авторы признательны акад. С. Е. Северину (МГУ) за плодотворную дискуссию, проф. D. H. Chapman (Лондонский университет) за предоставленную возможность проведения ряда экспериментов в его лаборатории, а также коллегам С. Restall, Ch. Stubbs и P. Quinn, с которыми были проведены и обсуждены эти эксперименты.

## MEMBRANE LIPIDS AS REGULATORS OF PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS

BOLDYREV A. A., LOPINA O. D., PROKOPIEVA V. D.

Chair of Biochemistry, I. V. Lomonosov State University, Moscow

Paper reviews the means by which membrane lipid phase may regulate the work of  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  pumps. The categories of "microviscosity" and "hydrophobic volume" are defined. It's demonstrated that these two categories are interconnected, temperature is of polar effect on them and they are essential for the regulation of protein-protein interactions in the oligomeric conformations of transport ATPases. Evidence is brought that ATP abolishes the control of lipid phase on the operation of transport ATPases.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Chapman D., Byrne P. Proc. Roy. Soc., Ser. A., v. 290, p. 115—142, 1966.
2. Singer S., Nicholson G. Science, v. 175, p. 720—731, 1972.
3. Helenius A., Simons K. Biochim. et biophys. acta, v. 415, p. 29—79, 1975.
4. Jost P., Griffith O., Capaldi R., Vanderkooi G. Biochim. et biophys. acta, v. 311, p. 141—152, 1973.

5. Dixon J. F., Hokin L. E. Arch. Biochem. and Biophys., v. 163, p. 749—758, 1974.
6. Mac Lennan D. H. J. Biol. Chem., v. 245, p. 4508—4518, 1970.
7. Jost P., Griffith O.—In: Biomol. Struct. and Funct. (ed. by P. Agris), p. 25—54, Acad. Press., N. Y.—S. F.—L., 1978.
8. Дергунов А. Д., Капрельянц А. С., Кабишев А. А., Симакова Н. М., Молчанов М. И., Островский Д. Н. Биохимия, т. 47, с. 296—304, 1982.
9. Roelofsen B. Life Sci., v. 29, p. 2235—2247, 1981.
10. Warren G., Metcalfe J. Biochem. Soc. Trans., v. 5, p. 517—520, 1977.
11. Melgunov V. I., Akimova E. I. FEBS Lett., v. 121, p. 235—238, 1980.
12. Chapman D. H.—In: Biological Membranes, v. 4, p. 179—230, Acad. Press., L. C. A., 1982.
13. Johansson A., Keightley C., Smith G., Richards Ch., Heskeith T., Metcalfe I. J. Biol. Chem., v. 256, p. 1643—1650, 1981.
14. Hidalgo C., Thomas D., Ikemoto N. J. Biol. Chem., v. 253, p. 6879—6887, 1978.
15. Inesi G., Millman M., Eletre S. I. Molecular Biol., v. 81, p. 483—504, 1973.
16. Davis D. G., Inesi G., Gulik-Krzyawicki T. Biochemistry, v. 15, p. 1271—1276, 1976.
17. Andersen J. P., LeMaire M., Moller J. V. Biochim. et biophys. acta, v. 603, p. 84—100, 1980.
18. Madden T. D., Quinn P. J. FEBS Lett., v. 107, p. 110—112, 1979.
19. Болдырев А. А.—В кн.: Итоги науки и техники, сер. Биологическая химия, т. 17, с. 75—144, 1982.
20. Yoshida S., Orit Y., Kawato S., Ikegami A. J. Biochem., v. 86, p. 1443—1450, 1979.
21. Kawato S., Ikegami A., Yoshida S., Orit Y. Biochemistry, v. 19, p. 1598—1603, 1980.
22. Kawato S., Yoshida S., Orit Y., Ikegami A., Kinoshita K. Jr., Biochim. et biophys. acta, v. 634, p. 85—92, 1981.
23. Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран, М., Наука, 1980.
24. Kinoshita K., Kawato S., Ikegami A., Yoshida S., Orit Y. Biochim. et biophys. acta, v. 647, p. 7—17, 1981.
25. Vanderkooi J. M., Calles J. B. Biochemistry, v. 13, p. 4000—4006, 1974.
26. Ходжакулиев Б. Г. Активность  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы в мембранах эритроцитов у больных ишемической болезнью сердца с наличием коронарного атеросклероза, канд. дис., М., 1980.
27. Dean W. L., Tanford C. Biochemistry, v. 17, p. 1683—1690, 1978.
28. Madden T. D., Chapman D., Quinn P. J. Nature, v. 279, p. 538—541; 1979.
29. Klingenberg M. Nature, v. 290, p. 449—454, 1981.
30. Møller J. V., Andersen J. P., Jørgensen P. L. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., v. 363, p. 462—463, 1982.
31. Щербакова Н. С., Ритов В. Б., Тарховецкий Ю. С., Козлов Ю. П. Биохимия, т. 45, с. 1503—1508, 1980.
32. Møller J. V., Andersen J. P., Le Meire M.—Mol. and Cell. Biochem., v. 42, p. 83—107, 1982.
33. Rice D. M., Meadows M. D., Scheinman A. O., Goni F. M., Gomes-Fernandez J., J. C., Moscarello M. A., Chapman D., Oldfield B. Biochemistry, v. 18, p. 5933—5903, 1979.
34. Рубцов А. М. АТФ как субстрат и регулятор Са-АТФазы саркоплазматического ретикулума, канд. дис., М., 1982.
35. Jørgensen P. L. Biochim. et biophys. acta, v. 694, p. 27—68, 1982.
36. Джанджугазян К. Н. Структурно-функциональные исследования  $\text{Na}$ ,  $\text{K}$ -АТФазы из почек свиньи, автореф. канд. дисс., М., 1982.
37. Vanderkooi J., Jeronimas A., Nakamura H., Martonosi A. Biochemistry, v. 16, p. 1262—1267, 1977.

38. Askari A., Huang W. H., Anticau J. M. *Biochemistry*, v. 19, p. 1132—1140, 1980.
39. Hansen O., Jensen J., Norbi J., Ottolenghi P. *Nature*, v. 280, p. 410—412, 1979.
40. Restall C., Arrondo L., Elliot D., Jaskowska A., Weber W., Chapman D. *Biochim. et biophys. acta*, v. 670, p. 433—440, 1981.
41. Boldyrev A. A., Lopina O. D., Prokopjeva V. D., Stubbs Ch., Quinn P. *Biochem. Int.*, v. 6, p. 297—305, 1983.
42. Winter C. G., Moss A. J.—In: Na, K-ATPase. Structure and kinetics (ed. by Skou J. C., Norby J. G.), p. 25—32, L., N.-Y. San Francisco, 1978.
43. Grisar T., Franck G., Schoffentels E. *Neurochim. Int.*, v. 2, p. 311—320, 1980.
44. Прокопьева В. Д. Оценка роли различных областей мембраны в обеспечении модифицирующего действия АТФ на Са-АТФазу саркоплазматического ретикула, канд. дисс., М., 1982.
45. Skou J. Ch. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 242, p. 168—184, 1974.
46. Boldyrev A. A., Svinukhova I. A. *Biochim. et biophys. acta*, v. 707, p. 167—170, 1982.
47. Прокопьева В. Д., Лопина О. Д., Болдырев А. А. *Биофизика*, т. 28, с. 40—44, 1983.
48. Boldyrev A. A. *Studia biophys.*, v. 84, p. 153—160, 1981.
49. Кренс Е. М. Липиды клеточных мембран, Л., 1981.

Поступила 11. X. 1983:



## ИГОРЬ АЛЕКСАНДРОВИЧ СЫТИНСКИЙ

(1926—1984)

Советская нейрхимия понесла большую утрату—в расцвете творческих сил скончался доктор биологических наук, профессор Игорь Александрович Сытинский.

Проф. Сытинский И. А. одним из первых в Советском Союзе начал изучение функций важнейшего нейромедиатора—гамма-аминомасляной кислоты; результаты многолетних исследований в этом направлении им были обобщены в трех фундаментальных монографиях. Он был пионером в разработке проблемы нейрохимических основ алкоголизма и много сил отдал борьбе на научной основе с этим тяжелым социальным злом. Проф. Сытинский И. А. является автором трех книг, посвященных проблеме нейрхимии алкоголизма. Последние годы жизни он посвятил биохимии спорта, активно включившись в разработку современных аспектов этой области.

Глубокая эрудиция и творческие способностинискали Игорю Александровичу заслуженный авторитет среди отечественных и зарубежных нейрхимиков. Он был членом многих советских и международных обществ и организаций, а также ряда редколлегий зарубежных научных журналов.

Проф. Сытинским И. А. было опубликовано более 300 научных работ. Он был страстным популяризатором науки, автором 65 научно-популярных статей. Игорь Александрович был членом Научно-методического совета Ленинградского дома научно-технической пропаганды. Его пропагандистская работа отмечена почетной грамотой Всесоюзного общества «Знание».

Ему принадлежат 4 авторских свидетельства на изобретения и несколько рационализаторских предложений.

Под руководством проф. Сытинского И. А. были успешно выполнены докторская и 7 кандидатских диссертаций. Его перу принадлежит ряд учебных пособий, среди них—успешно использующиеся во Вьетнаме в Ханойском университете («Химия белка») и в Гвинее в Политехническом институте г. Конакри («Практикум по органической и биологической химии»). За постановку педагогического процесса в Ханойском университете проф. Сытинский И. А. был награжден Правительством ДРВ медалью «Дружба».

Игорь Александрович Сытинский был ветераном Отечественной войны, награжден 8 правительственными наградами.

Имя проф. Сытинского И. А. навсегда войдет в историю советской нейрхимии.

РЕДКОЛЛЕГИЯ

## ПЕРВЫЙ ВСЕСОЮЗНЫЙ СИМПОЗИУМ «НЕЙРОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ПАМЯТИ»

4—7 июня 1984 г. в г. Пушкино состоялся Всесоюзный симпозиум «Нейрохимические механизмы регуляции памяти». В нем приняли участие 254 специалиста, прибывших из 18 городов Советского Союза. Организаторами симпозиума являлись сотрудники Отдела проблем памяти Института биофизики АН СССР и пушкинское городское отделение Всесоюзного общества физиологов.

Было заслушано и обсуждено 78 устных и 52 стендовых докладов, большее число которых было представлено из Москвы, Пушкино, Ленинграда и Новосибирска. Тезисы докладов под редакцией *Е. А. Громовой* были изданы к началу работы симпозиума Отделом научно-технической информации Пушкинского научного центра биологических исследований АН СССР.

Работа симпозиума проходила по следующим направлениям: белки, пептиды и нуклеиновые кислоты в процессах регуляции обучения и памяти; взаимодействие нейромедиаторов в процессах памяти и обучения; ГАМК-ергические соединения и поведение; механизмы пластичности нейронов; фармакологические воздействия на память в норме и патологии.

Под руководством *Л. Х. Алликетси* (Тарту) и *Р. У. Островской* (Москва) была проведена дискуссия за круглым столом по вопросам ГАМК-ергической регуляции поведения, в ходе которой были рассмотрены вопросы соотношения медиаторного и метаболического эффектов ГАМК на поведение, соподчинение систем «ГАМК-бензодиазепины-опиаты», некоторые причины разнообразия поведенческих эффектов ГАМК и ее производных, методические подходы к выявлению ноотропного эффекта веществ и др.

В целом работа симпозиума продемонстрировала стремление ученых к интеграции функциональных, биомолекулярных и фармакологических подходов при изучении нейрохимических основ памяти. Отмечено, что главным результатом этой интеграции являлось признание важной роли генетического аппарата в механизмах приобретенной памяти, роли нейромедиаторов в процессах фиксации и воспроизведения следов памяти и возможности направленных влияний на эти процессы с помощью вмешательств в обмен нейромедиаторов.

В решении симпозиума были даны рекомендации в ходе дальнейших исследований сосредоточить внимание на следующих вопросах:

1) Изучение механизмов взаимодействия нейромедиаторов с нейропептидами мозгового и внемозгового происхождения в процессах формирования обучения животных.

2) Изучение биохимических механизмов активации генома нейронов различных структур мозга в процессах памяти, в частности изучение влияния нейромедиаторов на активность генома.

3) Исследование причин различий индивидуальной чувствительности животных и человека к действию ноотропов и механизмов их связи с активностью нейромедиаторных систем мозга.

4) Необходимость использования более широкого круга моделей обучения и памяти с различным эмоциональным знаком подкрепляющего раздражителя при изучении нейрохимических и фармакологических механизмов памяти.

Была отмечена целесообразность дальнейшего развития комплексных экспериментально-клинических исследований памяти, направленных на разработку методов ее улучшения в норме и патологии.

СЕМЕНОВА Т. П.

С. Х. ХАЙДАРЛИУ «Функциональная биохимия адаптации»,  
Кишинев, «Штиинца», 1984, 268 с.

Проблема адаптации животных организмов к изменяющимся условиям окружающей среды на протяжении последних десятилетий стала одной из актуальнейших биологических проблем. Это обусловлено интенсификацией и расширением сфер деятельности человека в условиях научно-технической революции и связанных с ней вопросов обслуживания новой техники, обеспечения продовольствием и охраны окружающей среды. Поскольку любая адаптивная физиологическая перестройка обеспечивается определенными биохимическими механизмами, без раскрытия сущности фундаментальных биохимических процессов невозможно решить основные задачи повышения адаптивных способностей организма человека и животных. Поэтому появление книги С. Х. Хайдарлиу, которая представляет собой первую попытку обобщить обширный материал собственных исследований и литературы по вопросам биохимических механизмов адаптации, следует считать весьма своевременным.

Книга состоит из 3-х частей. Первая посвящена обсуждению общих вопросов теории адаптации и взаимоотношений между адаптацией и стрессом. Во второй рассмотрены общие механизмы регуляции метаболизма в ходе адаптационных перестроек, в том числе нейрохимические основы адаптации. В наиболее обширной третьей части книги представлены данные о метаболизме различных классов соединений при индивидуальной адаптации. Среди них центральное место по праву занимают медиаторы. Автор впервые выделил в особую группу медиаторные механизмы и определил их место в процессах адаптации.

Нисколько не умаляя значения для адаптации таких процессов, как метаболизм белков, углеводов, нуклеиновых кислот и других химических соединений, автор подчеркивает, что среди них важнейшим следует признать метаболизм медиаторов. Именно они обеспечивают передачу информации о действующих на организм факторах внешней и внутренней среды, участвуют в формировании нейронных ансамблей, в которых эта информация анализируется, и организуют передачу управляющих сигналов клеткам, тканям и органам-мишеням. Таким образом, благодаря нервной системе формируются разнообразные соматомоторные, вегетативные и эндокринные реакции, определяющие адаптивное поведение индивидуума.

Рассматривая нейрохимические механизмы адаптации, автор отмечает, что нервная система, тонко реагируя на различные воздействия внешней и внутренней среды, в ходе реакций адаптации сама становится ареной разнообразных и подчас глубоких метаболических и структурно-функциональных изменений. Исключительно широкий диапазон адаптационных возможностей нервной системы обеспечивает ей, с одной стороны, высокую реактивность, а с другой—устойчивость к повреждениям. Осуществляя адаптивные функции управления, нервная система способна перестраивать функциональную организацию различных органов и организма в целом.

При анализе роли медиаторных механизмов в адаптации автор подробно остановился на вопросах о функциях медиаторов, их химической природе и возможных эффектах на разных уровнях организации нервной системы. Показана роль холинергической, моноаминергической, аминокислотергической и пептидергической систем в адаптации. На основании литературных и собственных экспериментальных данных автор пришел к заключению, что функциональное состояние синаптических аппаратов разных по природе медиаторных систем может иметь решающее значение в определении характера ответной реакции организма при действии экстремальных факторов.

Самостоятельный интерес представляют оригинальные данные автора об обмене и перераспределении воды между клеточными элементами нервной ткани и окружающей их нейропилем в ходе адаптационных преобразований.

Особого внимания заслуживают развиваемые автором представления о соотно-



шении специфического и неспецифического (стрессового) компонентов общей реакции организма в процессе адаптации. Он приходит к выводу о том, что нервная система обладает способностью выполнять как специфические, так и неспецифические функции. В выполнение неспецифических функций вовлекаются главным образом специализированные структуры—ретикулярная формация, гипоталамус и некоторые другие. В условиях действия на организм экстремальных факторов неспецифические функции могут выполнять многие структуры ЦНС, вовлекаемые в осуществление транснейрональной индукции синтеза адаптивных гормонов.

В заключительной главе книги рассмотрены способы повышения адаптивных способностей организма. Среди них автор выделяет те, в которых используются слабые раздражители, вызывающие возникновение в ЦНС изменений, способствующих благополучному преодолению более сильных нагрузок той же или иной природы. Повышение адаптивных способностей организма при действии стрессоров в раннем онтогенезе реализуется преимущественно за счет эффекта импринтирования (запечатлевания), в основе которого лежит установление связей также преимущественно на уровне ЦНС. Эффекты большинства фармакологических средств повышения адаптивных способностей организма также реализуются благодаря воздействию главным образом на функциональное состояние различных медиаторных систем мозга.

Книге присущи и некоторые недостатки. Слишком большое внимание уделено физиологическим механизмам адаптации, хотя, судя по названию книги, предполагается рассмотрение в основном биохимических механизмов. Наряду с главами, широко и обстоятельно описывающими метаболизм различных классов соединений при адаптации, имеется ряд глав, написанных довольно схематично.

В целом книга С. Х. Хайдарлиу является ценным пособием, содержащим обширные данные современной литературы и собственных экспериментов автора о биохимических механизмах такого сложного и многогранного явления, как адаптация.

ОТЕЛЛИН В. А.



ОСОБЕННОСТИ ДЕЙСТВИЯ СЕРОТОНИНА,  
МИКРОАППЛИЦИРОВАННОГО В ДОРЗАЛЬНЫЙ  
ГИППОКАМП, НА УСЛОВНЫЕ РЕФЛЕКСЫ АКТИВНОГО И  
ПАССИВНОГО ИЗБЕГАНИЯ

МЕЛИКОВ Э. М., ГАСАНОВ Г. Г., МОВСУМОВ Г. Д.

В экспериментах на 36 белых крысах-самцах изучали влияние серотонина (5-ОТ), микроаплицированного двусторонне в дорзальный гиппокамп (2 мкг в объеме 0,6—1 мкл) непосредственно перед тестированием, на сохранение и воспроизведение условного рефлекса активного (УРАИ) и пассивного (УРПИ) избегания.

УРАИ состоял в том, что животных обучали, подкрепляя болевыми ударами электрического тока (5 мА), на предъявление условного раздражителя (УР)—вспышки света—прыгать на «спасительную» платформу, находящуюся в камере. Выработку УРПИ осуществляли в установке, состоящей из двух отсеков: затемненного и освещенного «безопасного». Крыс, побуждаемых инстинктивной тягой к свету, обучали не заходить в незатемненный отсек нанесением на лапы болевого удара электрического тока 1,5—2 мА. Тестирование сохранения и воспроизведения УРАИ производили в режиме острого угашения, а УРПИ—через 25 ч после выработки.

Эксперименты показали, что микроапликация 5-ОТ в гиппокамп приводила к значительному облегчению угашения УРАИ. У контрольных животных, которым в гиппокамп микроаплицировался изотонический раствор NaCl, угашение УРАИ происходило после  $55 \pm 2,05$  предъявлений УР, а на фоне действия 5-ОТ—при предъявлении всего  $7,9 \pm 1,16$  световых стимулов ( $p < 0,01$ ). Было установлено, что 5-ОТ значительно увеличивал латентное время рефлекса и уменьшал число межсигнальных реакций.

При изучении влияния 5-ОТ, микроаплицированного в гиппокамп, на сохранение и воспроизведение УРПИ были получены совершенно противоположные эффекты. 5-ОТ увеличивал время нахождения животных в «безопасном» освещенном отсеке установки, которое составляло  $295 \pm 6,73$  с. Таким образом, микроапликация 5-ОТ в гиппо-

камп, с одной стороны, способствовала торможению воспроизведения УРАИ, с другой стороны, пролонгировала сохранение УРПИ.

Анализ литературных и собственных данных позволяет предположить, что неоднозначность эффектов 5-ОТ на УРАИ и УРПИ связана с участием 5-ОТ-ергической системы гиппокампа в воспроизведении следов условных подкрепляющих стимулов, пространственно-обстановочных раздражителей.

16 с., ил. 3, библиогр. 27

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

Поступила 26. VI 1984

Рукопись депонирована в ВИНТИ

## СОДЕРЖАНИЕ МОЗГОСПЕЦИФИЧЕСКОГО И ОБЩЕТКАНЕВОГО БЕЛКОВ В ЦЕРЕБРАЛЬНЫХ СТРУКТУРАХ КРЫС ПРИ ВЫРАБОТКЕ У НИХ УСЛОВНЫХ РЕФЛЕКСОВ НА ФОНЕ ВВЕДЕНИЯ ДИСУЛЬФИРАМА И ИПРАЗИДА

ШТИЛЬМАН Н. И., ГЕЦОВА В. М., ОРЛОВА Н. В.

С помощью аналитического иммуноэлектрофореза исследовали влияние фармакологического изменения уровней серотонина (5-ОТ) и норадреналина (НА) в головном мозгу на содержание мозгоспецифического ( $P_2$ ) и общетканевого ( $P_1$ ) белков в отдельных церебральных структурах обученных крыс. В качестве моделей обучения использовали выработку лабиринтного оборонительного условного рефлекса на фоне избытка 5-ОТ (после введения ипразида) и оборонительного условного рефлекса двустороннего избегания при дефиците НА (после инъекции дисульфирама).

Показано, что нарушения выработки рефлексов в большей степени коррелируют с изменениями  $P_1$ , а динамика закрепления и последующего сохранения навыка—с изменениями специфического для мозга  $P_2$ .

10 с., ил. 3, библиогр. 14

Институт клинической и экспериментальной  
медицины СО АМН СССР, г. Новосибирск

Поступила 28. V 1984

Институт высшей нервной деятельности  
и нейрофизиологии АН СССР, г. Москва

Рукопись депонирована в ВИНТИ 20.03.85. № 1984—85

## НОРАДРЕНЕРГИЧЕСКИЕ ВЛИЯНИЯ НА СОСТАВ ВОДНОРАСТВОРИМЫХ БЕЛКОВ ГИПОТАЛАМУСА

ХАНБАБЯН М. В., НАЗАРЯН О. А., АРУТЮНЯН А. М.

С помощью электрофореза в ПААГ исследовали влияние электрической стимуляции норадренергической системы и адренергических, фармакологических веществ на состав воднорастворимых белков гипоталамуса (ГП).

Опыты были проведены на крысах линии Вистар массой 200—220 г под уретановым наркозом (1—1,5 г/кг веса). Активацию норадренергических волокон проводили электрической стимуляцией ГП в течение 7 мин (частота 20 Гц, напряжение 6В, длительность импульсов 0,5 мс). Электрод для стимуляции вводили в ГП при помощи стереотаксического прибора согласно координатам этого ядра.

В течение 2 дней крысам внутрибрюшинно вводили  $\beta$ -адреноблокатор обзидан,  $\alpha$ -адреноблокатор фентоламин и резерпин, вызывающий снижение норадреналина в мозгу. Через 23 ч животных декапировали, выделяли ГП, водный экстракт которого после центрифугирования в эфире (2500g, 55 мин) подвергали электрофорезу в ПААГ.

Было установлено, что электрическая стимуляция ГП и другие норадренергические воздействия (истощение норадреналина резерпином, блокада  $\alpha$ - и  $\beta$ -рецепторов), приводили к заметным и систематическим изменениям некоторых белковых фракций, а в отдельных случаях к появлению новой фракции.

Таким образом, результаты проведенных исследований позволяют полагать, что в гипоталамусе имеется ряд адренореактивных белков, и норадренергические проекции, возникающие в ГП (*Locus coeruleus*), участвуют в регуляции содержания состава некоторых белков гипоталамуса.

Особый интерес представляет фракция 5, содержание которой изменялось при всех адренергических воздействиях. При длительной стимуляции ГП, ведущей к высвобождению норадреналина из окончаний норадренергических нейронов, ее количество в ГП уменьшалось. Адреноблокаторы и резерпин также вызывали значительное уменьшение содержания этой фракции, которая, вероятно, играет важную роль в адренергической передаче.

10 с., ил. 3. библиогр. 12  
Институт экспериментальной  
биологии АН АрмССР, Ереван

Поступила 14. VIII 1984

Рукопись депонирована в ВИННИТИ

# ГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ КОРТИКАЛЬНЫХ ОБРАЗОВАНИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ БЫСТРОМ И МЕДЛЕННОМ ОБУЧЕНИИ

ЛОСЕВА Е. В., ЧЕРНЫШЕВСКАЯ И. А.

Гистохимическим методом Карновского-Руте определяли бутирилхолинэстеразную (БХЭ) активность в кровеносных сосудах и в самой ткани мозга в коре больших полушарий (двигательной, сенсорной и полях 24 и 29 лимбической) областей новой коры, а также в фимбрии и полях CA1 и CA2 зубчатой фасции гиппокампа. Фермент исследовали при выработке у крыс условного рефлекса двустороннего избегания (УРДИ) и несочетанном предъявлении условных и безусловных стимулов. У 20 животных вырабатывали УРДИ до критерия 10 последовательных реакций избегания, 10 крыс забивали и фиксировали их мозг сразу, 10—через сутки после обучения. Число сочетаний свет+электрокожное раздражение до достижения требуемого критерия при быстрой выработке рефлекса колебалось от 24 до 40, а при медленной—от 53 до 70. Одновременно с каждой подопытной крысой забивали двух контрольных: активный контроль (АК)—крысы, получавшие такое же число световых и электрокожных раздражителей, что и подопытные животные, но вне сочетаний, и пассивный контроль (ПК)—крысы, не подвергнутые специальным воздействиям.

При сопоставлении активности БХЭ на срезах у подопытных и контрольных животных использовали метод визуального сравнения интенсивности гистохимических реакций (Лосева Е. В. и соавт.,—Известия АН СССР, сер. биол. № 1, с. 133—137, 1984). Достоверность сдвигов определяли по критерию знаков Диксона и Муда со значением  $p < 0,05$ . Ставились следующие задачи: 1) сравнение активности БХЭ в ряде структур новой и старой коры больших полушарий сразу и через сутки после выработки у животных УРДИ и при несочетанном предъявлении световых и электрокожных стимулов; 2) сопоставление особенностей изменений активности БХЭ у быстро и медленно обучающихся животных, то есть при малом и большом числе предъявлений условных и безусловных стимулов; 3) сравнение изменений активности БХЭ при всех названных выше функциональных воздействиях в ткани мозга (глии, волоконных образованиях, покрытых миелиновой оболочкой) и в кровеносных сосудах мозга. При сопоставлении изменения активности БХЭ у подопытных и контрольных животных на основании визуального определения интенсивности окраски соответствующим методом обработанных препаратов (знаками +, — или 0) было установлено, что они не зависят от вида использованных функциональных нагрузок в сосудах мозга и одностороннены во всех исследованных обра-



зованиях мозга. Динамика активности фермента в ткани коры больших полушарий и гиппокампа была неодинаковой и при обучении носила иной характер, чем при несочетанном предъявлении стимулов. Направление сдвигов активности БХЭ при быстром и медленном обучении существенно различалось.

16 с., ил. 3, библиогр. 15

Институт высшей нервной деятельности  
и нейрофизиологии АН СССР, Москва

Поступила 3. III 1984

Рукопись депонирована в ВИНТИ

УДК 615.832.9.015.42:612.82.015.3

## ГЛУТАМАТДЕКАРБОКСИЛАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ МОЗГА КРЫС ПРИ ГИПОТЕРМИИ И ПОСЛЕДУЮЩЕМ САМОСОГРЕВАНИИ

ЭМИРБЕКОВ Э. З., ИСМАИЛОВ И. А.

Общим охлаждением крыс вызывали у них гипотермию со снижением ректальной температуры (РТ) до 30, 25 и 20° соответственно за 15, 30 и 55—60 мин. Для самосогревания до РТ 37°, длившегося 5—6 ч, гипотермических животных оставляли при комнатной температуре. После 1-часовой инкубации при 37, 30, 25 и 20° в гомогенатах больших полушарий мозга определяли содержание ГАМК, по которой судили об активности глутаматдекарбоксилазы (ГДК), контролем служили нормотермические крысы. Установлено, что при инкубации при 37° гомогенатов мозга животных, находящихся в начальной стадии гипотермии (РТ 30°), активность ГДК повышалась, при углублении гипотермии (РТ 25) снижалась до контрольного уровня, а в дальнейшем (РТ 20°) была на 20% ниже него.

Сходная динамика активности ГДК, но на более низком уровне, наблюдалась и при инкубации гомогенатов мозга у гипотермических животных проб соответственно при 30, 25 и 20°.

Измененная гипотермией активность ГДК не восстанавливалась после самосогревания крыс до нормотермии (37°). Причем, уровень ферментативной активности у самосогревшихся животных находился в зависимости от глубины перенесенной гипотермии.

У охлажденных до 30° и у самосогревшихся до 30° крыс после перенесенной ими гипотермии (20°) активность ГДК при той же температуре инкубации значительно отличалась.

Можно допустить, что в условиях проведенных экспериментов эти колебания активности ГДК отражают баланс метаболизма ГАМК в нервной ткани при гипотермии.

4 с., библиогр. 7

Проблемная лаборатория нейрoхимии Дагестанского  
государственного университета им. В. И. Ленина,  
Махачкала

Поступила 28. V 1984

Рукопись депонирована в ВИНТИ 20.03.85. № 1983—85

НЕЙРОБЛАСТОМЫ КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ  
ПРОЦЕССОВ РЕПАРАЦИИ ДНК

МАНУКЯН К. Л., КЦОЯН Ж. А.

Для большинства заболеваний с наследственными нарушениями механизмов репарации ДНК (пигментной ксеродермы, анемии Фанкони, синдрома Блюма, прогерии и т. д.) характерны также неврологические нарушения: прогрессирующая атрофия нейронов в коре больших полушарий головного мозга и в двигательных нейронах нижних отделов спинного мозга. Это, по-видимому, обусловлено ослабленной репарацией ДНК.

Литературные данные по изучению процессов репарации ДНК в клетках нервной ткани фрагментарны и недостаточны. Между тем известно, что причиной повышенной трансформируемости и мутабельности клеток мозга может быть отсутствие способности клеток репарировать повреждения типа  $O^6$ -метилгуанин, блокирующие отдельные участки ДНК в клетках мозга при действии различных мутагенов и канцерогенов. Это, вероятно, связано с отсутствием соответствующих ферментов репарации ДНК. В связи с этим представляет интерес изучение ферментов репарации ДНК и сравнение изоэнзимного спектра клеток головного мозга с другими клетками млекопитающих.

В обзоре проанализированы и критически обобщены многочисленные литературные данные, показывающие, что культура клеток нейробластомы сохраняет черты нейрональной дифференциации—она обладает рядом специфических свойств нейронов (морфологическое сходство, высокая активность АХЭ, наличие электрически возбудимых мембран и т. д.).

Как известно, исследование репарации ДНК клеток мозга осложнено отсутствием долгоживущих *in vitro* нервных клеток, а также их фенотипической гетерогенностью. В обзоре показано, что культура клеток нейробластомы, являясь перевиваемой, может оказаться приемлемой для распознавания молекулярных механизмов репарации ДНК и связанных с ней в настоящее время ряда проблем: вопросы мутагенеза, злокачественной трансформации клеток, клеточной дифференциации и старения, возникновения ряда наследственных заболеваний. Следовательно, она является удобной моделью также для выяснения возможных путей регуляции репарационных процессов с помощью тех или иных биологически активных веществ, например, нейрогормонов и нейромедиаторов.

20 с., библиогр. 81

Институт экспериментальной  
биологии АН АрмССР, Ереван

Поступила 29. II 1984

Рукопись депонирована в ВНИИТИ 20.03.85. № 1985—85

## СОДЕРЖАНИЕ

|                                                                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Куликова О. Г., Белянцева Л. М., Разумовская Н. И., Бородин Ю. С.</i> Синтез РНК в клеточных ядрах различных отделов головного мозга при действии этимизола.            | 3  |
| <i>Андросова Л. В., Бурбаева Г. Ш.</i> Изучение антигенных свойств тубулина, выделенного из нервной ткани                                                                  | 10 |
| <i>Клейн Е. Э., Гвалия Н. В.</i> Изменение распределения синапсомных белков головного мозга выпленка в процессе импринтинга.                                               | 16 |
| <i>Капранов А. А., Балков Д. И., Тюленев В. И., Белик Я. В.</i> Влияние белка S-100 на фосфорилирование ядерных белков мозга крыс: участие ионов кальция                   | 23 |
| <i>Хватова Е. М., Новикова Н. А., Корягин А. С.</i> Выделение, очистка и свойства растворимой митохондриальной H <sup>+</sup> -АТФазы мозга быка.                          | 30 |
| <i>Каркищенко Н. Н., Куликова О. Н., Страдомский Б. В.</i> Влияние агрессивной реакции на электрофоретический спектр кислых белков различных структур головного мозга крыс | 35 |
| <i>Суджан Ц. М.</i> Особенности метаболизма гликогена в головном мозгу при действии ипразида и тубазида: новый аспект их применения в клинике.                             | 43 |

### Краткие сообщения

|                                                                                                                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Дмитриев А. Д., Теннов А. В., Годикова Ю. И., Кизим Е. А., Кобылянский А. Г., Самовилова Н. Н.</i> Метод отделения йодированных опиидных пептидов от их немеченых форм с помощью ионообменной хроматографии    | 48 |
| <i>Мурти В., Пракаш Г. С., Субраманиям К., Шривасту К. Р., Прасад М. С. К., Садасивуду Б.</i> Активность кислых и нейтральных протеиназ в различных отделах головного мозга крыс; распределение в глии и нейронах | 52 |
| <i>Галоян А. А., Гурвиц Б. Я., Шарова Н. П.</i> Роль тиоловых групп в активации фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов кальмодулином.                                                                            | 56 |
| <i>Цветненко Е. З.</i> Спермидин и спермин в отделах головного мозга крыс при гипероксии.                                                                                                                         | 61 |
| <i>Воробьев Ю. В., Прохоров М. Ш.</i> Содержание перекисей липидов в ткани головного мозга при экспериментальной черепно-мозговой травме                                                                          | 65 |

### Обзоры

|                                                                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Горкин В. З.</i> Метаболизм биогенных моноаминов при патологических состояниях ЦНС.                             | 68 |
| <i>Болдырев А. А., Лопина О. Д., Прокопьева В. Д.</i> Мембранные липиды как регуляторы межбелковых взаимодействий. | 80 |

### Некролог

|                                                  |    |
|--------------------------------------------------|----|
| <i>Игорь Александрович Сытинский (1926—1984)</i> | 96 |
|--------------------------------------------------|----|

### Хроника

|                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Семенова Т. П.</i> Первый всесоюзный симпозиум «Нейрохимические механизмы регуляции памяти» | 97 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

### Рецензии

|                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Отеллин В. А. С. Х.</i> Хайдарлиу. Функциональная биохимия адаптации | 98 |
|-------------------------------------------------------------------------|----|



**Рефераты статей, направленных  
на депонирование в ВИНТИ**

|                                                                                                                                                                                                                                 |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <i>Меликов Э. М., Гасанов Г. Г., Мовсумов Г. Д.</i> Особенности действия серотонина микроинфицированного в дорзальный гиппокамп, на условные рефлексы активного и пассивного избегания. . . . .                                 | 100 |
| <i>Штильман Н. И., Гецова В. М., Орлова Н. В.</i> Содержание мозгоспецифического и общетканевого белков в церебральных структурах крыс при выработке у них условных рефлексов на фоне введения дисульфирама и ипрасида. . . . . | 101 |
| <i>Ханббян М. В., Назарян О. А., Арутюнян А. М.</i> Норадренергические влияния на состав воднорастворимых белков гипоталамуса. . . . .                                                                                          | 102 |
| <i>Лосева Е. В., Чернышевская И. А.</i> Гистохимическое исследование бутирилхолинэстеразной активности некоторых кортикальных образований головного мозга крыс при быстром и медленном обучении. . . . .                        | 103 |
| <i>Эмирбеков Э. З., Исмаилов И. А.</i> Глутаматдекарбоксилазная активность мозга крыс при гипотермии и последующем самосогревании. . . . .                                                                                      | 104 |
| <i>Манукян К. Л., Кцоян Ж. А.</i> Нейробластомы как модель для исследований процессов репарации ДНК. . . . .                                                                                                                    | 105 |



## CONTENTS

|                                                                                                                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Kulikova O. G., Belyatsova L. M., Razimovskaya N. I., Borodkin Ya. S.</i> RNA synthesis in the different brain cell nuclei in azhimazol treated animals . . . . .                         | 3  |
| <i>Androsova L. V., Burbaeva G. Ch.</i> Antigenic properties of tubulin isolated from nervous tissue . . . . .                                                                               | 10 |
| <i>Klein H. E., Gvalia N. V.</i> Changes in the distribution of brain synaptosomal proteins in the process of imprinting . . . . .                                                           | 16 |
| <i>Kapralov A. A., Batkov D. I., Tyulenev V. I., Belik Ja. V.</i> Participation of $Ca^{2+}$ -ions in S-100 protein-dependent phosphorylation of proteins of rat brain nuclei . . . . .      | 23 |
| <i>Khvatova E. M., Novikova N. A., Koryagin A. S.</i> Purification and characteristics of the soluble bovine brain mitochondrial $H^{+}$ ATPase . . . . .                                    | 30 |
| <i>Karkishenko N. N., Kulikova O. N., Stradomsky B. V.</i> Aggressive reaction effect on the electrophoretic pattern of acidic proteins in rat brain different structures . . . . .          | 35 |
| <i>Sudjian Ts. M.</i> Peculiarities of brain glycogen metabolism under the action of iproniazid and tubazid. The new aspect of clinical application of these hydrazine derivatives . . . . . | 43 |

### Short communications

|                                                                                                                                                                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Dmitriev A. D., Tenkov A. V., Golikova U. I., Kizim E. A., Kobyltansky A. G., Samovilova N. N.</i> Method of separation of iodinated opioid peptides from their nonradioactive form by ion-exchange chromatography . . . . .  | 48 |
| <i>Moorty B., Surya Prakash G., Subrahmanyam K., Shrivastaw K. P., Prasad M. S. K., Sadasivudu B.</i> Acid and neutral proteinases in different regions of rat brain along with their distribution in neurons and glia . . . . . | 52 |
| <i>Galoyan A. A., Gurvits B. Ya., Sharova N. P.</i> Role of SH-groups in the activation of phosphodiesterase of cyclic nucleotides by calmodulin . . . . .                                                                       | 56 |
| <i>Tsvetnenko E. Z.</i> Spermidine and spermine in rat brain different regions under hyperbarooxygenation . . . . .                                                                                                              | 61 |
| <i>Vorobiev Yu. V., Promyslov M. Sh.</i> Lipid peroxides in brain of animals with experimental cranial trauma . . . . .                                                                                                          | 65 |

### Reviews

|                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Gorkin V. Z.</i> Metabolism of biogenic monoamines in pathology of CNS . . .                                               | 68 |
| <i>Boldyrev A. A., Lopina O. D., Prokopieva V. D.</i> Membrane lipids as regulators of protein-protein interactions . . . . . | 80 |

### Obituary

|                                                            |    |
|------------------------------------------------------------|----|
| <i>Sytinskiy Ygor Alexandrovitch (1926—1984)</i> . . . . . | 96 |
|------------------------------------------------------------|----|

### Chronicles

|                                                                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Semenova T. T.</i> Ist All-Union Symposium „Neurochemical mechanisms regulating memory“ (Peustchino-on-Oka, 4—7th June, 1984). . . . . | 97 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

### Comments

|                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Ottelin V. A., Khaidarliu S. Kh.</i> „Functional Biochemistry of Adaptation“ . . . | 93 |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----|

Summaries of manuscripts presented for deposition in All-Union  
Institute of Scientific and Technical Information

|                                                                                                                                                                                                        |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <i>Melikov E. M., Gasanov G. G., Movsumov G. D.</i> Peculiarities of the effect of serotonin microapplied to the dorsal hippocampus on the active and passive avoidance conditioned reflexes . . . . . | 100 |
| <i>Shtilman N. I., Getsova V. M., Orlova N. V.</i> Effect of disulfiram and iprazid on the amount of brain-specific and overall protein in rat brain different structures . . . . .                    | 101 |
| <i>Khanbalyan M. V., Nazaryan O. A., Arutyunyan A. M.</i> Effect of noradrenergic compounds on the composition of hypothalamic water-soluble proteins                                                  | 102 |
| <i>Loseva E. V., Chernyshchanskaya I. A.</i> Histochemical distribution of butyrylcholine esterase activity in brain different cortical structures of rats under rapid and slow training . . . . .     | 103 |
| <i>Emirbekov E. Z., Ismailov I. A.</i> Glutamate decarboxylase activity in the brain of rats under hypothermia and subsequent self-warming . . . . .                                                   | 104 |
| <i>Manukyan K. L., Kitsoyan Zh. A.</i> Neuroblastomas as a model to study DNA repair . . . . .                                                                                                         | 105 |

## К СВЕДЕНИЮ ЧИТАТЕЛЕЙ!

Журнал «Нейрохимия» (орган АН СССР и АН АрмССР) публикует статьи по актуальным вопросам функциональной нейрохимии, касающимся структуры и биологической роли специфических белков, нейропептидов, пуриновых кислот и нуклеотидов, липидов и других соединений нервной ткани, биохимии нейротрансмиттеров и их рецепторов, глии и нейронов, хромофинных гранул и т. д. В работе журнала принимают участие, наряду с советскими нейрохимиками, известные зарубежные ученые.

С 1984 г. журнал «НЕЙРОХИМИЯ» издается на английском языке научным издательством Cordon and Breach, Science Publishers, INC, One park avenue, New York, 10016.

Журнал представляет интерес для широкого круга нейробиологов, работающих в области нейрохимии, фармакологии, физиологии, нервной системы, а также специалистов, занимающихся вопросами клинической нейрохимии.

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.

## ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

8. Корректуру авторам редакция не высылает.



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

|                                          |                                 |
|------------------------------------------|---------------------------------|
| АХЭ—ацетилхолинэстераза                  | А—абсорбция (поглощение)        |
| ГЖХ—газожидкостная хроматография         | г—константа скорости реакции    |
| ДЭАЭ—целлюлоза—диэтиламиноэтил-целлюлоза | $K_i$ —константа ингибирования  |
| ИКС—инфракрасная спектроскопия           | $K_m$ —константа Михаэлиса      |
| ИОХ—ионообменная хроматография           | $K_s$ —субстратная константа    |
| ИЭФ—изоэлектрическое фокусирование       | $n_H$ —коэффициент Хилла        |
| КМ-целлюлоза—О-карбоксиметилцеллюлоза    | V—максимальная скорость реакции |
| МАО—моноаминоксидаза                     | $K_H$ —кюри                     |
| М. Е.—международная единица              | мКи—милликюри                   |
| М—молярность                             | Р—рентген                       |
| $M_r$ —молекулярная масса (вес)          | имп/мин—импульсы за минуту      |
| м-, о-, п.—мета-, орто-, пара-           | Д—дальтон                       |
| н.—нормальный (раствор)                  | кД—килодальтон                  |
| НС—нервная система                       | ч—час                           |
| ПААГ—полиакриламидный гель               | мин—минута                      |
| СМЖ—спинномозговая жидкость              | с—секунда                       |
| т. кип.—температура кипения              | мкм—микрометр                   |
| т. пл.—температура плавления             | мл—миллилитр                    |
| трис—трис (оксиметил)-аминометан         | мкл—микролитр                   |
| ТСХ—тонкослойная хроматография           | мг—миллиграмм                   |
| У. А.—удельная активность                | мкг—микрограмм                  |
| УФ-спектр—ультрафиолетовый спектр        | нг—нанограмм                    |
| ЦНС—центральная нервная система          | нм—нанометр                     |
| ЭНР—электронный парамагнитный резонанс   | нг—пиктограмм                   |
| ЭСР—электронный спиновый резонанс        | мкатом—микроатом                |
| ЯМР—ядерный магнитный резонанс           | ммоль—миллимоль                 |
|                                          | мкмоль—микромоль                |
|                                          | нмоль—наномоль                  |
|                                          | пмоль—пикомоль                  |
|                                          | фмоль—фемтомоль                 |

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

Стандартные обозначения некоторых тривиальных названий  
химических соединений

|                                                                                          |                                                                            |
|------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| Ala*—аланин                                                                              | Man—манноза                                                                |
| AMP, ADP, ATP**—аденозин-5'-мо-<br>но-, ди- и трифосфаты                                 | Met—метионин                                                               |
| cAMP—циклический аденозинмоно-<br>фосфат                                                 | NAD, NADH — никотинамидаденин-<br>динуклеотид и его восст. форма           |
| Ara*—арабиноза                                                                           | NADP, NaDPH — никотинамидаде-<br>нидинуклеотидфосфат и его восст.<br>форма |
| Arg—аргинин                                                                              | NMN — никотинамидмононуклеотид                                             |
| Asn—аспарагин                                                                            | Orn—орнитин                                                                |
| Asp—аспарагиновая кислота                                                                | Phe—фенилаланин                                                            |
| Asx—аспарагиновая кислота или ас-<br>парагин                                             | P — неорганический фосфат                                                  |
| CMP, CDP, CTP—цитидин-5'-моно-,<br>ди- и трифосфаты                                      | PP — неорганический пирофосфат                                             |
| CoA—коэнзим A                                                                            | Pro—пролин                                                                 |
| CoASAc—ацетилкоэнзим A                                                                   | Q, QH <sub>2</sub> —убихинон, убихинол                                     |
| Cys—цистеин                                                                              | Rib, dRib—рибоза, 2-дезоксирибоза                                          |
| FAD, FADH <sub>2</sub> — флавинадениндину-<br>клеотид и его восст. форма                 | Ser—серин                                                                  |
| FMN, FMNH <sub>2</sub> — флавиномононуклео-<br>тид и его восст. форма                    | Thr—треонин                                                                |
| Fuc—фруктоза                                                                             | TMP, TDP, TTP—рибозилтимин-5'-<br>моно-, ди- и трифосфаты                  |
| Fru—фруктоза                                                                             | Trp—триптофан                                                              |
| Gal—галактоза                                                                            | Tyr—тирозин                                                                |
| Glc—глюкоза                                                                              | UMP, UDP, UTP—уридин-5'-моно-<br>ди- и трифосфаты                          |
| GlcA—глюкуроновая кислота (ана-<br>логично другим уроновым к-ты)                         | Val—валин                                                                  |
| GlcN—глюкозамин                                                                          | АКТГ—адренокортикотропный гор-<br>мон                                      |
| GlcNAc—ацетилглюкозамин (анало-<br>гично другим дезоксисахара и их<br>ацетилпроизводные) | АХ—ацетилхолин                                                             |
| Gln—глутамин                                                                             | ГАМК—гамма-аминомасляная кисло-<br>та                                      |
| Glu—глутаминовая кислота                                                                 | ДДС-Na—додецилсульфат натрия                                               |
| Glx—глутамин или глутаминовая<br>кислота                                                 | ДОФА—диоксифенилаланин                                                     |
| Gly—глицин                                                                               | ДНК—дезоксирибонуклеиновая кис-<br>лота                                    |
| GMP, GDP, GTP—гуанозин-5'-мо-<br>но-, ди- и трифосфаты                                   | ДОХ-Na—дезоксихолат натрия                                                 |
| GSH, GSSG—глутатион и его окис-<br>ленная форма                                          | РНК—рибонуклеиновая кислота                                                |
| His—гистидин                                                                             | pРНК—рибосомная РНК                                                        |
| Hyl—скинелин                                                                             | mРНК—матричная (информационная,<br>ядерная РНК)                            |
| Hyp—оксипролин                                                                           | tРНК—транспортная РНК                                                      |
| Ile—изолейцин                                                                            | Glu-tРНК и т. п.—аминоацилпроиз-<br>водные РНК                             |
| IMP, IDP, ITP—инозин-5'-моно-,<br>ди- и трифосфаты                                       | ТХУ—трихлоруксусная кислота                                                |
| Leu—лейцин                                                                               | Трис—трис (оксиметил) —аминоме-<br>тан                                     |
| Lys—лизин                                                                                | ЭГТА—этиленгликольтетраацетат                                              |
|                                                                                          | ЭДТА—этилендиаминтетраацетат                                               |

\*стандартные обозначения аминокислот и моносахаридов допустимо употреблять в сокращенном виде при написании структур, а также в таблицах и на рисунках

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