

Том 4. № 2. 1985

ИЗДАТЕЛЬСТВО АН ССР

ISSN 0203-493X

НЕЙРОХИМИЯ

ՆԵՅՐՈՔԻՄԻԱ



АКАДЕМИЯ НАУК СССР  
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

АКАДЕМИЯ НАУК СССР  
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

# НЕЙРОХИМИЯ ՆԵՅՐՈՔԻՄԻԱ

ТОМ 4, ВЫП. 2  
Апрель—июнь

Журнал основан в 1982 году  
Выходит 4 раза в год

ИЗДАТЕЛЬСТВО АН АРМЯНСКОЙ ССР  
ЕРЕВАН 1985

Редакционная коллегия

А. А. ГАЛЮЯН—главный редактор

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

Редакционный совет

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

Ст. редактор ХАЧАТУРОВА Э. А.

Техн. редактор АЗИЗБЕКЯН Л. А.

Слано в набор 27.03. 1985 г. Подписано к печати 23.05. 1985 г. ВФ 05668  
Бумага № 1, 70×108<sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Высокая печать. Печ. лист, 7,5+4. Усл. печ. лист. 10,5  
Учет.-изд. 8,75. Тираж. 600. Заказ 266. Издат. 6377.  
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.

## 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, нуклеиновых кислот и нуклеотидов, липидов и других соединений нервной ткани, биохимии нейротрансмиттеров и их рецепторов, глии и нейронов, хромаффинных 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 издательством Harwood Academic Publishers GmbH and ORA Ltd.

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.



УДК 577.156:612.8.015

## РЕГИОНАЛЬНОЕ, КЛЕТОЧНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ, СУБКЛЕТОЧНАЯ И СУБОРГАНОИДНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ АМИНОТРИПЕПТИДАЗЫ НЕРВНОЙ ТКАНИ КОШЕК

ГЕНГИН М. Т., МЕЛЕШКО В. И., РЕВА А. Д.

кафедра биофизики и биохимии Днепропетровского госуниверситета

Исследуемые структуры мозга по возрастанию активности аминотрипептидазы располагаются в следующей последовательности: передние корешки, белое вещество, задние корешки спинного мозга, белое вещество больших полушарий, задние рога, передние рога поясничного утолщения, серое вещество больших полушарий, мозжечок. Активность аминотрипептидазы выше во фракции глиальных клеток в 1,5 раза по сравнению с нейрональной. Фермент обнаруживается во всех фракциях субклеточных структур (митохондриальной, синаптической, микросомной, миелиновой и растворимой), полученных из серого вещества больших полушарий. Субмитохондриальные фракции очищенных митохондрий (наружные, внутренние мембраны, матрикс и межмембранное пространство) различаются по уровню активности аминотрипептидазы.

Открытие нейропептидов и выяснение их функций вызвало интерес к изучению протеолитических ферментов как факторов, определяющих уровень пептидов в мозгу и систем, в определенной степени обеспечивающих функционирование пептидергических нейронов. Считают, что генез физиологически активных белков и пептидов осуществляется преимущественно пептидгидролазами с трипсиноподобной специфичностью действия [1]. Что же касается ферментов, участвующих в деградации нейропептидов, то здесь невозможно отдать предпочтение какой-то определенной группе пептидгидролаз с той или иной специфичностью действия. По-видимому, спектр ферментов, участвующих в инактивации и особенно в полной деградации пептидов, более широк и включает как эндо-, так и экзопептидазы [2—6]. Среди экзопептидаз мозга наиболее активна Leu-Gly-Gly-аминопептидаза. Показано, что аминотрипептидазная активность в различных отделах головного мозга крыс выше эндопептидазной активности в 20—60 раз [7, 8]. Функциональная роль аминотрипептидазы в мозгу остается неясной.

В представленной работе изучали региональное, клеточное распределение, субклеточную и суборганондную локализацию аминотрипептидазы (субстрат Leu-Gly-Gly) нервной ткани кошек.

## Материалы и методы

Опыты проводили на животных обоего пола. После декапитации извлекали головной и спинной мозг и помещали в охлажденный 0,25 М раствор сахаразы. Затем мозг очищали от оболочек и кровеносных сосудов, промывали в 0,25 М сахаразе, удаляли её остатки фильтровальной бумагой и разделяли на соответствующие отделы и структуры. При исследовании регионального распределения фермента

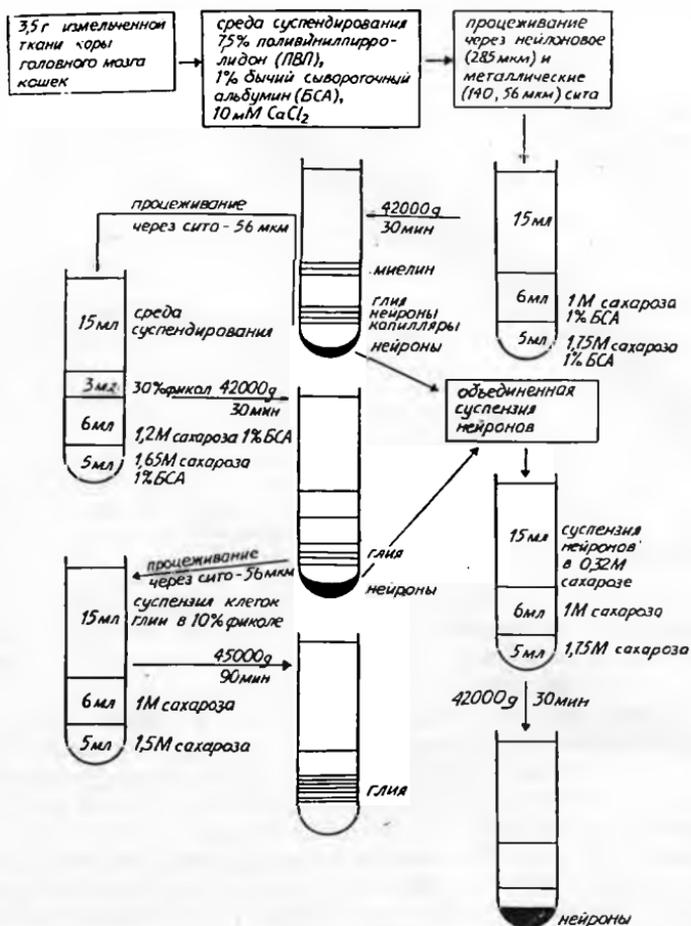
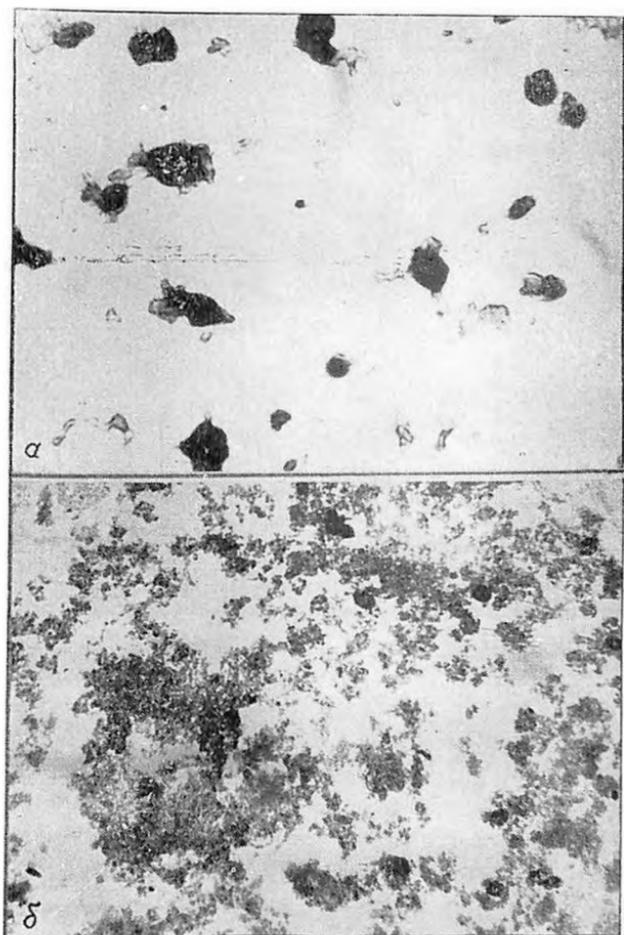


Рис. 1. Схема выделения обогащенных нейрональной и глиальной фракций из серого вещества головного мозга кошек.

его активность определяли в цельном гомогенате, приготовленном на 0,25 М сахаразе в соотношении 1:10 (вес/объем) и в растворимой фракции, которую получали центрифугированием гомогената при 90 000 g в течение 60 мин.

Обогащенные фракции нейронов и глины получали из серого вещества больших полушарий головного мозга по методу Sellinger и соавт. [9] в модификации Флёр-



*Рис. 2.* Микрофотографии обогащенных фракций нейронов (*a*) и глии (*б*), выделенных из серого вещества больших полушарий головного мозга кошек ( $\times 900$ ).

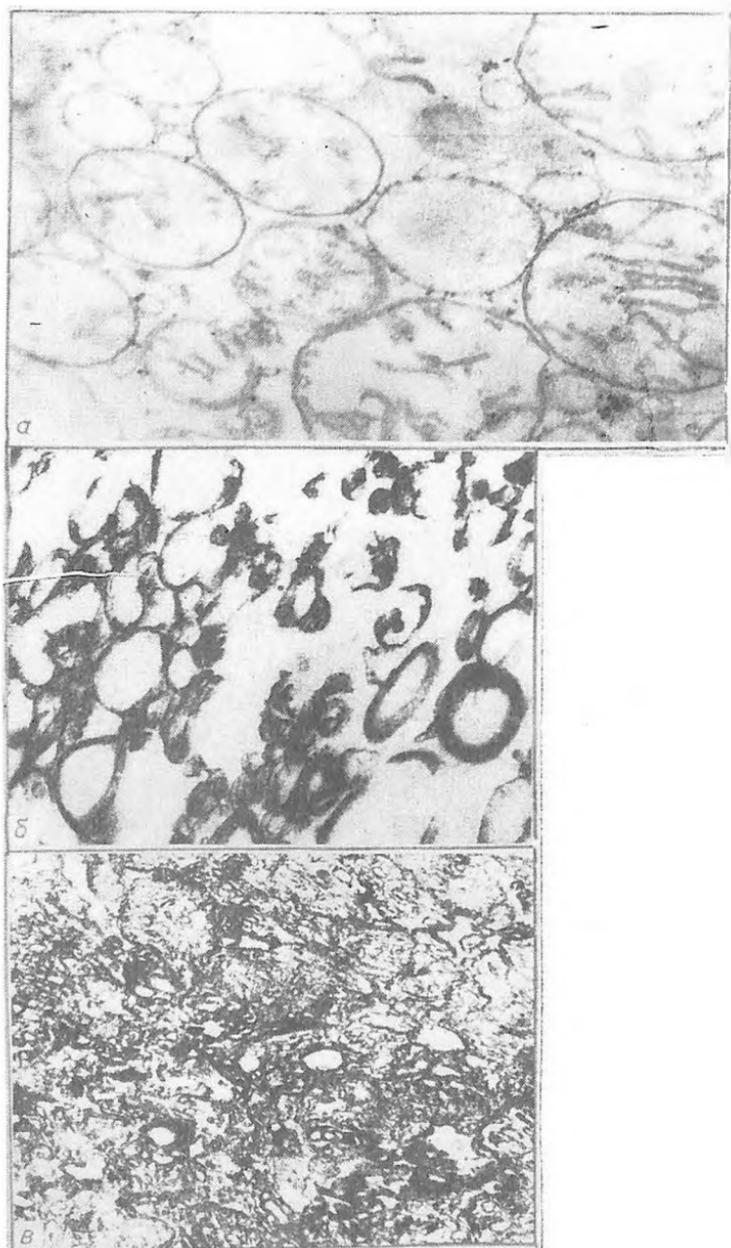


Рис. 3. Электронные микрофотографии очищенных митохондрий (а), наружных (б) и внутренних мембран (в) митохондрий, полученных из серого вещества больших полушарий головного мозга кошек (митохондрии— $\times 75\,000$ , фракции наружных и внутренних мембран— $\times 48\,000$ ).

ва [10]. Схема выделения обогащенных нейрональной и глиальной фракций представлена на рис. 1. Количественный выход по белку для фракции нейронов составлял 2,2, для нейроглии—21,8 мг/1 г ткани мозга. Контроль чистоты фракций проводили микроскопически (рис. 2).

Субклеточное фракционирование осуществляли по методу Whittaker и соавт. [11] в модификации Шаннской и соавт. [12]. Были получены следующие субклеточные фракции: митохондриальная, синапсомная, миелиновая и две подфракции микросом, обозначенные нами как  $P_1$  и  $P_2$ .  $P_1$  микросомную фракцию получали центрифугированием постмитохондриальной фракции при 17 000 g в течение 30 мин, а  $P_2$ —путем последующего центрифугирования надосадочной фракции при 100 000 g в течение 60 мин. Чистоту субклеточных структур оценивали энзиматически, определяя активность сукцинатдегидрогеназы [13], глюкозо-6-фосфатазы [14] и холинэстеразы [15].

Очищенные митохондрии получали из серого вещества больших полушарий по методу Панченко и соавт. [16]. Наружные и внутренние мембраны митохондрий разделяли в градиенте плотности сахарозы методом Sottocasa и соавт. [17]. Качество разделения мембран контролировали электронмикроскопически (рис. 3), а также путем определения активности МАО [18] и цитохромоксидазы [19].

Активность аминотрипептидазы определяли методом Marks, Lajtha [20] в нашей микромодификации. Инкубационная смесь состояла из 60 мкл 0,143 M меллал-ацетатного буфера, pH 7,6, 20 мкл водного раствора субстрата (Leu-Gly-Gly) в конечной концентрации  $5 \times 10^{-3}$  M и 40 мкл препарата фермента. Пробы инкубировали в течение 30 мин при 37°. Реакцию останавливали добавлением в среду инкубации 60 мкл 5%-ной ТХУ. В контрольные пробы ТХУ вносили перед добавлением субстрата. Осадок отделяли центрифугированием при 1000 g в течение 15 мин. На цветную реакцию отбирали 60 мкл ТХУ-центрифугата, переносили в пробирку, куда затем добавляли 1 мл нингидринглицериновой смеси (1 часть 0,85%-ного раствора нингидрина на 0,5 M цитратном буфере, pH 5,5 и 2 части глицерина). Пробы тщательно перемешивали и помещали на 12 мин в кипящую водяную баню, затем охлаждали до комнатной температуры и колориметрировали на ФЭК ( $\lambda$  570 нм). Активность фермента выражали в мкмоль аминогрупп, освобожденных в присутствии фермента за 60 мин инкубации при 37° в расчёте на 1 мг белка фракции или 1 мг свежей ткани. Белок определяли по методу Lowry и соавт. [21]. Результаты опытов обрабатывали статистически методом малых выборок [22].

## Результаты и обсуждение

### *Региональное и клеточное распределение аминотрипептидазы*

Данные, полученные при изучении регионального распределения аминотрипептидазы свидетельствуют о том, что содержание фермента неодинаково в функционально и морфологически различных отделах и структурах нервной ткани (табл. 1). По возрастанию активности фермента они располагаются в следующей последовательности: передние корешки, белое вещество, задние корешки спинного мозга, продолговатый мозг, белое вещество больших полушарий, задние рога, передние рога поясничного утолщения, серое вещество больших полушарий, мозжечок. Активность фермента коррелирует с содержанием белка в соответствующих структурах мозга и скоростью его обмена [23], что связано, по-видимому, с участием аминотрипептидазы в процессах белкового катаболизма. Показано также, что активность фермента выше в отделах, характеризующихся скоплением кле-

точных элементов. В структурах, образующих проводящие пути, его активность несколько ниже. По величине У.А. фермента различия между исследуемыми отделами менее выражены, то есть соотношение фермент/белок в структурах нервной ткани колеблется незначительно. Несколько выделяется мозжечок, где У.А. аминотрипептидазы выше по сравнению с другими отделами и структурами.

Установили, что активность аминотрипептидазы в задних корешках спинного мозга выше, чем в передних. Очевидно, афферентные и эфферентные пути различаются по содержанию в них пептидгидролаз. Более высокая активность в задних корешках по сравнению с передними показана ранее для дипептидгидролазы [24].

Определение активности аминотрипептидазы в растворимой фракции соответствующих отделов и структур показало, что фермент находится в нервной ткани в двух формах—растворимой и связанной с мембранами субклеточных структур. Причем их соотношение в исследуемых структурах и отделах различно. Почти все структуры поясничного утолщения спинного мозга содержат примерно одинаковые количества растворимой и связанной форм. Вышние отделы мозга, в основном, характеризуются более высоким содержанием растворимой формы фермента. Здесь же необходимо отметить, что доля растворимой формы аминотрипептидазы выше в структурах, представленных проводящими путями и глиальными элементами (белое вещество больших полушарий, продолговатый мозг), в то время как в сером веществе больших полушарий и мозжечке соотношение растворимой и связанной форм примерно одинаково.

Полученные данные о локализации аминотрипептидазы согласуются с представлениями об иерархии внутриклеточных пептидгидролаз, если предположить, что роль этого фермента заключается в деградации низкомолекулярных пептидов, накапливающихся в клетке по мере действия на белки клеточных эндопептидаз. Функции аминотрипептидазы, не связанные с катаболизмом пептидов, на сегодня не известны.

Определенный интерес в понимании роли аминотрипептидазы представляют данные о распределении фермента между клеточными элементами нервной ткани. В наших опытах показано, что его активность в обогащенной фракции глиальных клеток, полученных из серого вещества больших полушарий, составляет  $0,95 \pm 0,06$  мкмоль, что в 1,5 раза выше по сравнению с активностью в нейрональной фракции— $0,62 \pm 0,03$  мкмоль. Анализируя данные по активности фермента в обогащенных фракциях нейронов и глии, необходимо отметить, что уровень её в два раза ниже, чем в сером веществе, из которого получили нейроны и глиальные клетки. Возможно, что в процессе фракционирования происходит частичная инактивация. Или же (и) часть фермента ассоциирована с теми структурными компонентами мозга, которые отходят по мере очистки нейронов и глии. Различие в активности аминотрипептидазы между нейрональной и глиальной фрак-

Таблица 1

Активность аминотрипептидазы в функционально и морфологически различных отделах и структурах нервной ткани кошек (в мкмоль аминокрупп, освободившихся за 60 мин инкубации, в расчете на 1 мг белка и 1 мг свежей ткани; средние данные 6—9 опытов).

	Головной мозг					Спинальный мозг				
	большая полушария		мозжечок	продолговатый мозг	поясничное утолщение			передние корешки	задние корешки	
	серое вещество	белое вещество			белое вещество	серое вещество				
			передние рога	задние рога						
Активность в гомогенате	на ткань	0,210± 0,006	0,140± 0,04	0,260± 0,003	0,120± 0,002	0,090± 0,003	0,200± 0,002	0,190± 0,003	0,080 0,004	0,100± 0,002
Активность в супернатанте	на белок	1,680± 0,0034	1,370± 0,036	2,400± 0,064	1,260± 0,062	1,130± 0,053	1,580± 0,042	1,450± 0,055	0,940± 0,026	1,200± 0,032
Активность в расщепляемой фракции (в % от общей)	на ткань	0,105± 0,002	0,090± 0,004	0,150± 0,005	0,090± 0,001	0,044± 0,002	0,105± 0,002	0,095± 0,003	0,040± 0,003	0,055± 0,003
	на белок	4,020± 0,093	4,660± 0,045	6,24± 0,10	5,070± 0,097	2,180± 0,053	3,800± 0,094	3,470± 0,071	1,860± 0,055	2,380± 0,038
		50,7± 3,6	67,9± 4,8	57,3± 6,5	73,9± 7,8	47,8± 4,7	51,5± 3,8	51,6± 2,8	48,9± 3,6	54,5± 4,7

циями можно объяснить, исходя из возможной специфической роли данного фермента. Если предположить, что аминотрипептидаза принимает участие в специфической инактивации определенных пептидов (нейротрансмиттеров, нейромодуляторов), то преимущественная локализация этого фермента в глии является в некотором роде отражением особенностей межклеточного распределения ферментных систем обмена нейромедиаторов. Так, например, известно, что ферменты синтеза АХ локализованы в нейронах, в то время как АХЭ, наоборот, большей частью обнаруживается в глии [25]. Более высокая активность аминотрипептидазы в глиальной фракции, возможно, связана и с тем, что глиальные элементы, являясь компонентом ГЭБ, обеспечивают, благодаря высокой пептидазной активности, защиту нейронов от воздействия физиологически активных пептидов, которые могут привноситься в мозг с кровью.

#### *Субклеточная и суборганидная локализация аминотрипептидазы*

Субклеточные структуры получали из серого вещества больших полушарий. Как было показано (табл. 1), в сером веществе приблизительно 50% аминотрипептидазной активности ассоциировано с мембранами субклеточных структур. Активность фермента определяли в митохондриальной, синапсосомной, двух микросомных и миелиновой фракциях. Результаты опытов представлены в табл. 2.

Анализ данных по активности маркерных ферментов позволяет сделать заключение об относительно высокой степени чистоты полученных фракций субклеточных структур. Так, наибольшая активность сукцинатдегидрогеназы—маркерного фермента митохондрий—обнаруживается в митохондриальной фракции: АХЭ имеет четко выраженную синапсосомную локализацию. Активность глюкозо-6-фосфатазы сосредоточена во фракциях микросом.

Аминотрипептидаза обнаруживается во всех субклеточных фракциях, однако уровень её активности различен (табл. 2). Самая низкая активность обнаружена в миелиновой фракции. Значительно более высокая активность фермента выявлена во фракциях микросом и митохондрий. Функции мембраносвязанной формы аминотрипептидазы в клетке в значительной степени определяются её компарментализацией. Микросомная форма фермента, возможно, принимает участие в процессах модификации синтезированных белков [26]. В синапсосомной фракции, например, обнаружено несколько различающихся по свойствам аминотрипептидаз, гидролизующих энкефалины [27, 28].

Как было показано (табл. 2), митохондриальная фракция отличается высоким содержанием аминотрипептидазы. Представляло интерес изучение субмитохондриальной локализации фермента. Для

этой цели из серого вещества больших полушарий были получены очищенные митохондрии, которые затем обрабатывали ультразвуком и суспензию мембран разделяли центрифугированием в градиенте

Таблица 2.

Удельная активность аминокотрипептидазы и относительная удельная активность маркерных ферментов\* в субклеточных фракциях серого вещества больших полушарий головного мозга кошек

Ферменты	Фракции				
	митохондриальная	синаптосомная	микросомная		миеллиновая
			1	2	
Аминотрипептидаза	5,14±0,10	2,20±0,14	3,02±0,18	2,58±0,02	0,54±0,04
Сукцинатдегидрогеназа	3,80±0,55	1,50±0,05	0,48±0,01	0,74±0,06	0
Ацетилхолинэстераза	0,340±0,014	7,30±0,18	3,15±0,22	2,90±0,15	0
Глюкозо-6-фосфатаза	1,24±0,20	1,90±0,05	2,40±0,40	3,35±0,30	0,69±0,10

плотности сахарозы на фракции, содержащие наружные и внутренние мембраны. При этом была получена также растворимая фракция, которая включала содержимое матрикса митохондрий и межмембранного пространства. Электронномикроскопические фотографии сви-

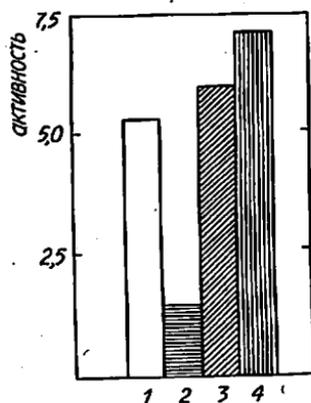


Рис. 4. Активность аминокотрипептидазы в очищенных митохондриях мозга кошек и субмитохондриальных фракциях (в мкмоль аминокотрипептида за 60 мин инкубации в расчете на 1 мг белка). 1—очищенные митохондрии, 2—внутренние мембраны, 3—наружные мембраны, 4—растворимая фракция (матрикс и межмембранное пространство).

детельствуют о высокой степени чистоты полученных митохондрий и качественном разделении мембран (рис. 3), на что указывают и данные определения активности маркерных ферментов. Так, активность МАО в наружных мембранах составляет  $36,9 \pm 2,0$  условных спектрофотометрических единиц в расчете на 1 мг белка: во фракции внутренних мембран— $6,5 \pm 0,3$  единиц. Активность цитохромоксидазы во фракции внутренних мембран выше в 3 раза по сравнению с наружными и равна  $18,2 \pm 0,6$  и  $5,6 \pm 0,2$  условных спектрофотометрических единиц/мг белка соответственно.

\* Активность аминокотрипептидазы (мкмоль аминокотрипептида/мл белка/г), сукцинатдегидрогеназы (мкмоль сукцината/мг белка/г), АХЭ (мкмоль АХ/мг белка/г) и глюкозо-6-фосфатазы (ммоль Р<sub>i</sub>/мг белка/мин).

Данные, касающиеся исследования активности аминотрипептидазы в очищенных митохондриях и субмитохондриальных фракциях приведены на рис. 4. Субмитохондриальные фракции различаются между собой по активности аминотрипептидазы. Самая высокая У. А. обнаружена в растворимой фракции (содержимое матрикса и межмембранного пространства), несколько ниже она во фракции наружных мембран. Величина У. А. фермента во фракции внутренних мембран в 4 раза ниже по сравнению с таковой наружных мембран.

Особенности локализации аминотрипептидазы в компартментах митохондрий связаны с определенными функциями данного фермента. По-видимому, митохондрии имеют полный набор как экзо-, так и эндопептидаз, в совокупности обеспечивающих и процессинг синтезированных и распад «отработанных» митохондриальных белков до свободных аминокислот [29, 30].

## REGIONAL, CELLULAR, SUBCELLULAR AND SUBORGANOIDAL DISTRIBUTION OF AMINOTRIPEPTIDASE IN CAT NERVOUS TISSUE

GENGIN M. T., MELESHKO V. I., REVA A. D.

Chair of Biophysics and Biochemistry, State University, Dnepropetrovsk

Regional, cellular (neuronal and glial) distribution, subcellular and suborganoidal localization of aminotripeptidase in cat brain was studied. The order of increasing enzyme activity in different areas of CNS is as follows: radix anterior of the spinal cord, white matter, radix posterior of the spinal cord, medulla oblongata, white matter of the big hemispheres, cornu posterior, cornu anterior of eminentia lumbalis, grey matter of big hemispheres, cerebellum. The activity of aminotripeptidase is 1,5-fold higher in the glial fraction than in neurons. All subcellular fractions studied exert enzyme activity, the maximal activity is detected in the mitochondrial fraction. The submitochondrial distribution of aminotripeptidase activity is different.

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Локишина Л. А. Молекуляр. биология, т. 13, с. 1206—1229, 1979.
2. Galoyan A. A., Akopyan T. N., Karapetyan R. O., Arutunyan A. A., Oganisyan A. I.—In.: Endorphins' 78, Int. Workshop Conf., p. 37—59, Budapest, 1978.
3. Marks N., Suhar A., Benuck M. Neural Peptides and Neuronal Commun. Proc. 2nd Symp., Gardone, v. 1, p. 205—217, N. Y., 1980.
4. Litrens C., Malfroy B., Schwartz J. C., Gacel G., Roques B. R., Roy J., Margat J., Javoy-Agid F., Agid Y. J. Neurochem., v. 39, p. 1081—1089, 1982.
5. Imai K., Hama T., Kato T. J. Biochem., v. 93, p. 431—437, 1983.
6. Shimamura M., Hazato T., Katajama T. Biochim. et biophys. acta, v. 756, p. 223—229, 1983.
7. Marks N., Galoyan A. A., Grynbaum A., Lajtha A. J. Neurochem., v. 22, p. 735—739, 1974.

8. Marks N., Datta R. K., Lajtha A. J. *Neurochem.*, v. 17, p. 53—56, 1970.
9. Sellinger O. Z., Azcurra L. M., Joson D. E., Oglson W. G., Lobin Z. *Nature* v. 230, p. 253—256, 1971.
10. Флёров М. А. *Вопр. мед. химии*, т. 242, с. 174—186, 1978.
11. Whittaker V. P., Michaelson I. A., Kircland R. I. A. *Biochem. J.*, v. 93, p. 293—303, 1964.
12. Шаинская А. М., Генгин М. Т., Березин В. А., Шевченко Г. М., Рева А. Д. Докл. АН УССР, № 7, с. 90—94, 1981.
13. Покровский А. А., Арчаков Л. А., Герасимова А. Н.—В кн.: *Современные методы в биохимии*, с. 38—56, М., Медицина, 1968.
14. Swanson M. A.—In: *Methods enzymology*, v. 2, p. 541—543, N. Y., Acad. Press. 1955.
15. Ellman G. L., Coorthney I. *Biochem. Pharmacol.*, v. 7, № 2, p. 88—95, 1961.
16. Панченко Л. Ф., Шпаков А. А., Дудченко А. М., Ивкова Л. А., Дудченко В. Ф., Капитонов А. Б. *Цитология*, т. 12, с. 1481—1486, 1973.
17. Sottocasa G. L., Kuylenstierna R., Erster L., Bergstrand A. J. *Cell. Biol.*, v. 32, p. 415—438, 1967.
18. Горкин В. З., Веревкина И. В., Гриднева Л. И., Жердева (Брусова) Л. В., Кляшторин Л. Б., Кривченкова Р. С., Комиссарова Н. В., Леонтьева Г. А., Романова Л. А., Северина И. С., Фейгина С. М.—В кн.: *Современные методы в биохимии*, с. 155—177, М., Медицина, 1968.
19. Гулидова Г. П., Сорокина И. П. *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, т. 63, с. 41—44, 1967.
20. Marks N., Lajtha A. *Methods in Enzymology*, v. 19, p. 534—543, N. Y., Acad. Press, 1970.
21. Lowry O. H., Rosebrough M. I., Farr A. G., Randall R. I. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265—275, 1951.
22. Кокуни В. А. *Укр. біохім журн.*, т. 47, с. 776—790, 1975.
23. Паллади А. В., Белик Я. В., Полякова Н. М. *Белки головного мозга и их обмен*, с. 316, Киев, Наукова Думка, 1972.
24. Генгин М. Т., Шаинская А. М., Рева А. Д. *Биохимия*, т. 47, с. 1488—1493, 1982.
25. Nagata Y., Mikoshiba K., Tsucada Y. *Asian. Med.*, v. 19, p. 1211—1219, 1976.
26. Shields D., Blobel E. *J. Biol. Chem.*, v. 253, p. 3753—3761, 1978.
27. Hersh L. B., McKelvy I. F. *J. Neurochem.*, v. 36, p. 171—178, 1980.
28. Pert C. B., Pert A., Chang I. K., Fond B. T. *Science*, v. 194, p. 330—332, 1976.
29. Marks N., DMonte B., Bellman Ch., Lajtha A. *Brain. Res.*, v. 18, p. 309—324, 1970.
30. Зубатов А. С., Лузиков В. Н.—В кн.: *Функциональная активность ферментов и пути её регуляции*, с. 59—70, МГУ, 1981.

Поступила 16. V. 1984



УДК 577.153.3:612.843+617.735—02.156

СВОЙСТВА 5'-НУКЛЕОТИДАЗЫ СЕТЧАТКИ  
ПРИ ЕЕ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ДЕГЕНЕРАЦИИ У КРЫС

ОСТАПЕНКО И. А.

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

Показано, что активность 5'-нуклеотидазы (5-НД) сетчатки у крыс линии Wistar, возрастая в процессе постнатального развития, достигает максимального значения на 8—10-й день развития (400—500 нмоль  $P_i$ /мг белка/мин), после чего она уменьшается в несколько раз в течение последующих 2-х недель, достигая постоянного уровня (120 нмоль  $P_i$ /мг белка/мин). У крыс с наследственной дегенерацией сетчатки (линия Campbell) закономерность изменения 5-НД активности в процессе онтогенеза была такой же, как у крыс линии Wistar. Однако, начиная с 6—7-го дня жизни, активность фермента сетчатки больных крыс на 30—40% была ниже, чем у здоровых. Это наблюдали не только в общей мембранной фракции всей сетчатки, но и в субфракциях плазматических мембран фоторецепторных и нефоторецепторных клеток.

5-НД активность сетчатки белых и здоровых крыс не менялась под действием трипсина и в равной степени (на 40—50%) снижалась при воздействии конканавалина А. ДОХ-На (0,5—0,75%) активировал 5-НД сетчатки больных животных в большей степени, чем здоровых (на 65 и 40% соответственно). Эти различия были обнаружены у 30-дневных животных и отсутствовали у 8—10-дневных крыс.

Ранее было показано, что у крыс с наследственной дегенерацией сетчатки (линия Campbell) активность 5'-нуклеотидазы (К. Ф. 3. 1. 3. 5.) в ней значительно снижена по сравнению со здоровыми животными [1]. Эти отличия проявлялись уже в относительно ранние сроки постнатального развития, то есть до окончания формирования фоторецепторных мембран сетчатки. Причина обнаруженных изменений активности 5-НД оставалась неясной.

5-НД локализована обычно в плазматических мембранах (ПМ) клеток, хотя в некоторых тканях обнаружена и в водорастворимой фракции [2—5]. 5-НД—липидзависимый фермент: под действием некоторых детергентов наблюдали его активацию [7, 8], при солиubilизации и очистке фермент обогащался сфингомиелином, удаление которого снижало его устойчивость фермента к тепловой денатурации [6, 7]. Гомогенная по данным электрофореза 5-НД из ПМ печени содержала 300 молекул фосфолипидов на молекулу белка [8]. 5-НД

является гликопротеидом и ингибируется различными лектинами, в частности конканавалином А [5, 9, 10].

Целью настоящей работы было уточнение динамики изменений активности 5-НД сетчатки у здоровых и больных крыс, начиная с первых дней постнатальной жизни, обнаружение отличий в свойствах 5-НД мембран сетчатки больных животных по сравнению со здоровыми, а также выяснение вопроса, мембраны каких клеток (фоторецепторных, нефоторецепторных) характеризуются изменениями активности 5-НД. В связи с поставленными задачами исследовалось влияние на активность 5-НД сетчатки различных агентов, способных модифицировать активность фермента. Для этого были использованы ДОХ-На, воздействующий на липидное окружение фермента, конканавалин А, взаимодействующий с углеводными компонентами ПМ, и трипсин, модифицирующий белки ПМ; были применены методы субфракционирования для выяснения вопроса о степени изменений активности 5-НД разных фракций сетчатки у больных животных по сравнению со здоровыми.

### Материалы и методы

Работа была выполнена на крысах линии Campbell с наследственной дегенерацией сетчатки и контрольных крысах линии Wistar в возрасте 2—68 дней. Исследовали общую фракцию мембран сетчатки, полученную после центрифугирования гомогената (12000 г, 20 мин), и отдельные фракции, выделенные после центрифугирования гомогената 30 сетчаток в градиенте плотности сахарозы, как описано в работе Stone и соавт. [11]. Содержание родопсина и чистоту фракций определяли, как описано ранее [12]. Активность 5-НД и количество белка оценивали как в работе Чусовой и соавт. [1]. Трипсин («Reanal», Венгрия) использовали в количестве 0,1—1,0 мг/мг белка мембранной фракции, преникубируя пробы в течение 2—30 мин при 20° или 37°, добавляя затем ингибитор трипсина в концентрации, в 3 раза превышающей количество протеолитического фермента. Конканавалин А («Serva», ФРГ) применяли в концентрации 5 мкг/мл инкубационной среды, подвергая пробы инкубации в течение 15 мин при комнатной температуре, затем промывали осадок мембран 3 раза 10 мМ трис-буфером рН 7,4. ДОХ-На использовали в различных концентрациях, преникубируя пробы при комнатной температуре в течение 10 мин.

### Результаты и обсуждение

В первой серии опытов исследовали активность 5-НД общей мембранной фракции сетчатки здоровых и больных крыс в течение первых 2-х месяцев постнатального развития, начиная со 2-го дня жизни. У здоровых животных со 2-го по 8-й день происходило резкое увеличение активности 5-НД (в 17 раз). После этого наблюдалось быстрое падение ферментативной активности (на 10—15-й день жизни) с последующим более плавным снижением активности 5-НД и ее выходом на постоянный уровень примерно с 40—45-го дня постнатального развития (рис. 1). Такое наличие максимума ферментативной активности в сетчатке позвоночных в первые дни постнатального развития

характерно и для некоторых других ферментов, например, глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы [13] и, по-видимому, связано с активными процессами дифференцировки клеток сетчатки в этот период жизни. Изменение активности 5-НД в процессе развития животных описано и для других тканей, например, печени [14].

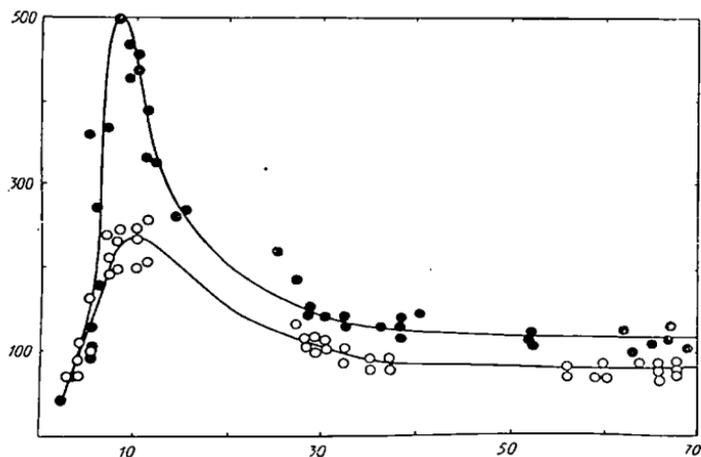


Рис. 1. Активность 5'-нуклеотидазы в сетчатке крыс линий Wistar (●) и Campbell (○) в процессе постнатального развития. По оси абсцисс—дни постнатального развития. По оси ординат—активность фермента (нмоль  $P_i$ /мг белка/мин)

У крыс с наследственной дегенерацией сетчатки активность 5-НД оказалась достоверно ниже на всем протяжении изученного срока, начиная с 6—7-го дня жизни. В первые 5 дней активность 5-НД у обеих линий крыс была примерно равна, а затем у крыс линии Campbell значительно снижалась; при этом зависимость активности 5-НД от сроков постнатального развития у больных крыс была такой же, как у здоровых (ярко выраженный максимум на 8—10-й день постнатального развития). На 10-й день активность 5-НД в сетчатках крыс линии Wistar была в 2 раза, а на 30—60-й день почти в 1,5 раза выше, чем у крыс линии Campbell (рис. 1).

Различия в активности 5-НД между больными и здоровыми животными сохранялись и в субфракциях мембран сетчатки. Из результатов, представленных в табл. 1, видно, что активность 5-НД у крыс линии Campbell ниже, чем у крыс линии Wistar, как во фракциях (1 и 2) фоторецепторных мембран, так и в мембранах, полученных из нефоторецепторных слоев сетчатки (3 и 4 фракции). Наибольшее снижение активности фермента у больных крыс по сравнению со здоровыми было во 2-й фракции, содержащей как наружные, так и внутренние сегменты фоторецепторных клеток и обладающей наиболь-

шей У. А. 5-НД. Этот факт согласуется с результатами исследований Shichi и Somers [15]. Полученные данные свидетельствуют об изменении фоторецепторных и нефоторецепторных ПМ сетчатки и подтверждают постулированное ранее предположение о поражении при пигментном ретините не только фоторецепторных, но и других мембранных структур сетчатки [1].

Таблица 1

Распределение удельной активности 5'-нуклеотидазы по субфракциям сетчатки крыс линии Wistar и Campbell

№ фракции	% сахаразы*	Wistar		Campbell		% снижения активности по сравнению с контролем
		Относительное содержание родонина **	У. А. 5'-нуклеотидазы (нмоль Р <sub>i</sub> /мг белка/мин)	Относительное содержание родонина **	У. А. 5'-нуклеотидазы (нмоль Р <sub>i</sub> /мг белка/мин)	
1	30,5—33	45	238±26	42	178±21	-25
2	33—35,5	11	470±35	18	212±11	-55
3	35,5—38	5	266±21	7	200±13	-24
4	>38	0	157±12	0	140±9	-11

*Примечание.* \* концентрация растворов сахаразы, между которыми располагались фракции мембран сетчатки. \*\* процентное содержание родонина к содержанию белка во фракции.

В следующих сериях опытов было изучено действие трипсина, конканавалина А и ДОХ-На на активность 5-НД общей мембранной фракции сетчатки больных и здоровых крыс (табл. 2). Оказалось, что трипсин в концентрации 0,1—1,0 мг/мг белка сетчатки не оказывал заметного действия на активность этого фермента, что не совпадает с его выраженным действием на 5-НД ПМ печени [8].

Таблица 2

Влияние различных агентов на активность 5'-нуклеотидазы сетчатки крыс линий Wistar и Campbell.

Условия опыта	Изменение активности 5'-нуклеотидазы (в%)	
	Wistar	Campbell
Трипсин	0(7)	0(7)
Конканавалин А	-50±3(12)	-43±4(10)
ДОХ-На (0,5%)	+40±3(17)	+66±5(16)

*Примечание.* В скобках указано количество опытов.

Ранее было показано, что мембраны обломков наружных сегментов палочек и отростков пигментного эпителия здоровых и больных крыс резко отличаются по связыванию лектинов [16, 17]. В то же время именно 5-НД может быть одним из гликопротеидов мембран, взаимодействующих с лектинами [2]. Оказалось, что степень торможения конканавалином А активности 5-НД сетчатки у крыс линии Campbell и линии Wistar была одинаковой и составляла в среднем 40—50% (табл. 2); иными словами, в этих опытах не удалось обнару-

жить различий в свойствах изучаемого фермента у больных и здоровых крыс.

При исследовании действия ДОХ-Na на 5-НД сетчатки были выявлены различия в свойствах фермента у крыс с наследственной дегенерацией сетчатки и здоровых. ДОХ-Na в зависимости от концентрации вызывал различную активацию фермента сетчатки здоровых крыс (от 25 до 70%) (рис. 2). Повышение концентрации ДОХ-Na выше 0,75—1,0% не приводило к дальнейшему повышению активности 5-НД, а при 1,5%-ной концентрации детергента уже наблюдалось незначительное снижение активации фермента. Поэтому в дальнейшем при сравнительном изучении свойств 5-НД сетчаток больных и здоровых крыс использовали 0,5—0,75%-ный ДОХ-Na.

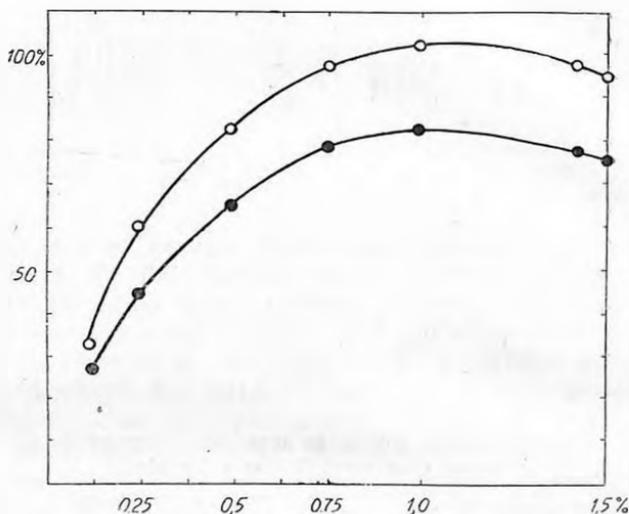


Рис. 2. 5'-нуклеотидазная активность сетчатки 30-дневных крыс линий Wistar (●) и Campbell (○) в присутствии различных концентраций ДОХ-Na. По оси абсцисс—концентрация ДОХ-Na (%). По оси ординат—активация фермента (%).

У крыс с наследственной дегенерацией сетчатки (30-дневные животные) ДОХ-Na при всех использованных концентрациях вызывал значительно большее увеличение активности фермента, чем у здоровых (рис. 2). Эти различия были подтверждены при изучении действия ДОХ-Na на 5-НД активность субфракций ПМ сетчатки (рис. 3). Оказалось, что и у больных, и у здоровых крыс ДОХ-Na активирует 5-НД как фоторецепторных мембран, содержащих родопсин, так и ПМ, не содержащих зрительный пигмент; при этом степень активации 5-НД фракций ПМ сетчатки у больных крыс была более высокая, чем у здоровых (рис. 3), что совпадает с отличиями, обнаруженными в общей мембранной фракции сетчатки. Интересно, что различия в

активации ДОХ-На 5-НД были выявлены только у одномесячных животных, то есть когда закончено формирование наружных сегментов фоторецепторных клеток. Для 8—10-дневных, еще слепых крыс отличий в степени активации ДОХ-На не наблюдали (рис. 3, б). Чтобы исключить возможность того, что активация ДОХ-На и выявленные в этом отношении отличия между 5-НД сетчатки больных и здоровых крыс не были проявлением увеличения доступности 5-НД для субстрата вследствие размыкания замкнутых везикул из ПМ, изучаемые фракции подвергали многократному замораживанию и размораживанию. Такая обработка приводила к потере способности ПМ образовывать

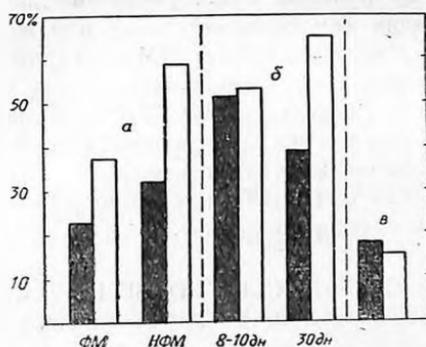


Рис. 3. Влияние ДОХ-На (0,5%) и замораживания на активность 5'-нуклеотидазы сетчатки и ее субфракций у крыс линий Wistar (■) и Campbell (□). По оси ординат—активирование фермента (%). а—влияние ДОХ-На на активность фермента в субфракциях сетчатки 30-дневных крыс: ФМ—субфракция фоторецепторных мембран; НФМ—субфракция нефоторецепторных мембран. б—влияние ДОХ-На на активность фермента в сетчатке крыс в различные сроки постнатального развития. в—влияние 3-кратного замораживания и оттаивания на активность фермента в сетчатке 30-дневных крыс.

замкнутые везикулы и некоторому увеличению активности 5-НД. Однако больные крысы по степени активации 5-НД сетчатки после замораживания и оттаивания не отличались от здоровых, и сама степень активации была значительно ниже, чем под действием ДОХ-На (рис. 3, в).

Активация 5-НД ПМ под действием ДОХ-На, наблюдавшаяся нами в отношении сетчатки, и другими авторами в исследованиях, проводимых на различных объектах [8], могла быть вызвана, с одной стороны, предотвращением агрегации молекул фермента и появлением его только в мономерной более активной форме [18]. Нельзя также исключить возможности, что вследствие солиubilизации детергентом ПМ и удаления части липидов и белков из непосредственного микроокружения 5-НД происходит изменение конформации 5-НД и активности фермента. Возможно, что отличия между больными и здоровыми

ми крысами в степени активации 5-НД под действием ДОХ-На были обусловлены отличиями в липидном составе ПМ сетчатки, так как после действия ДОХ-На, когда многие липидные компоненты удалены из непосредственного микроокружения фермента, в ряде экспериментов активность 5-НД сетчатки больных крыс становилась такой же, как у здоровых. Более сильная активация 5-НД под действием ДОХ-На в сетчатке больных крыс по сравнению со здоровыми может свидетельствовать о большей, чем у крыс линии Wistar ригидности ПМ сетчатки крыс линии Campbell. Повышенная ригидность может быть следствием избыточного присутствия какого-то липидного компонента в ПМ сетчатки больных крыс, увеличивающего вязкость ПМ (например, холестерина или сфингомиелина) или же недостатком липидного компонента, разжижающего ПМ—(например, снижение содержания полиненасыщенных жирных кислот или уровня перекисного окисления липидов в сетчатке) [19]. Такие различия в ригидности ПМ могут исчезать или уменьшаться в присутствии детергента. Задачей дальнейших исследований будет выяснение природы различий в активности и свойствах 5-НД сетчатки здоровых и больных (наследственная дегенерация сетчатки) крыс.

## PROPERTIES OF 5'-NUCLEOTIDASE IN THE NORMAL AND DYSTROPHIC RAT RETINA

OSTAPENKO I. A.

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

The activity of 5'-nucleotidase in the retina of Wistar rats is maximal on the 8–10th day of postnatal development (400–500 nmol Pi/mg/min), during the next 2 weeks it drops reaching permanent level (120 nmol Pi/mg/min). In rats with congenital degeneration of retina (Campbell strain) the same dynamics has been described. But since the 5–6th days of life the activity of 5'-nucleotidase was for 30–40% lower in animals of Campbell strain (both in the total membrane fraction of retina and in the subfractions of plasmatic membranes).

Trypsin didn't change the activity of enzyme and concanavalin A diminished it for 40–50% in both types of animals. Deoxycholate (0,5–0,75%) activated the enzyme in Campbell rats retina for 65%, in Wistars—for 40%. These differences have been detected in 30 day-old animals but not in 8–10 day old ones.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Чусова Г. Г., Остапенко И. А., Этингоф Р. Н. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 93, № 9, с. 305–307, 1981.
2. Дмитренко Н. П. Укр. биохим. журн., т. 53, № 1, с. 114–123, 1981.

3. *Phillips E., Newshole E. A.* J. Neurochem., v. 33, № 2, p. 553—558, 1979.
4. *Stanley K. K., Edwards M. R., Lusio J. P.* Biochem. J., v. 186, № 1, p. 59—69, 1980.
5. *Fukut H., Shichi H.* Arch. Biochim. and Biophys., v. 212, № 1, p. 78—87, 1981.
6. *Widneil C. C.*—In: Methods in Enzymol., v. 32, p. 368—374, (ed. by Colowick S. P., Kaplan N. O.), Acad. Press, 1974.
7. *Merisko E. M. J.* Biol. Chem., v. 256, № 4, p. 1983—1993, 1981.
8. *Nakamura S.* Biochim. et Biophys. Acta, v. 426, № 2, p. 339—347, 1976.
9. *Dornand J., Bonnafous J. C., Mani J. C.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 82, № 2, p. 685—692, 1978.
10. *Lamers J. M., Heyliger C. E., Panagia V., Dhalla N. S.* Biochim. et biophys. acta, v. 742, № 3, p. 568—575, 1983.
11. *Stone W. L., Farnsworth C. C., Dratz E. A.* Exp. Eye Res., v. 28, № 4, 387—397, 1979.
12. *Говардовский В. Н., Остапенко Н. А., Шабанова М. Е., Фукс Б. Б., Этингоф Р. Н.* Нейрофизиология, т. 9, № 5, с. 527—531, 1977.
13. *Bonavita V.*—In: Biochemistry of the retina (ed. by Graymore C. N.), p. 5—13, Acad. Press, L—N. Y., 1965.
14. *Agnisola C.* Mechanism Ageing Develop., v. 13, № 3, p. 227—239, 1980.
15. *Shichi H., Somers R. L.* Photochem. Photobiol., v. 32, № 3, p. 491—495, 1980.
16. *Hall M. O., Nir J.* Exp. Eye Res., v. 22, № 5, p. 469—476, 1976.
17. *McLaughlin B. J., Wood J. G.* Invest. Ophthalm., v. 19, № 7, 728—742, 1980.
18. *Doss R. C., Carraway C. A., Carraway K. L.* Biochim. et biophys. acta, v. 570, № 1, p. 96—106, 1979.
19. *Organisciak D. T., Wang H., Kou A. L.* Exp. Eye Res., v. 34, № 3, 401—412, 1982.

Поступила 30. VII. 1984



УДК 612.58:612.822.1.015.1:577.152.143

## ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ MAO И УЛЬТРАСТРУКТУРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ ХОЛОДОВОМ ВОЗДЕЙСТВИИ

ГОРОШИНСКАЯ И. А., ФЕДОРЕНКО Г. М., ХОДАКОВА А. А.

Научно-исследовательский биологический институт Госуниверситета  
им. М. А. Сулово, Ростов-на-Дону

В условиях холодого стресса снижается активность и изменяется субстратная специфичность MAO типа А в митохондриальной фракции мозга, что сопровождается появлением моноаминдезаминирующей активности в цитоплазме. Электронно-микроскопическое исследование выявило набухание митохондрий и просветление их матрикса. Полученные данные свидетельствуют о нарушении структуры и проницаемости мембран при холодогом воздействии.

Ранее установлено, что в условиях холодого стресса происходит изменение субстратной специфичности митохондриальной MAO [амино: кислород-оксидоредуктаза (дезаминирующая) (флавинодержащая), КФ 1.4.3.4], ключевого фермента моноаминергических медиаторных систем, и показана возможная роль этих изменений в механизме холодого повреждения [2, 3]. Различают две формы фермента: MAO А, субстратами которой являются серотонин и норадреналин, ингибитором—хлоргиллин, и MAO Б, субстраты— $\beta$ -фенилэтиламин, бензиламин, метилгистамин, ингибитор—депренил [4, 5]. MAO является типичным митохондриальным ферментом, локализованным на наружной мембране митохондрий и рассматриваемым в качестве маркерного фермента этой мембраны [6].

С целью изучения влияния холода на структуру и проницаемость мембран была исследована возможность выхода митохондриальной MAO в цитоплазму и проведено электронно-микроскопическое исследование структур мозга в условиях холодого стресса.

## Материалы и методы

Объектом исследования служили взрослые беспородные белые крысы обоего пола массой 150—180 г. Опыты проводили в зимние месяцы (январь—февраль). Животных помещали в холодую камеру при 2° на 1, 3 и 45 суток. На 3-и сутки наиболее выражена стрессовая реакция, к 45-м суткам наступает адаптация к холоду [3, 7]. Контролем служили крысы, взятые из этой же группы и содержавшиеся

такое же время в условиях вивария при температуре 20—22°. Обе группы крыс получали одинаковый рацион.

Животных декапитуировали и всю дальнейшую обработку ткани мозга проводили на холоду. Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования [8]. Активность МАО определяли в митохондриальной фракции и супернатанте, содержащем микросомы, лизосомы и растворимые компоненты. О дезаминировании серотонина и глюкозамина судили по образованию аммиака после инкубации суспензии митохондрий или супернатанта с одним из субстратов. Серотонинкреатининсульфат использовали в конечной концентрации 2,5 мМ, глюкозамин-гидрохлорид—10 мМ. Инкубацию проводили в воздушной среде при 37,5° и рН 7,45 в течение 30 мин [9]. Содержание аммиака определяли спектрофлуориметрическим методом на флуориметре «Hitachi 650-60» [10] после изотермической отгонки [11]. Белок определяли модифицированным методом Lowry и соавт. [12].

При исследовании влияния ингибиторов МАО хлоргиллина и депренила суспензию митохондрий или супернатант преинкубировали с одним из ингибиторов в течение 15 мин при 20°. Ингибиторы использовали в концентрации 10<sup>-6</sup> М, при которой они обладают максимально избирательным действием [4]\*.

Электронно-микроскопические исследования проведены на животных только в условиях холодового стресса на 1- и 3-и сутки воздействия. Кусочки мозга объемом до 1 мм<sup>3</sup> из области коры больших полушарий и крыши среднего мозга фиксировали в глутаральдегиде на фосфатном буфере, а затем в OSO<sub>4</sub>. Заливку материала проводили в эпон-аралдите. Ультратонкие срезы, полученные на ультрамикротоме BS 490 А «Tesla», дополнительно окрашивали в синий свинца и в уранил-ацетате [13]. Срезы исследовали в электронном микроскопе В S-242 Е «Tesla».

### Результаты и обсуждение

При кратковременном действии холода (3-е суток) установлено снижение активности МАО А (субстраты серотонин и норадреналин) в митохондриальной фракции мозга на 28—29% и изменение субстратной специфичности фермента. МАО приобретает способность дез-

Таблица 1

Дезаминирование азотистых соединений митохондриями и супернатантом мозга крыс при действии холода (нмоль азота аммиака/мг белка/мин)

Условия опыта	Митохондрии			Супернатант	
	Серотонин	Глюкозамин	Норадреналин	Серотонин	Глюкозамин
Контроль	8,00±0,47 (18)	0,21±0,09 (18)	5,46±0,44 (13)	0,44±0,18 (19)	0,09±0,05 (20)
3 суток, 2°	5,73±0,42 (16)	3,54±0,46 (14)	3,85±0,65 (12)	1,56±0,15 (22)	1,64±0,23 (17)
р	<0,01	<0,001	<0,05	<0,001	<0,001
Изменения к контролю, в %	-28%	+156%	-29%	+251%	+168%
45 суток, 2°	6,56±0,70 (9)	0,29±0,19 (10)	3,69±0,30 (19)	0,16±0,10 (19)	0,32±0,12 (10)
р	>0,05	>0,05	<0,01	>0,05	>0,05

Примечание. В скобках указано число опытов

аминировать глюкозамин со скоростью, являющейся величиной одного порядка с интенсивностью дезаминирования моноаминов (табл. 1).

\* Ингибиторы МАО депренил и хлоргиллин, полученные, соответственно, от д-ра К. Мадьяр (институт фармакологии медицинского университета, Будапешт, Венгрия) и д-ра Г. Д. Барбер (фирма «May and Baker», Англия), были любезно предоставлены проф. В. З. Горкиным.

Значительно увеличивается и интенсивность дезаминирования путресцина и ГАМК, в норме не являющихся субстратами МАО [3]. Активность МАО Б (субстрат п-нитрофенилэтиламин) не изменяется при 3-суточном действии холода [3].

Таким образом, в условиях холодового стресса (при 3-суточном действии холода) имеет место изменение каталитических свойств МАО. В результате этого снижается интенсивность дезаминирования моноаминов, и фермент приобретает способность дезаминировать другие азотистые соединения, в норме не относящиеся к числу субстратов МАО. Такое изменение свойств МАО обнаружено при других патологических состояниях, сопровождающихся стимулирующей перекисного окисления липидов: лучевом поражении, гипервитаминозе Д<sub>2</sub>, злокачественных опухолях [14], гипероксии [15], гипоксии [16].

Изменение активности и субстратной специфичности МАО при холодовом стрессе позволяет предположить, что одной из причин этого может быть нарушение связи фермента с мембраной митохондрий. В связи с этим исследовали ультраструктуру митохондрий и активность фермента в супернатанте после их удаления.

У интактных животных активность МАО в супернатанте отсутствовала у 11 животных из 19 исследованных или была очень низка, в среднем в 20 раз ниже, чем в митохондриальной фракции. Не наблюдалось также дезаминирования глюкозамина в супернатанте (табл. 1).

В условиях холодового стресса (3 суток, 2°), наряду со снижением активности МАО А в митохондриях, наблюдается усиление моноаминдезаминазной активности в супернатанте. Интенсивность дезаминирования серотонина в супернатанте возрастает в 3,5 раза и становится величиной одного порядка с активностью фермента в митохондриальной фракции. При этом в супернатанте появляется способность дезаминировать глюкозамин, интенсивность которого превышает контрольный уровень почти в 18 раз.

В условиях холодовой адаптации (45 суток, 2°) моноаминоксидазная активность в митохондриях увеличивается по сравнению с холодовым стрессом, но не достигает контрольного уровня. При этом субстратная специфичность фермента нормализуется, о чем свидетельствует отсутствие способности дезаминировать глюкозамин. В супернатанте у адаптированных, к холоду животных уровень дезаминирования как серотонина, так и глюкозамина достоверно не отличается от контроля (табл. 1).

В условиях холодового стресса преинкубация с хлоргидрином препятствует появлению способности митохондриальной МАО дезаминировать глюкозамин в супернатанте и митохондриальной фракции (табл. 2). Ингибитор МАО Б депрессил такой способностью не обладает. Это показано при гипоксии [16], гипероксии [17] и ряде других воздействий, сопровождающихся изменением субстратной специфичности МАО [18].

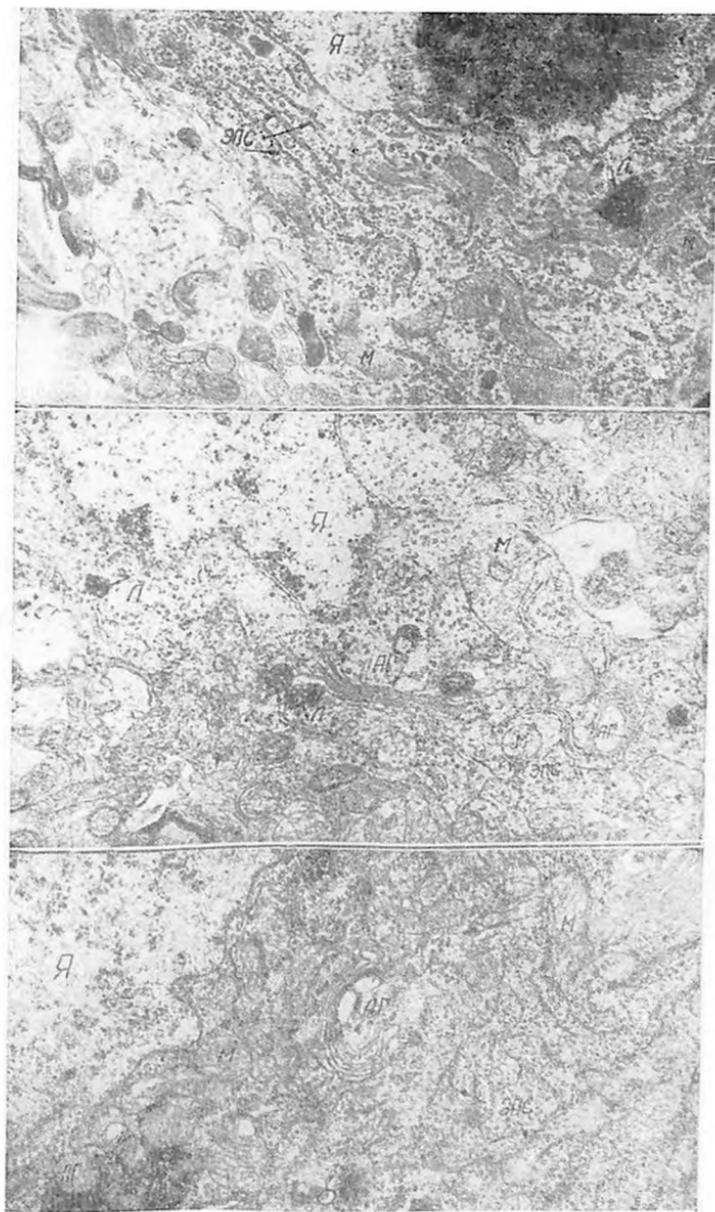


Рис. Нейроны коры среднего мозга крысы, а—контроль, б—после 1-суточного холодного воздействия, а—после 3-суточного холодного воздействия.  $\times 35\ 000$ . АГ—аппарат Гольджи, Л—лизосома, ЛГ—липофусциновая гранула, М—митохондрия, ЭПС—эндоплазматическая сеть, Я—ядро.

Электронные микрофотографии нейронов мозга животных после односуточного действия холода выявили некоторые изменения ультраструктуры внутриклеточных органондов. Наиболее заметные изменения обнаружены в митохондриях (рис., б). Почти все они выглядели набухшими, их матрикс менее электронноплотен, число крист значительно меньше, чем в контроле (рис., а). Канальцы эндоплазматической сети (ЭПС) несколько расширены. Размер лизосомоподобных структур меньше, чем в норме, их диаметр лежит в пределах  $1-2 \cdot 10^{-7}$  м (в норме— $2-5 \cdot 10^{-7}$  м).

Таблица 2

Влияние ингибиторов МАО на дезаминирование азотистых соединений митохондриями и супернатантом мозга крыс при кратковременном действии холода (нмоль азота аммиака/мг белка/мин)

Состав проб	Митохондрии		Супернатант	
	Серотонин	Глюкозамин	Серотонин	Глюкозамин
Без ингибитора	$5,100 \pm 0,610$ (10)	$4,79 \pm 0,55$ (11)	$1,228 \pm 0,293$ (8)	$1,538 \pm 0,177$ (8)
Хлоргиллицил	$0,40 \pm 0,27$ (10)	$0,84 \pm 0,39$ (10)	$0,038 \pm 0,026$ (7)	$0,071 \pm 0,038$ (8)
р	$< 0,001$	$< 0,001$	$< 0,01$	$< 0,001$
Деспренил	$4,26 \pm 0,35$ (9)	$3,94 \pm 0,54$ (10)	—	—
р	$> 0,05$	$> 0,05$	—	—

Примечание. В скобках указано число опытов

После 3-суточного действия холода характер набухания митохондрий изменился: наряду с ненабухшими в нейронах встречаются частично набухшие митохондрии (рис., в). Заметного расширения канальцев ЭПС в этих случаях нами не отмечено. Диаметр лизосом меньше, чем в предыдущем случае и равен  $5-10 \cdot 10^{-8}$  м. Довольно часто встречаются липофусциновые гранулы диаметром около  $1 \cdot 10^{-6}$  м, отмечаемые некоторыми авторами как разновидность лизосом [19].

Характер и направленность ультраструктурных изменений в нейронах изученных разделов коры больших полушарий и крыши среднего мозга одинаковы, хотя степень их несколько выше в среднем мозгу.

Снижение в условиях холодового стресса активности МАО в митохондриях и появление активности в цитоплазме позволяют предположить, что одним из механизмов ингибирования фермента может быть нарушение его связи с митохондриальными мембранами. В пользу этого предположения можно отнести отмеченный нами факт набухания митохондрий и просветления их матрикса, так как, по мнению ряда авторов [20, 21], с набуханием митохондрий связано изменение проницаемости их мембран.

Изменение субстратной специфичности МАО происходит, по-видимому, в результате окисления сульфгидрильных групп фермента с

последующим нарушением третичной структуры и изменением конфигурации активного центра [14], что в значительной степени обусловлено липидными перекисями. При холодовом воздействии увеличение интенсивности перекисного окисления липидов в мозгу наблюдается в первые сутки пребывания на холоду, достигая максимума на 3-и сутки [1], то есть именно тогда, когда обнаруживается изменение субстратной специфичности MAO в митохондриях и появление моноаминдезаминазной активности в супернатанте.

С усилением перекисного окисления липидов связано, вероятно, и увеличение при холодовом стрессе количества липофусциновых гранул, обнаруженное электронно-микроскопическими исследованиями. Связь между увеличением отложения липофусцина в нервных клетках и интенсификацией перекисного окисления липидов показана при шизофрении [22].

Деаминазирование глюкозамина, входящего в состав гликопротеидов и гликолипидов, модифицированной MAO, может являться одной из причин нарушения структуры и проницаемости мембран при экстремальных воздействиях. Таким образом, с одной стороны, повреждение мембран является одним из факторов изменения мембраносвязанных ферментов, в том числе MAO, а с другой стороны, изменение каталитических свойств MAO может, в свою очередь, способствовать дальнейшему нарушению мембранных структур.

В условиях холодового стресса обнаружено снижение уровня кислых пептидгидролаз в лизосомной фракции и увеличение их активности в надосадочной фракции [1], что в сопоставлении с отмеченным нами значительным уменьшением размеров лизосом, по-видимому, свидетельствует об изменении проницаемости лизосомных мембран.

Холодовой стресс вызывает также увеличение проницаемости мембран эритроцитов, следствием чего является возрастание в сыворотке крови активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, уровня внеэритроцитарного гемоглобина и суммарной пероксидазной активности [23].

Таким образом, можно считать, что характерным для холодового стресса является нарушение мембранных структур всех типов с изменением их проницаемости и свойств мембраносвязанных ферментов.

Адаптация к холоду, напротив, способствует стабилизации мембранных структур, о чем свидетельствуют как наши данные по исследованию митохондриальной MAO (табл. 1), так и имеющиеся в литературе сведения о состоянии лизосомных ферментов [24].

# RAT BRAIN MONOAMINE OXIDASE ACTIVITY AND BRAIN ULTRASTRUCTURES UNDER EXPOSURE TO COLD

GOROSHINSKAYA I. A., FEDORENKO G. M., KHODAKOVA A. A.

Research Institute of Biology, Rostov-on-Don State University

Exposure to cold induced decrease in monoamine oxidase type A activity and altered the enzyme's substrate specificity in rat brain mitochondrial fraction. These changes were accompanied by appearance of monoamine oxidase activity in the supernatant fraction. Electron-microscopic study reveals swelling of mitochondria. Data obtained point to the membrane structure damage under cold stress.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ломакина Л. В. Укр. биохим. журн., т. 52, № 3, с. 305—308, 1980.
2. Горошинская И. А., Кричевская А. А., Броницкая З. Г. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 41, № 4, с. 431—433, 1981.
3. Горошинская И. А., Грабовскова Л. Л., Броницкая З. Г., Кричевская А. А., Физиол. журн. СССР, т. 67, № 11, с. 1611—1616, 1981.
4. Yang H.—Y., Neff N. H. J. Pharmacol. and Exp. Ther., v. 187, p. 365—371, 1973.
5. Waldmeier P. C., Feldtrauer J.—J., Matter L. J. Neurochem., v. 29, № 5, p. 785—790, 1977.
6. Greenawalt J. W., Schnaitman C. J. Cell. Biol., v. 46, № 1, p. 173—179, 1970.
7. Козина Л. С., Шугалей В. С. Физиол. журн. СССР, т. 63, № 8, с. 1189—1202, 1977.
8. Москвитина Т. А.—В кн.: Современные методы в биохимии (под ред. В. Н. Ореховича), с. 22—26, М., Медицина, 1977.
9. Горкин В. З., Веревкина И. В., Гриднева Л. И., Жердева (Брусова) Л. В., Кляшторин Л. Б., Кричевская Р. С., Комиссарова Н. В., Леонтьева Г. А., Романова Л. А., Северина И. С., Фейгина С. М.—В кн.: Современные методы в биохимии (под ред. В. Н. Ореховича), с. 155—177, М., Медицина, 1968.
10. Sugawara K., Oyama F. J. Biochem., v. 89, № 3 p. 771—774, 1981.
11. Seligson D., Seligson H. J. Lab. Clin. Med., v. 38, p. 324—330, 1951.
12. Schacterle G. R., Pollack R. L. Anal. Biochem., v. 51, № 2, p. 654—655, 1973.
13. Гайэр А. Электронная гистохимия, М., Мир, 1973.
14. Горкин В. З. Молекуляр. биология, т. 10, № 4, с. 717—736, 1976.
15. Горошинская И. А., Броницкая З. Г. Вopr. мед. химии, т. 22, № 4, с. 558—562, 1976.
16. Горошинская И. А., Броницкая З. Г., Кричевская А. А., Кабарухина Е. Г. Нейрохимия, т. 1, № 3, с. 282—286, 1982.
17. Goroshinskaya I. A., Bronovitzkaya Z. G., Gorkin V. Z. Communications in Psychopharmacology, v. 1, № 1, p. 39—47, 1977.
18. Горкин В. З. Хим.-фармацевт. журн., т. 11, № 1, с. 6—13, 1977.
19. Питерс А., Палей С., Узбестер У. Ультраструктура нервной системы, М., Мир, 1972.
20. Машанский В. Ф., Вициченко Л. Н., Комиссарчик Я. Ю., Мосевич Т. К., Дукаева С. Е.—В сб.: Материалы V Всесоюз. симпозиума по биохимии митохондрий, с. 8—18, М., Наука, 1971.
21. Нейфах С. А., Немчинская В. Л., Ганухоки Н. С., Ганелина П. Ш. Докл. АН СССР, т. 154, с. 1202—1205, 1964.

22. Андерс В. Н., Орловская Д. Д. Журн. невропатол. и психиатрии, т. 82, № 7, с. 1071—1077, 1982.
23. Горошинская И. А., Ананян А. А., Цветненко Е. З., Кришаская А. А.—В сб.: Важнейшие теоретические и практические проблемы терморегуляции, с. 75—76, Новосибирск, 1982.
24. Горошинская И. А., Ломакина Л. В., Ананян А. А., Шугалей В. С.—В сб.: Адаптивные функции головного мозга, с. 61, Баку, 1980.

Поступила 10. XI. 1984



УДК 612.827.612.143

## ВЛИЯНИЕ НА ПАМЯТЬ ЖИВОТНЫХ ИЗМЕНЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ МОНОАМИНЕРГИЧЕСКИХ СИСТЕМ МОЗГА ПРИ ДЕЙСТВИИ ДИСУЛЬФИРАМА И L-ДОФА

АГЪВАЗАШВИЛИ И. М., ИОРДАНИШВИЛИ Г. С., НИКОЛАИШВИЛИ М. И.

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

Показано, что однократная внутривentricularная инъекция 100 мг/кг дисульфирама вызывала значительные сдвиги в метаболизме катехоламинов в ткани головного мозга крыс, но формирование эмоциональной реакции страха и условного рефлекса двустороннего избегания у них при этом не нарушалось. Ежедневное введение препарата не препятствовало формированию реакции избавления от безусловного болевого раздражителя, но предотвращало выработку условного рефлекса двустороннего избегания. Однократная инъекция L-ДОФА в дозе 100 мг/кг вызывала увеличение содержания дофамина и норадреналина в головном мозгу, а также их соотношения к серотонину и облегчала сохранение условной реакции страха. Ежедневная инъекция L-ДОФА затрудняла выработку условного рефлекса двустороннего избегания. Полученные данные свидетельствуют о существовании определенного оптимального диапазона концентраций и соотношений количеств норадреналин/серотонин и норадреналин/дофамин в мозгу, в пределах которого катехоламинергические механизмы реализуют максимальное участие в процессах обучения и памяти.

В последнее время появилось большое количество противоречивых данных, касающихся вопроса о роли биогенных аминов в высшей нервной деятельности, в организации сложных процессов памяти [1—5]. В частности, существует разногласие в оценке эффектов серотонина (5-ОТ), норадреналина (НА) и их предшественников на обучение и формирование разных форм памяти животных [1—5], что затрудняет обобщение и систематизацию экспериментального материала. Очевидно, что только дальнейшее накопление фактических данных даст возможность определить подлинную роль аминов в процессах обучения и памяти. В связи с этим целью настоящей работы было исследование влияния изменения функционального состояния моноаминергических систем головного мозга на формирование условно-рефлекторной и образной памяти животных.

### Материалы и методы

Опыты проводили на беспородных белых крысах-самцах массой 150—200 г. Для воздействия на норадренергические механизмы мозга использовали ингибитор

синтеза НА—дисульфирам (антабус), снижающий содержание НА путем блокирования дофамин- $\beta$ -гидроксилазы [6, 7]. Для повышения общего содержания НА вводили его предшественник L-ДОФА. Дисульфирам и L-ДОФА вводили животным внутривенно. Контрольным крысам вводили в том же объеме физиологический раствор. Содержание катехоламинов (КА) и серотонина в разных структурах головного мозга (в передней и задней половине больших полушарий, в гиппокампе и четверохолмии) определяли по методу тонкослойного распределения дансильпроизводных [7]. Производили расчет изменения количественного соотношения между аминами в этих же структурах, так как для поддержания нормального уровня функциональной активности ЦНС важное значение имеет не только общее содержание биогенных аминов, но и соотношение между ними [1—11]. Исходя из этого, определяли количественное соотношение между НА и 5-ОТ, а также дофамином (ДА) и 5-ОТ. Данные обработаны статистически [14].

Для исследования образной памяти у крыс была использована методика, согласно которой условная реакция пассивного избегания (УРПИ) или эмоциональная реакция страха у крыс формируется после первого же болевого раздражения и удерживается в памяти неделями и месяцами, не требуя повторного подкрепления. Поэтому, в соответствии с классификацией Бериташвили [9], данное поведение можно считать проявлением образной памяти. Следует отметить, что проверку сохранения эмоциональной реакции страха или УРПИ производили в разное время от момента выработки: через 15—30 мин, на 2- или 3-й день, а также через более длительные интервалы времени. С этой целью крысу вновь сажали в светлое отделение камеры и наблюдали за ее поведением. Если в течение 1 мин крыса не проникла внутрь темной камеры, то УРПИ считали сохраненной. Подробное описание использованной методики дано в ряде публикаций [1, 10, 11].

С целью изучения долговременной условно-рефлекторной памяти у крыс выработывали условный рефлекс двустороннего избегания (УРДИ). Опыты проводили в небольшой камере (47×60 см), разделенной перегородкой высотой 12 см на два отсека. Каждое отделение камеры имело решетчатый пол, через который попеременно пропускали электрический ток напряжением 20—30 В, сочетавшийся с действием условных сигналов. Крысу обучали перепрыгивать на сигнал (свет лампочки) через барьер из одного отсека в другой, свет включали через 1—1,5-минутные интервалы и подкрепляли на 5-й раз электрическим раздражением. В день опыта животным предъявляли по 20 сочетаний. Поведение считали закрепленным, если у крыс в ответ на условный сигнал количество правильных реакций в течение 3-х дней работы подряд составляло не менее 90%.

## Результаты и обсуждение

Проведенные исследования показали, что дисульфирам в дозе 100 мг/кг спустя 1 ч после инъекции вызывал значительное снижение содержания НА во всех изученных структурах головного мозга (рис. 1), при этом в различных структурах изменения количества НА были выражены в разной степени. Полученные результаты указывают, что дисульфирам вызывал снижение количества НА в структурах гиппокампа на 44%, а в передней половине больших полушарий—на 36%. Эти изменения статистически достоверны ( $p < 0,05$ ). В структурах задней половины полушарий и в четверохолмии изменения количества НА оказались соответственно равны 24 и 46%. Особого внимания заслуживает резкое снижение содержания НА в гиппокампе, которому приписывается важное значение в формировании эмоционально-мотивированных поведенческих актов [12].

Расчеты показали также значительный дисбаланс между моно-

амнинами. Так, после инъекции препарата у крыс соотношение НА/5-ОТ в передней половине полушарий снижалось на 42%, а в структурах гиппокампа и четверохолмия—в среднем на 48%. Эти изменения также статистически достоверны ( $p < 0,05$ ).

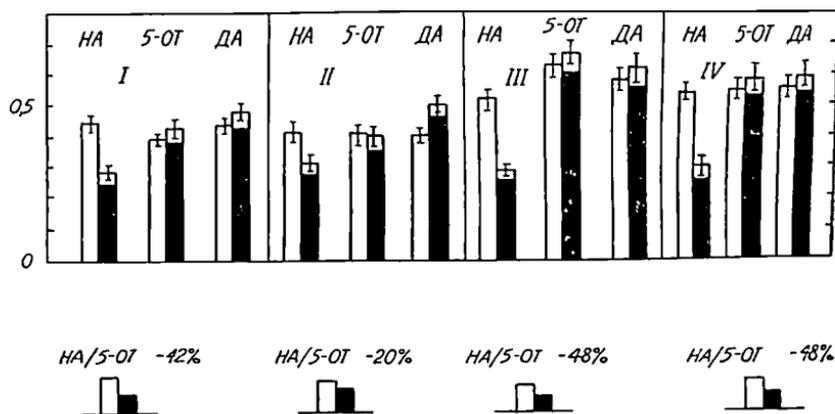


Рис. 1. Влияние дисульфирама на содержание биогенных аминов (в мг/кг влажной ткани, по оси ординат) в разных отделах головного мозга крыс (средние данные 6-и опытов). I—передняя часть больших полушарий мозга; II—задняя часть больших полушарий мозга; III—гиппокамп; IV—четверохолмие. НА—норадреналин, 5-ОТ—серотонин, ДА—дофамин, □—контроль, ■—дисульфирам; НА/5-ОТ—соотношение норадреналина и серотонина.

В то же время, как показали поведенческие опыты, при инъекции дисульфирама в дозе 100 мг/кг, несмотря на значительное снижение НА в структурах головного мозга, формирование эмоциональной реакции страха у крыс не нарушалось. После выработки УРПИ сохранение реакции страха у подопытных крыс почти не отличалось от сохранения УРПИ у контрольных. Кроме того, поведенческие опыты показали также, что однократная инъекция дисульфирама практически не нарушала формирования и закрепления УРПИ.

При ежедневных инъекциях препарата у крыс наблюдали полное угнетение процесса выработки условного поведения. Общая доза препарата, полученная животными за время экспериментов, длившихся в течение 8 дней, равнялась 800 мг/кг. За это же время было произведено более чем 160 сочетаний света лампочки с электрическим раздражением лап. В течение опытов латентный период избавления от болевого безусловного раздражителя колебался изо дня в день, но все же было отмечено постепенное его уменьшение (до 1—2 с). Однако только у одной из 5 подопытных крыс на 6-й день опытов было зарегистрировано лишь три случая условно-рефлекторного избегания. Иными словами, при ежедневном введении дисульфирама у крыс реакция избавления от электрического раздражения формировалась,

но практически полностью была исключена возможность выработки УРПИ.

В следующей серии опытов (рис. 2) изучали влияние изменения содержания КА в ткани мозга, вызванные инъекцией L-ДОФА, на эмоциональную реакцию страха и условно-рефлекторную память. Литературные данные об изменении содержания КА в мозгу при введении L-ДОФА противоречивы. В одних исследованиях [4] при этом было найдено повышенное содержание как ДА, так и НА, в других [13] повышение содержания НА в мозгу обнаружено не было, хотя уровень содержания ДА значительно возрастал. Было показано так-

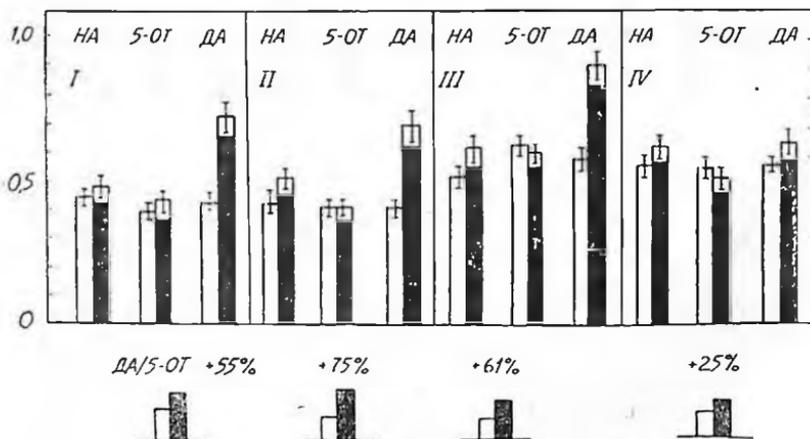


Рис. 2. Влияние L-ДОФА на содержание биогенных аминов (в мг/кг влажной ткани, по оси ординат) в разных отделах головного мозга крыс (средние данные 6-и опытов). Обозначения те же, что и на рис. 1. ДА/5-ОТ—количественное соотношение дофамина и серотонина.

же, что введение L-ДОФА активно стимулировало синтез ДА, вызывая одновременно и соответствующее снижение концентрации 5-ОТ [13].

Нами было установлено, что L-ДОФА в дозе 100 мг/кг через 4 ч после его введения приводил к увеличению содержания в ткани мозга крыс как НА, так и ДА (рис. 2). При этом статистически достоверное увеличение количества ДА имело место во всех исследуемых структурах мозга, кроме четверохолмия. Расчеты показали, что статистически достоверные увеличения соотношения ДА/5-ОТ отмечаются в передней половине больших полушарий на 55%, в структурах задней половины полушарий и в четверохолмии — на 75 и 61% соответственно ( $p < 0,05$ ).

В экспериментах по изучению поведенческих реакций было установлено, что одноразовое введение 100 мг/кг L-ДОФА не препятствовало формированию и последующему воспроизведению эмоциональ-

ной реакции страха у крыс. Однако было замечено, что с 10 дня тестирования число крыс с сохранением реакции страха в подопытной группе всегда было больше, чем в контрольной, что, по-видимому, отражало некоторую тенденцию к улучшению сохранения следов эмоциональной памяти.

Значительные изменения были обнаружены при выработке УРДИ на фоне хронических ежедневных инъекций 100 мг/кг L-ДОФА. Напомним, что опыты с выработкой УРДИ начинали через 1 ч после инъекции препарата. На первое электрическое раздражение у большинства крыс отмечалось развитие сильной эмоциональной реакции страха, которая выражалась в писк, хаотических побежках с дефекацией и уринацией. При повторных сочетаниях поведение животных становилось еще более хаотичным: крысы наталкивались на стены камеры, постоянно подпрыгивая; учащалась дефекация. Сильная хаотическая двигательная и эмоциональная активность вызывала задержку избегания от безусловного раздражителя: животные, в отличие от контрольных, с очень большой задержкой (15—20 с) перепрыгивали в безопасный отсек камеры. Состояние повышенной двигательной и эмоциональной активности у крыс в ответ на электрическое раздражение было отмечено и на 2- и 3-й день опытов. На 3—4-й день у некоторых крыс стали проявляться реакции избегания на условный сигнал, но они имели спорадический характер. В течение одного дня из 20 предъявлений условного сигнала было лишь 2—3 случая УРДИ; у одной крысы наблюдали некоторые симптомы, напоминающие развитие состояния невроза. Они выражались почти в полном отказе перепрыгивать через барьер не только на условное, но и безусловное раздражение: при нанесении электрического удара крыса беспокойно двигалась на одном месте, или, съездившись, дрожала и лишь редко, когда электрическое раздражение продолжалось (в течение 30—40 с), она перепрыгивала в безопасный отсек.

Максимальное количество УРДИ на 5—6-й дни опытов у крыс составляло в среднем 15—20%, в то время как у контрольных на 5-й день оно достигало 75, а на 7—8-й день—90—100%. Прекращение введения препарата с 9 дня опытов очень незначительно увеличивало у некоторых крыс число УРДИ, в среднем достигавшее 20—30% от общего количества предъявленных за день условных стимулов.

Следовательно, ежедневные введения 100 мг/кг L-ДОФА у крыс вызывают достоверное затруднение в процессе выработки и воспроизведения УРДИ.

Нарушение нормального процесса выработки условного оборонительного поведения при хронических инъекциях L-ДОФА, очевидно, было связано с развитием у крыс сильной эмоциональной реакции страха в ответ на электрическое раздражение. Хаотическая двигательная и эмоциональная активность, которая наблюдалась у крыс во время страха, препятствовали формированию прочной ассоциации между нервными структурами, воспринимающими световой раздра-

житель, и комплексом нервных структур, обуславливающих реакцию избавления от него.

Таким образом, на основании проведенных экспериментов выяснилось, что изменение функционального состояния моноаминергических систем мозга с помощью однократового введения L-ДОФА или дисульфирама в дозах 100 мг/кг существенно не отражается ни на формировании эмоциональной реакции страха, ни на выработке и последующем воспроизведении УРДИ. Хронические же, ежедневные инъекции этих препаратов в тех же дозах вызывали резкие изменения высшей нервной деятельности животного: в результате инъекции L-ДОФА формирование УРДИ сильно угнеталось, а при ежедневных инъекциях дисульфирама выработка такого поведения практически полностью исключалась.

Отсутствие эффекта при однократовой инъекции дисульфирама и L-ДОФА в дозе 100 мг/кг на применяемые нами поведенческие тесты дает основание заключить, что не всякое нарушение метаболизма НА в ткани головного мозга и изменения его количественного соотношения к 5-ОТ могут отрицательно отразиться на процессе формирования индивидуальной памяти животного. Полученные данные указывают на существование определенного оптимального диапазона концентрации и соотношения НА/5-ОТ и НА/ДА в ткани мозга, в пределах которого катехоламинергические механизмы мозга реализуют свое максимальное участие в процессах памяти [1]. Отклонение от этого диапазона, очевидно, влечет за собой нарушение механизмов индивидуальной памяти. Об этом свидетельствуют и данные, согласно которым резкое снижение содержания НА в ткани мозга, достигнувшееся однократовой инъекцией 300 мг/кг дисульфирама, полностью предотвращало выработку УРДИ [1]. Возможно, что сходный эффект мы наблюдали и в наших опытах при хронических ежедневных инъекциях дисульфирама и L-ДОФА.

## MEMORY AND FUNCTIONAL ACTIVITY OF BRAIN MONOAMINEERGIC SYSTEMS UNDER THE EFFECT OF DISULPHIRAM AND L-DOPA

AIVAZASHVILI I. M., IORDANISHVILI G. S., NIKOLAISHVILI M. I.

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

A single intraperitoneal injection of disulphiram (100 mg/kg) was shown to produce considerable changes in the catecholamine metabolism in the rat brain tissue. However, the building of the emotional reaction of fear and conditioned reflex of the double avoidance under these conditions was not disturbed. Daily injections of the drug did not interfere with the building of avoidance reaction but prevented the elaboration of conditioned reflex of the double avoidance. A single injection of L-DOPA

(100 mg/kg) called forth the increase in dopamine (DA) and noradrenaline (NA) content in the brain, as well as their ratio to serotonin (5-HOT), and facilitated the retention of fear conditioned reaction; while its daily injection hampered the elaboration of conditioned reflex of double avoidance. Data obtained speak in favour of the existence of an optimal range of concentration and ratio of NA/5-HOT and NA/DA in brain and within this range the optimal participation of catecholaminergic mechanisms in learning and memory.

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Кругликов Р. И.* Нейрохимические механизмы обучения и памяти (под ред. М. Н. Ливанова), М., Наука, 1981.
2. *Кометиани П. А., Алексидзе Н. Г., Клейн Е. Э.* Нейрохимические аспекты памяти (под ред. Р. И. Кругликова), Тбилиси, Мецниереба, 1980.
3. *Громова Е. А.* Успехи физиол. наук, т. 8, с. 24—44, 1977.
4. *Громова Е. А.* Эмоциональная память и ее механизмы, М., Наука, 1980.
5. *Семенова Т. П.*—В кн.: Структуро-функциональные основы механизмов памяти (под ред. Е. А. Громовой), с. 120—133, М., Наука, 1973.
6. *Ильченко Р. Ю.* Фармакология поведения и памяти (под ред. А. Д. Слюмина), Новосибирск, Наука, 1972.
7. *Чилингаров А. О.* Сообщ. АН ГССР, т. 65, № 2, с. 461—463, 1972.
8. *Кругликов Р. И., Орлова Н. В.* Журн. высш. нервн. деят-сти, т. 26, с. 120—126, 1976.
9. *Бериташвили Н. С.* Память позвоночных животных, ее характеристика и происхождение (под ред. С. А. Чепунова), Тбилиси, Мецниереба, 1974.
10. *Айвазашвили Н. М., Норданишвили Г. С., Чикваидзе В. Н.* Докл. АН СССР, т. 212, № 6, с. 1479—1480, 1973.
11. *Айвазашвили Н. М., Норданишвили Г. С.* Сообщ. АН ГССР, т. 77, № 3, с. 701—703, 1975.
12. *Виноградова О. С.* Гиппокамп и память (под ред. М. Н. Ливанова), М., Наука, 1975.
13. *Алликметс М. Ж.* Уч. зап. Тартуск. госуниверситета. Труды по медицине, т. 34, с. 9—20, Тарту, 1977.
14. *Ойвин Н. А.* Патол. физиология, и эксперим. терапия, т. 4., с. 76—85., 1960.

Поступила 9. IV. 1984



## ЭКСТРАКЦИЯ БЕЛКОВ И ФОСФОЛИПИДОВ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ ИЗ ПРЕПАРАТОВ НЕЙРОМЕМБРАН

КРАВЦОВА В. В., КРАВЦОВ А. В., ЯРОШЕНКО Н. А., АРЯМОВА Ж. М.

Институт биохимии им. А. В. Палладина АН УССР,  
Институт коллоидной химии и химии воды им. А. В. Думанского АН УССР, Киев

Исследована экстракция поверхностно-активными веществами (ПАВ)—алкил-сульфатами с длинной цепи углеводородного радикала  $C_8-C_{15}$ , ДОХ-Na, твином-80, тритоном X-100 и дигитонинном—белков и фосфолипидов из нейромембран, обогащенных  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФазой. Показано, что эффективность солюбилизирующего действия ПАВ на мембранные структуры мозга модифицируется в присутствии NaCl: экстракция белков и фосфолипидов неионными ПАВ уменьшается, а ДОХ-Na—резко увеличивается. Изменение экстрагирующего действия алкилсульфатов имеет более сложный характер (наблюдается зависимость от длины цепи углеводородного радикала).

Изучена мицеллярная структура и определено поверхностное натяжение в сложной системе вода—дезоксихолат—мембраны—NaCl.

Сделано заключение о том, что эффективность экстракции белков и фосфолипидов ПАВ зависит как от упорядоченности, целостности мембраны, так и от состояния ПАВ в системе вода—ПАВ—мембраны—электролит.

Многие достижения современной мембранологии связаны с использованием «детергентной техники» [1, 2]. Имея амфифильную природу, эти ПАВ могут взаимодействовать с основными компонентами биомембран—белками и липидами, а в достаточно высоких концентрациях—солюбилизовать мембраны [3].

Так, неионные ПАВ и соли желчных кислот дают возможность солюбилизовать клеточную мембрану, выделить ряд биологически активных макромолекул и частично их охарактеризовать [4]. Другие ПАВ (цетилтриметиламмонийбромид, частично ДДС-Na и др.) оказывают на мембранные ферменты «жесткое» действие: происходит их инактивация и денатурация.

Активность многих мембраносвязанных ферментов, в том числе  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФазы (К.Ф.3.6.1.3), зависит от их белково-липидного окружения [5], нарушение которого при действии ПАВ может повлиять на их конформацию, сродство к субстрату, потребность в лигандах и т. д.

Однако несмотря на многочисленные работы по изучению влияния ПАВ на белковые структуры [2] и их широкое применение для солюбилизации биомембран [3], имеются лишь отдельные сведения, касающиеся сравнительного изучения экстрагирующего действия этих соединений на белки и фосфолипиды мембран [6, 7].

В предыдущей нашей работе [8] показано наличие корреляции между стабилизирующим (или, наоборот, угнетающим) эффектом ПАВ на интегральный мембранный комплекс— $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазу—и их способностью солюбилизовать белки и фосфолипиды в препарате нейромембран, обогащенных транспортной АТФазой. Отмечено существенное модифицирующее действие предобработки ферментного препарата  $\text{NaCl}$  на экстракцию из него белков и фосфолипидов ДДС- $\text{Na}$  и ДОХ- $\text{Na}$ .

В связи с этим представляло интерес более детально изучить процесс «ограниченной» солюбилизации [1, 4] нейромембран, обогащенных  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазой ( $\text{NaI}$ -микросомы), ПАВ в концентрациях, максимально активирующих эту ферментную систему [9]. Такой подход позволяет количественно оценить деструкцию мембран, при которой АТФ-фосфогидролазные центры транспортной АТФазы максимально доступны для субстрата— $\text{Mg-ATP}$ , а также сравнить эффективность солюбилизирующего действия ПАВ, отличающихся по химической структуре, заряду и степени гидрофобности молекул. Кроме того, детального рассмотрения заслуживает эффект совместного действия дезоксихолата и  $\text{NaCl}$  на нейромембраны—резкое увеличение экстракции фосфолипидов и белков, сопровождающееся снижением активности  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы в частично делипидированном препарате. Отмеченные особенности «поведения» ПАВ следует учитывать при использовании «детергентной техники» для изучения биомембран.

### Материалы и методы

В качестве препарата нейромембран, обогащенных  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазой, использовали фракцию микросом, полученную из серого вещества мозга быка и обработанную  $\text{NaI}$  [10].

Солюбилизованные препараты получали, обрабатывая эту фракцию ПАВ (или  $\text{NaCl}$ , а затем ПАВ) при  $4^\circ$  в течение 30 мин. Концентрация белка в момент взаимодействия с ПАВ была постоянна—0,5 мг/мл. Суспензию, обработанную как указано выше, центрифугировали в течение 1 ч при 105000 $\times$ g. Солюбилизованный препарат представлял собой оптически прозрачную надосадочную жидкость.

При определении АТФазной активности использовали следующую реакционную смесь: 30 мМ трис- $\text{HCl}$  буфер рН 7,4, 3 мМ трис-АТФ, 3 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 150 мМ  $\text{NaCl}$  и 15 мМ  $\text{KCl}$ . В нее вносили 50 мкг белка ферментного препарата. Объем пробы составлял 1 мл, время инкубации—15 мин при  $37^\circ$ . Реакцию прекращали, добавляя ДДС- $\text{Na}$  до конечной концентрации 0,3%.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазную активность определяли по разности между  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазной и  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазной активностями. Последнюю измеряли при полном катионном составе среды, но в присутствии  $10^{-4}$  М строфантина К. Величину  $U_A$  выражали в мкмоль  $P_i$  отщепленного от субстрата/мг белка/ч.  $P_i$  определяли по методу Fiske, Subbarow [11], содержание белка—по модифицированному методу Lowry и соавт. [12].

Фосфолипиды экстрагировали смесью хлороформа и метанола (2:1) по методу Folch и соавт. [13]. Для этого препараты, солюбилизованные ПАВ, лиофилизировали. Препараты, содержащие NaCl, предварительно диализовали. Общее содержание фосфолипидов выражали в мкмоль  $P_i$ /мг белка.  $P_i$  определяли по методу Chen и соавт. [14].

Для определения критической концентрации мицеллообразования (ККМ) применяли метод измерения поверхностного натяжения—наибольшего давления пузырьков [15]. ККМ определяли при температуре 25°.

### Результаты и обсуждение

На рис. 1 приведены данные экстракции белков и фосфолипидов анионоактивными и неионными ПАВ из микросомной фракции мозга, обработанной и необработанной NaCl. Из них следует, что октил- и особенно децилсульфат и ДОХ-Na экстрагируют из мембранного препарата  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФазы, предварительно обработанного NaCl, значительно больше белков, чем из непредобработанного.

В этом случае ДОХ-Na также экстрагирует больше фосфолипидов (почти в 4,5 раза), а октил- и децилсульфат—несколько меньше (в 3,5 и 2,5 раза соответственно).

Длинноцепочечные гомологи ряда алкилсульфатов—додecil-, тетрадецил- и пентадецилсульфат, в отличие от октил- и децилсульфата, экстрагируют из предобработанного NaCl ферментного препарата в 2—2,5 раза меньше белков. Но вместе с тем, они, подобно  $C_8$  и  $C_{10}$ -гомологам, экстрагируют в 1,5—2,5 раза больше фосфолипидов, чем из непредобработанного препарата. Это, очевидно, связано с тем, что содержание фосфолипидов дается из расчета на 1 мг белка.

Неионные ПАВ—твин-80, дигитонин и особенно тритон X-100—в случае с предобработкой NaCl экстрагируют меньше белков (в 1,2—2,5 раза) и фосфолипидов.

Таким образом, предобработка мембранной фракции NaCl эффективным стабилизирующим лигандом транспортной АТФазы [16] приводит к сходным изменениям в экстрагирующем действии неионных ПАВ на белки и фосфолипиды: экстракция уменьшается, причем в случае с каждым из детергентов индивидуально, что может быть связано с различиями в величине липофильно-гидрофильного баланса их молекул [17].

Для гомологов алкилсульфатов эта закономерность не соблюдается (рис. 1). Короткоцепочечные гомологи октил- и децилсульфат экстрагируют из нейромембран, предобработанных NaCl, почти в 2 и 3 раза соответственно больше белков, чем из непредобработанной фракции, в то время как экстракция белков додецил-, тетрадецил- и пентадецилсульфатом в присутствии NaCl уменьшается в 2,5—3 раза. Что касается экстракции фосфолипидов, то в случае предобработки мембран NaCl наблюдается в целом обратное ее увеличение (из расчета на мг белка), причем для короткоцепочечных гомологов оно выражено в большей степени.

Различия в экстрагирующем действии алкилсульфатов на мембранные белки и фосфолипиды могут быть обусловлены тем, что в случае предобработки NaCl углеводородные радикалы короткоцепочечных гомологов легче проникают в липидный матрикс мембраны, образуя «складчатые слои» [17], которые нарушают белок-липидные взаимо-

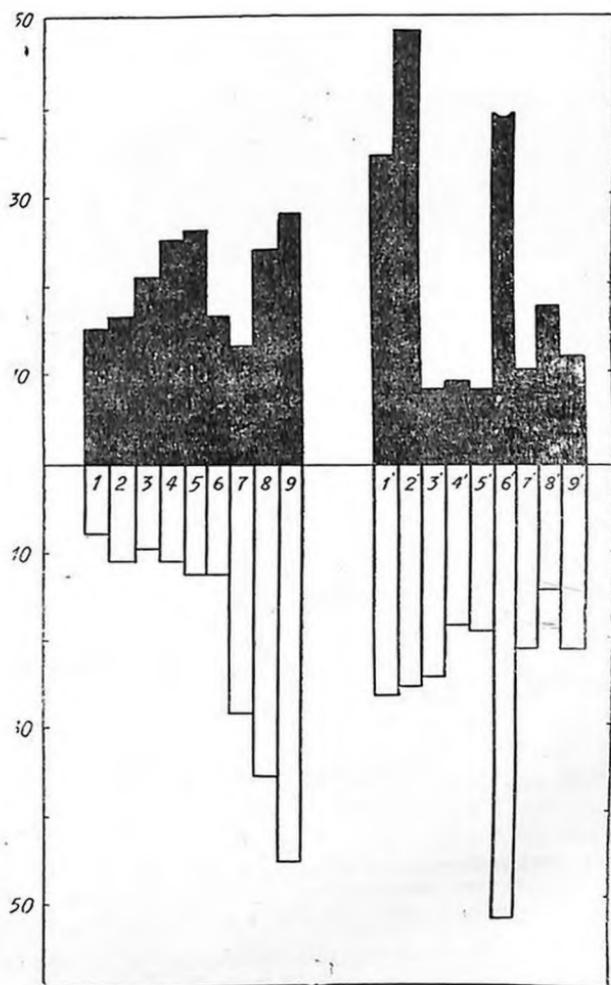


Рис. 1. Экстракция белков [■] в % и фосфолипидов [□] в мкг P<sub>1</sub>/мг белка поверхностно-активными веществами из необработанных (1—9) и обработанных 0,6 М NaCl (1'—9') нейромембран. 1, 1'-етилсульфат (0,5%), 2, 2'-децилсульфат (0,15%), 3, 3'-додецилсульфат (0,02%), 4, 4'-тетрадецилсульфат (0,009%), 5, 5'-пентадецилсульфат (0,012%), 6, 6'-ДОХ-Na (0,1%), 7, 7'-твин 80 (0,5), 8, 8'-дигитонин (0,1%), 9, 9'-третон X-100 (0,02%).

действия и вызывают частичную солиubilизацию мембраны [1, 2].

Наибольший интерес представляет феномен резкого увеличения экстрагирующего действия ДОХ-На в присутствии NaCl (рис. 1): экстракция белков возрастает в 2,3 раза, а фосфолипидов—в 4,3 раза по сравнению с контролем (мембранная фракция, непереработанная NaCl).

Применение относительно «мягкодействующего» ПАВ—ДОХ-На в сочетании с NaCl перспективно в плане выделения интегральных мембранных белков, ферментных комплексов, в том числе  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы [18], с сохранением их биологической активности. Кроме того, этот метод позволяет эффективно делипидировать мембраны с тем, чтобы, используя методы реконструкции биомембран [1], выяснить роль отдельных липидных компонентов в функционировании мембранных структур.

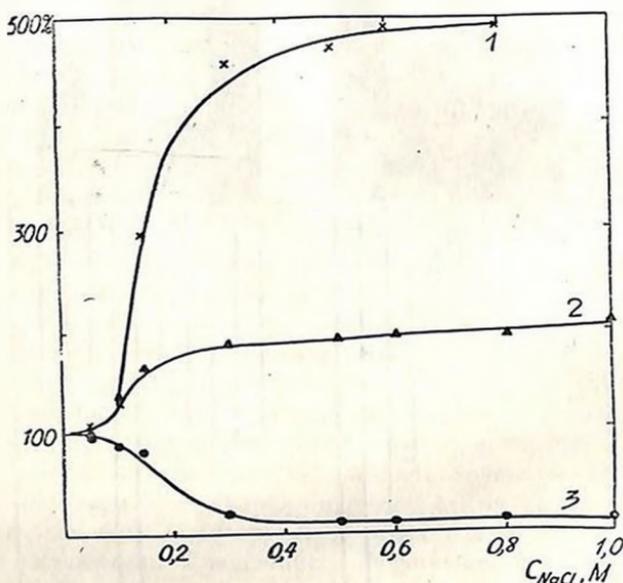


Рис. 2. Экстракция белков и фосфолипидов из нейромембран 0,1%-ным ДОХ-На в присутствии различных концентраций NaCl. 1—фосфолипиды, 2—белки, 3— $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазная активность.

В связи с этим проведено более детальное исследование солиubilизации ДОХ-На нейромембран, обогащенных  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазой, после их переработки различными концентрациями NaCl (рис. 2). Как видно из рисунка, при возрастании концентрации NaCl от 0,05 до 0,3 М экстракция белков и фосфолипидов увеличивается в 1,9 и 4,5 раза соответственно. Дальнейшее возрастание концентрации NaCl вплоть до 1 М существенно не влияет на эффективность экстракции белков и фосфолипидов этим ПАВ.

$\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРазная активность  $\text{NaI}$ -микросом, обработанных  $\text{NaCl}$  в сочетании с 0,1%-ным  $\text{DOX-Na}$ , изменялась следующим образом: в интервале концентраций  $\text{NaCl}$  от 0,05 до 0,3 М она постепенно снижалась до 20—25% от исходной и при дальнейшем увеличении концентрации до 1 М оставалась на низком уровне (около 15% от исходной активности).

Таким образом, эффективность солибилизирующего действия ПАВ на мембранные структуры мозга, в том числе  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРазу—интегральный ферментный комплекс возбудимых мембран [19], зависит от  $\text{NaCl}$ : в его присутствии экстракция белков и особенно фосфолипидов ионными ПАВ уменьшается (количественно это выражается для каждого из исследованных ПАВ по-разному),  $\text{DOX-Na}$  резко повышается, а алкилсульфатами—увеличивается, за исключением экстракции белков гомологами  $\text{C}_{12}$ ,  $\text{C}_{14}$  и  $\text{C}_{15}$  (уменьшается в 2—2,5 раза).

Эффект увеличения экстракции белков и фосфолипидов анионо-активными ПАВ, в особенности  $\text{DOX-Na}$ , в присутствии сильного электролита  $\text{NaCl}$ , очевидно, связан с их «разрыхляющим» действием на структуру мембран, обусловленным увеличением сил электростатического отталкивания отрицательно заряженных групп молекул фосфолипидов в бимолекулярных слоях, что, в свою очередь, связано с частичной нейтрализацией компенсирующих положительных зарядов [20].

Кроме того, в случае с  $\text{DOX-Na}$  или другим сходным с ним по действию ПАВ присутствие электролита  $\text{NaCl}$  в системе вода—ПАВ—мембраны могло привести к изменениям во взаимодействии заряженных молекул ПАВ между собой (например, к изменению ККМ), а также между ПАВ и мембранами.

В связи с этим представляло интерес определить влияние различных концентраций  $\text{NaCl}$  на ККМ дезоксихолата в суспензии  $\text{NaI}$ -микросом. Как видно из рис. 3, увеличение концентрации электролита приводит к снижению поверхностного натяжения в системе вода— $\text{DOX-Na}$ —мембраны и уменьшению ККМ этого ПАВ (рис. 4). При увеличении концентрации  $\text{NaCl}$  до 0,3 М и выше ККМ практически не изменяется, хотя поверхностное натяжение в системе заметно уменьшается (рис. 3, кривые 3 и 4).

Приведенные результаты, очевидно, свидетельствуют о том, что при увеличении концентрации  $\text{NaCl}$  от 0,3 до 0,5 М мицеллярная структура сложной системы вода—ПАВ—мембраны— $\text{NaCl}$  фактически не изменяется, но само увеличение концентрации электролита действует дегидратирующе на поверхностные адсорбционные слои на границе раздела водный раствор—воздух.

Таким образом, увеличение экстрагирующего действия  $\text{DOX-Na}$  на белки и фосфолипиды нейромембран в присутствии  $\text{NaCl}$ , по-видимому, связано как с ослаблением межмолекулярных связей в мембранах, их «разрыхлением» [20], так и с уменьшением ККМ этого ПАВ,

а, следовательно, более эффективным проникновением в липидный бислой мембраны [3].

Анализ приведенных данных о специфике солибилизирующего действия анионоактивных и неионных ПАВ на нейромембраны, обогащенные интегральным  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазным комплексом, в присутствии  $\text{NaCl}$  показывает, что эффективность экстракции белков и фосфолипидов этими детергентами зависит как от степени упорядочен-

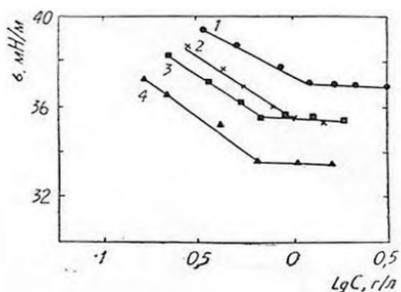
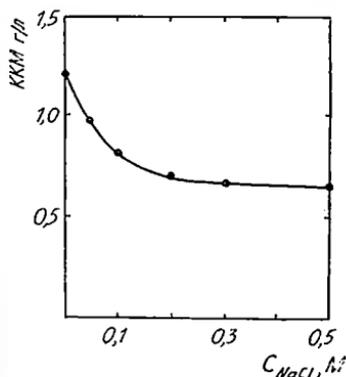


Рис. 3. Изотермы поверхностного натяжения водных растворов ДОХ-На в области критической концентрации мицеллообразования при постоянной концентрации белка (0,5 мг/мл) и различных концентраций  $\text{NaCl}$ .

1—без  $\text{NaCl}$ , 2—0,1 M  $\text{NaCl}$ , 3—0,3 M  $\text{NaCl}$ , 4—0,5 M  $\text{NaCl}$ .

Рис. 4. Влияние различных концентраций  $\text{NaCl}$  на критическую концентрацию мицеллообразования водных растворов ДОХ-На при постоянной концентрации белка (0,5 мг/мл).



ности, целостности мембраны, так и от состояния ПАВ в системе вода—ПАВ—мембраны—электролит.

Полученные результаты дают реальное представление о том, что в условиях отсутствия общей теории биологического, в том числе мембранотропного, действия ПАВ, необходим детальный анализ их поведения в конкретных экспериментальных условиях. Накопление такого экспериментального материала позволит в конечном итоге разработать модель, адекватно описывающую поведение ПАВ в системе вода—ПАВ—мембраны с учетом целого ряда факторов внешней среды (рН, температура, ионы и др.) и принадлежности детергента к тому или иному классу ПАВ.

# PROTEIN AND PHOSPHOLIPID EXTRACTION FROM NEUROMEMBRANES BY SURFACTANTS

KRAVTSOVA V. V., KRAVTSOV A. V., YAROSHENKO N. A.,  
ARYAMOVA ZH. M.

A. V. Palladin Institute of Biochemistry, A. V. Dumansky Institute of Colloid Chemistry and Water Chemistry, Ukrainian SSR Academy of Sciences, Kiev

The extraction of proteins and phospholipids from neuromembranes enriched in  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase (EC 3. 6. 1. 3.), by surfactants—alkylsulfates with the length of hydrocarbon chain  $\text{C}_8$ — $\text{C}_{15}$ , deoxycholate, Tween-80, Triton X-100 and digitonin—has been estimated. It has been demonstrated that the effectiveness of solubilization of neuronal membranes by surfactants is modified in the presence of NaCl: the extraction of proteins and phospholipids by nonionic surfactants is diminished, and by deoxycholate is essentially enhanced.

The micellar structure has been estimated and the surface tension has been determined in the system: water-deoxycholate-membranes-NaCl.

It is concluded that the effectiveness of extraction of proteins and phospholipids by surfactants depends on both the order and integrity of membrane, and the state of surfactant in the system water-surfactant-membrane-electrolyte.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Razin S. Biochim. et biophys. acta, v. 265, p. 241—296, 1972.
2. Tanford C., Reynolds J. A. Biochim. et biophys. acta, v. 457, p. 133—170, 1976.
3. Helentius A., Simons K. Biochim. et biophys. acta, v. 415, p. 29—79, 1975.
4. Maddy A. H. Sub-Cellular. Biochem., v. 1, p. 293—301, 1972.
5. Tanaka R. Reviews of Neurosci., v. 1, p. 181—230, 1974.
6. Dunitz J. K., Marinetti G. V., Greenland P. Biochim. et biophys. acta, v. 266, p. 684—694, 1972.
7. Guillon G., Roy C., Jard S. Eur. J. Biochem., v. 92, p. 341—348, 1978.
8. Кравцова В. В., Кравцов А. В., Ярошенко Н. А. Укр. біохім. журн., т. 55, с. 392—397, 1983.
9. Кирсенко О. В., Демченко Г. О., Вавилова Г. Л., Ярошенко Н. А., Кравцов О. В. Укр. біохім. журн., т. 4<sup>с</sup>, с. 300—305, 1974.
10. Nakao T., Tashima Y., Nagano K., Nakao M. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 19, p. 755—758, 1965.
11. Fiske C. H., Subbarow Y. J. Biol. Chem., v. 66, p. 375—400, 1925.
12. Cadman E., Bostwick J. R., Eichberg J. Anal. Biochem., v. 96, p. 21—23, 1979.
13. Folch J., Ascoli J., Lees M., Meath J. A., Le Barron F. N. J. Biol. Chem., v. 191<sup>с</sup>, p. 833—841, 1951.
14. Chen P. S., Toribara T. Y., Warner H. Anal. Chem., v. 28, p. 1756—1758, 1966.
15. Методы испытаний водных растворов поверхностно-активных веществ, с. 39, М., Наука, 1965.

16. *Swann A. C., Albers R. W.* Biochim. et biophys. acta, v. 523, p. 215—227, 1978. ,
17. *Schwuger M. J., Bartnik F. G.*—In: Anionic Surfactants, v. 10, p. 1—50, New York and Basel, 1982.
18. *Lane L. K., Copenhaver J. H., Lindenmayer G. E., Schwartz A. J.* Biol. Chem. v. 248, p. 7197—7200, 1973.
19. *Hokin L. E.* Trends in biochem. Sci., v. 1, p. 233—236, 1976.
20. *Шагинян А. А., Закарян В. А., Квачко Т. В., Миносянц М. Х., Пасоян В. Г., Матевосян Р. О.* Биофизика, т. 28, с. 761—765, 1983.

Поступила 26. III. 1984



УДК 616.831—006.484—008.931—074

## UDP-САХАРА В ОПУХОЛЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА

ПОПОВА Г. М., ЮРКИНА Н. А., ПРОМЫСЛОВ М. Ш.

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

Исследовали содержание UDP-сахаров: UDPGlc и UDPGlcNAc в пробах опухолей головного мозга, полученных во время нейрохирургических операций. Было показано, что общее количество UDP сахаров (UDPGlc+UDPGINAc) в ткани опухоли выше, чем в нормальной ткани мозга.

На основании полученных данных можно предположить, что отношение UDPGlcNAc/UDPGlc может отражать характер и скорость опухолевого роста.

UDP-сахара являются метаболически активными соединениями и служат переносчиками гликозильных остатков, тем самым выполняя коферментную роль в биосинтезе углеводсодержащих соединений: гликолипидов, полисахаридов, гликопротеинов, мукополисахаридов и других веществ, многие из которых входят в состав клеточных мембран.

Изучение UDP-сахаров вызывает особый интерес при исследовании метаболических особенностей опухолевой ткани, так как при неопластической трансформации клеток имеют место изменения в количественном и качественном составе углеводсодержащих биополимеров клеточных мембран, в частности ганглиозидов, олигосахаридные цепи которых укорачиваются, в результате чего происходит упрощение состава этих соединений [1—8]. Важность исследования метаболических превращений углеводсодержащих соединений в опухолевых клетках обусловлена и тем, что укорочение олигосахаридных цепей гликолипидов и других гликоконъюгатов, характерное для трансформированных клеток, сопровождается значительным снижением или полной потерей способности клеток к межклеточному взаимодействию и контактному торможению клеточного роста и размножения [1, 4—8].

В то же время изучению UDP-сахаров в опухолях головного мозга посвящены лишь единичные сообщения [9]. Ранее нами [10] были проведены исследования UDP-сахаров в глиальных опухолях мозга человека. Настоящая работа посвящена изучению этих компонентов в различных опухолях мозга человека.

## Материалы и методы

В работе были использованы пробы ткани опухолей головного мозга человека, полученные во время нейрохирургических операций, а также ткани мозга, по необходимости удаленной во время операции; исследовали и нормальную ткань мозга кролика.

Содержание UDP-сахара определяли по методу Zhivkov [11, 12], основанном на сочетании адсорбции свободных нуклеотидов на угле с дальнейшим хроматографическим разделением их на бумаге: он позволяет обнаружить малые концентрации UDP-сахаров в небольшом количестве ткани. Исследуемый материал помещали в жидкий азот. Замерзшую ткань в количестве 1 г растирали с 8 мл холодного раствора  $\text{HClO}_4$ , затем центрифугировали 10 мин при 5000 г. Центрифугат доводили раствором KOH до pH 5—6, выпавший осадок  $\text{KClO}_4$  отделяли центрифугированием. Свободные нуклеотиды из надосадочной жидкости выделяли адсорбцией на активированном угле («Norit A», США), а затем элюировали их 10%-ным раствором пиридина в 50%-ном этаноле при 37° в течение 2 ч. После удаления угля центрифугированием надосадочную жидкость, содержащую свободные нуклеотиды, упаривали в вакууме досуха при комнатной температуре. Остаток растворяли в 0,4 мл воды и 0,1 мл этого раствора брали для хроматографирования на фильтровальной бумаге № 4, промытой 1 н.  $\text{CH}_3\text{COOH}$  и водой. Проводили двумерную нисходящую хроматографию: в первом направлении в системе, состоящей из изомасляной кислоты, воды и 25%-ного аммиака в соотношениях 44:22:1 в течение 40 ч, а во втором направлении—в системе, состоящей из 95%-ного этанола и 1 М ацетат-аммонийного буфера pH 3,8 в соотношениях 7:3 в течение 15 ч. Пятна нуклеотидов на хроматограмме обнаруживали в ультрафиолете с помощью ультрахемископа, после чего их элюировали 2,5 мл воды в течение ночи при комнатной температуре. Оптическую плотность полученных растворов нуклеотидов определяли на спектрофотометре в кварцевых кюветках диаметром 1 см. UDP-сахара определяли при 262 нм, их количество рассчитывали, используя коэффициент молярной экстинкции для уридин-нуклеотидов, равный  $9,9 \times 10^3$  и выражали в мкмоль/100 г влажной ткани.

UDP-сахара идентифицировали по спектрам, снятым в воде, 0,1 н. HCl, 0,1 н. NaOH и после бромирования [13], по соотношению общего и кислотолабильного фосфора, по углеводному остатку, а также с помощью свидетелей UDPGlc и UDPGlcNAc («Serva», ФРГ).

Содержание фосфора определяли по методу Hess, Derr [14], кислотолабильный фосфор—после гидролиза 1 н.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , общий фосфор—сжиганием с 10%-ной  $\text{H}_2\text{SO}_4$  в присутствии пергидроля. Углеводный остаток—гексозу определяли после 10-минутного гидролиза в 0,01 н. HCl глюкозоокендазным методом, а также гексокиназным методом на приборе «Fillpipett». Аминсахара определяли по методу Elson, Morgan [15] после предварительного гидролиза в течение 1 ч в 2 н. HCl.

## Результаты и обсуждение

В табл. I приведены данные по содержанию UDPGlc, UDPGlcNAc и их суммарного количества, а также отношение UDPGlcNAc/UDPGlc в нормальной ткани головного мозга. Полученные нами величины включают и некоторое количество UDP-производных галактозы.

Общее содержание UDP сахаров в ткани головного мозга кролика в норме составляло в среднем 9,8 мкмоль/100 г ткани. Количество UDPGlc и UDPGlcNAc примерно одинаково, в результате чего их отношение было равно единице. В нормальной ткани мозга человека в одном случае количество UDP-сахаров было 9,2 мкмоль, в дру-

гом—16,13, в третьем—7,5 мкмоль/100 г ткани; соотношение UDPGlcNAc/UDPGlc при этом было равно 1 или даже ниже (0,94).

Ранее при исследовании UDP-сахаров в ткани глиом нами было показано, что в доброкачественных глиомах—олигодендроглиомах и астроцитомах—общее содержание UDP-сахаров было несколько ниже (соответственно 17,94 и 23,89 мкмоль), чем в дедифференцированных глиомах—33,21 мкмоль/100 г ткани (табл. 2). При этом было уста-

Таблица 1

UDP-сахара в нормальной ткани головного мозга  
(мкмоль/100 г влажной ткани)

Объект исследования	UDPGlc+ UDPGlcNAc	UDPGlc	UDPGlcNAc	UDPGlcNAc/ UDPGlc
кролик (n=5)	9,87±2,16	4,87±1,07	5,00±2,38	1,03
человек	9,2 16,13 7,50	4,58 7,9 3,86	4,63 8,23 3,64	1,01 1,04 0,94

Примечание. В табл. 1, 2, 3 n—количество опытов.

новлено, что наиболее информативным является не количество UDP-сахаров, а именно отношение UDPGlcNAc/UDPGlc. В доброкачественных глиомах это отношение было близко или равно 1, в дедифференцированных же оно оказалось намного выше и составляло от 2 до 3. Таким образом, для глиальных опухолей была выявлена корреляция между величиной отношения UDPGlcNAc/UDPGlc и степенью малигнизации опухоли.

Таблица 2

UDP-сахара в ткани глиом (мкмоль/100 г влажной ткани)

Гистологическая характеристика	UDPGlc+ UDPGlcNAc	UDPGlc	UDPGlcNAc	UDPGlcNAc/ UDPGlc
Олигодендроглиомы (n=6)	17,94±2,2	7,9±0,96	10,01±1,33	1,27±0,08
Астроцитомы (n=7)	23,89±5,8	11,73±2,78	12,16±3,01	1,03±0,04
Дедифференцированные астроцитомы и глиобластомы (n=12)	33,21±5,02	8,98±6,35	24,23±3,64	2,78±0,11

На основании этих данных нам казалось интересным произвести определения указанных соединений в опухолях головного мозга и другой, не глиальной, природы. Так, была исследована группа опухолей—менингиом. Эти опухоли, имея одну морфологическую природу, могут различаться по характеру и скорости опухолевого роста. В каждом исследованном нами случае биохимические данные были сопоставлены с гистологическими. Важно было выяснить, существует ли корреляция между биохимическими данными и степенью малигнизации также в случае и этих опухолей или же это характерно только для глиом. Полученные результаты приведены в табл. 3.

Они показывают, что содержание UDP-сахаров в этих опухолях в большинстве случаев колебалось от 21,93 до 29,54 мкмоль. Результаты, полученные при подсчете соотношений UDPGlcNAc/UDPGlc, позволили выделить 4 подгруппы. Величина отношения UDPGlcNAc/UDPGlc в подгруппе I была наименьшей и равна 2. В этой подгруппе представлены доброкачественные менингиомы, которые отличались по содержанию и соотношению UDP-сахаров от глиальных опухолей. Если в доброкачественных глиомах отношение UDPGlcNAc/UDPGlc было близким к 1, то в доброкачественных менингиомах оно было равно 2. Суммарное количество UDP-сахаров в них было выше, чем в добро-

Таблица 3

UDP-сахара в ткани менингиом (мкмоль/100 г влажной ткани)

Под- группа	UDPGlc+ UDPGlcNAc	UDPGlc	UDPGlcNAc	UDPGlcNAc/ UDPGlc
I (n=5)	29,54±3,2	9,5±1,04	20,04±2,2	2,10±0,07
II (n=6)	21,93±2,31	5,73±0,89	16,20±1,69	2,8±0,13
III (n=5)	24,26±0,64	5,3±0,37	18,96±0,37	3,62±0,19
IV	21,00	3,2	17,83	5,60
	37,05	4,88	32,17	6,59
	29,30	4,65	24,65	5,30
	26,74	1,61	25,14	15,66

качественных глиомах. В подгруппах II и III величины отношения UDPGlcNAc/UDPGlc были соответственно 2,8 и 3,6. Эти случаи характеризовались большей скоростью роста, иногда большим сроком заболевания. При этом были отмечены в большей или меньшей степени также и признаки малигнизации (митозы, полиморфизм). Дальнейшим подтверждением выявленной закономерности могут быть результаты, относящиеся к менингиомам подгруппы IV. В этих случаях величины отношения UDPGlcNAc/UDPGlc были очень высокими (от 5,6 до 15,0). Эти опухоли характеризовались бурным и чаще всего инфильтративным ростом, достигали больших размеров и гистологически имели выраженные злокачественные признаки. Все эти случаи были рецидивирующими.

Таким образом, несмотря на некоторые особенности менингиом, в них выявилась та же закономерность, что и в глиомах.

Далее, чтобы подтвердить такие данные, нам казалось целесообразным произвести определения UDP-сахаров и в некоторых других опухолях. Полученные при этом результаты сведены в табл. 4. Они подтверждают, что в злокачественных опухолях величины отношения UDPGlcNAc/UDPGlc такие же, как в недифференцированных глиомах и глиобластомах. В доброкачественных же опухолях—невриноме и олигоастроцитоме—отношение UDPGlcNAc/UDPGlc является близким к 1. Как видно из табл. 4, и в случае этих опухолей прослеживается та же закономерность, что и в других исследованных нами опухолях, о которых было сказано выше.

Таким образом, полученные в работе данные позволяют думать о том, что соотношение UDPGlcNAc/UDPGlc может служить показателем характера и скорости опухолевого роста. Анализируя полученные данные, следует отметить, что при малигнизации опухолей увеличение отношения UDPGlcNAc/UDPGlc происходило как за счет увеличения количества UDPGlcNAc, так и в результате уменьшения количества UDPGlc. Увеличение количества UDPGlcNAc в изученных нами опухолях согласуется с данными, полученными на индуцированных вирусами опухолях животных [16—18].

Таблица 4

UDP-сахара в различных опухолях головного мозга  
(мкмоль/100 г влажной ткани)

Гистологическая характеристика опухоли	UDPGlc+ UDPGlcNAc	UDPGlc	UDPGlcNAc	UDPGlcNAc/ UDPGlc
<i>Злокачественные</i>				
ангиоретикулосаркома	19,5	5,3	14,2	2,68
эпендимобластома	18,3	4,5	13,8	3,06
перипиома	13,96	3,7	10,26	2,77
метастаз рака	17,9	4,9	13,0	2,6
эпендимобластома	21,75	6,25	15,5	2,5
	24,49	6,20	18,29	2,95
<i>Доброкачественные</i>				
олигоастроцитомы	15,0	7,0	8,0	1,14
невринома	11,9	5,3	6,6	1,24

В литературе имеются указания на снижение активности ферментов, участвующих в биосинтезе углеводсодержащих биополимеров, в трансформированных опухолевым вирусом клетках [1, 18]. Изменения эти являются различными в разных опухолях.

Изменения в соотношении UDPGlcNAc/UDPGlc и в исследованных нами опухолях также могут быть связаны с изменением активности ферментных систем, участвующих в образовании и превращении этих соединений. В частности, снижение количества UDPGlc может быть обусловлено снижением активности UDP-глюкозилпрофосфорилазы.

Заслуживает внимания тот факт, что за исключением опухолей астроцитарного ряда, в которых суммарное количество UDPGlcNAc+UDPGlc несколько выше в дедифференцированных опухолях, чем в доброкачественных, во всех других опухолях (табл. 3 и 4) общее количество UDP-сахаров не зависело от степени малигнизации опухоли. Различия, связанные со степенью малигнизации, проявлялись в величинах отношения UDPGlcNAc/UDPGlc.

## UDP-SUGARS IN HUMAN BRAIN TUMOURS

POPOVA G. M., YURKINA N. A., PROMYSLOV M. SH.

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

The content of UDP-sugars: UDP-glucose (UDPG) and UDP-N-acetyl-glucosamine (UDPAG) was studied in brain tumours, obtained at surgery. It was shown that the total amount of UDP-sugars was higher in tumour tissue compared with brain tissue. The investigation of ratio UDPAG/UDPG proved to be very important as a certain correlation was revealed. In benign gliomas the ratio UDPAG/UDPG was close to 1. In brain tissue of human and rabbit the ratio was also 1. In malignant gliomas the ratio UDPAG/UDPG was elevated to 2—3. In other malignant tumours (not gliomas) this ratio also was 2,5—4 and sometimes even higher.

On the basis of the data reported it may be suggested that the ratio UDPAG/UDPG may reflect the peculiarity and rate of tumour growth.

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Brady R. O., Fishman P. H. *Biochim. et biophys. acta*, v. 355, p. 121—148, 1974.
2. Perdue J. F., Kleitzen R., Wray W. L. *Biochim. et biophys. acta*, v. 266, № 2, p. 505—510, 1972.
3. Cheema P., Yogeewaren G., Morris H. P., Murray R. K. *FEBS Lett.*, v. 11, № 3, p. 181—183, 1970.
4. Hakomori S. J., Murakami W. T. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 59, № 1, p. 254, 1968.
5. Hakomori S. J. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 67, № 4, p. 1741—1747, 1970.
6. Hakomori S. J., Yong W. W., Patt L. M., Yoshino T., Halfpap L., Lingwood C. A. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 125, p. 217—262, 1980.
7. Hakomori S. *Biochim. et biophys. acta*, v. 417, p. 55—89, 1975.
8. Видершайн Г. Я. В кн.: Успехи биол. химии, т. 20, М., Наука, с. 46—70, 1979.
9. Wintzerlith M., Ciesielski-Treska J., Dierich A., Mandel P. J. *Neurochem.*, v. 26, p. 315—317, 1976.
10. Попова Г. М. *Вопр. мед. химии*, т. 29, № 1, с. 20—23, 1983.
11. Zhivkov V., Tosheva R., Zhivkova Y. *Comp. Biochim. and Physiol.*, v. 51—B, p. 421—424, 1975.
12. Zhivkov V. *Biochem. J.*, v. 120, p. 505—508, 1970.
13. Venkster T. V., Baev A. A. *Spectra of nucleic acid compounds*. New York, 1968.
14. Hess H. H., Derr J. E. *Anal. Biochem.*, v. 63, p. 607—613, 1975.
15. Методы биохимических исследований (Ред. М. И. Прохорова), с. 118—119, Л., ЛГУ, 1982.
16. Chelibonova-Lorer H. *Neoplasma*, v. 22, № 1, p. 23—27, 1974.
17. Chelibonova-Lorer H., Zhivkov V., Yakimov M. *Neoplasma*, v. 19, № 4, p. 243—297, 1972.

Поступила 19. VI. 1984



УДК 612.822.1

## ДИНАМИКА СВЯЗЫВАНИЯ $\text{Ca}^{2+}$ В ИДЕНТИФИЦИРОВАННЫХ НЕЙРОНАХ ВИНОГРАДНОЙ УЛИТКИ

НИКИТИН В. П., САМОЯЛОВ М. О., ШЕРСТНЕВ В. В., МАПОРОВ В. Н.

Институт нормальной физиологии им. П. К. Анохина АМН СССР, Москва  
Институт физиологии им. И. П. Павлова АН СССР, Ленинград

С помощью хлортетрациклинового зонда было исследовано соотношение биоэлектрической активности и динамики связывания  $\text{Ca}^{2+}$  в идентифицированных нейронах виноградной улитки. Обнаружено, что функционально неоднородные нейроны обладают разным содержанием связанного  $\text{Ca}^{2+}$  и неодинаковой динамикой его сродства. Наименьшее содержание связанного  $\text{Ca}^{2+}$  и наименее выраженная динамика его связывания выявлены в командных нейронах безусловного оборонительного рефлекса улиток: ЛПа3, ППа3, ЛПа2, ППа2. Более высокая интенсивность флуоресценции отмечена в клетках, имеющих другую функциональную принадлежность (мотонейроны). По характеру изменений флуоресценции и корреляции этих изменений с биоэлектрической активностью выявлены 3 типа волн связывания  $\text{Ca}^{2+}$ . Биологически активные вещества (сАМР и ангиотензин II) оказывали выраженное влияние на волны всех типов и на их корреляцию с биоэлектрической активностью. Обсуждены возможные молекулярно-клеточные механизмы, лежащие в основе выявленных метаболических изменений.

В настоящее время не вызывает сомнения важное значение внутриклеточных метаболических процессов в осуществлении специфических функций нейронов [1, 2]. В связи с этим особый интерес вызывает корреляционное изучение динамики метаболических процессов и одновременно регистрируемой биоэлектрической активности идентифицированных нейронов. К немногим современным методам, позволяющим осуществлять такие исследования, относится прижизненная спектрофотометрия нейронов с отведением их биопотенциалов. На основе этой методики ранее нами были исследованы особенности связи биоэлектрической активности с динамикой окислительно-восстановительных процессов нейронов при подведении к ним биологически активных веществ [3].

Наряду с редокс-состоянием, другим важным показателем метаболической активности нейронов является динамика содержания связанных с компонентами внутриклеточных мембран ионов кальция ( $\text{Ca}_c^{2+}$ ). С целью определения  $\text{Ca}_c^{2+}$  в исследуемых нейронах при одновременной регистрации их биоэлектрической активности был при-

менее способ спектрофотометрического флуоресцентного выявления  $\text{Ca}_c^{2+}$  с помощью хлортетрациклинового зонда. Этот метод широко используют для изучения метаболизма  $\text{Ca}_c^{2+}$  в эритроцитах, гепатоцитах [4, 5], а также в различных компонентах нейронов: митохондриях, синапсосомах, аксоне [5—9].

В задачу настоящей работы входило сравнительное определение величины и колебаний содержания  $\text{Ca}_c^{2+}$  в различных по функциональным свойствам нейронах моллюсков и окружающих их глиальных элементах и изучение динамики  $\text{Ca}_c^{2+}$  и биоэлектрической активности нейронов при воздействии на них некоторыми биологически активными веществами, регулирующими внутриклеточные процессы.

## Материалы и методы

Опыты проводили на идентифицированных нейронах дорзальной поверхности изолированного подглоточного комплекса ганглиев виноградной улитки. Препарат НС улитки находился в камере, через которую осуществляли принудительный проток физиологического раствора для моллюсков [10]. Вне- и внутриклеточную регистрацию биоэлектрической активности и внеклеточную аппликацию биологически активных веществ осуществляли с помощью многоканальных капиллярных микроэлектродов, подводимых к нейронам под визуальным контролем.

Регистрирующей микроэлектрод заполняли 3 М КСl; сопротивление его кончика составляло 5—20 Мом. Инъекцию веществ проводили методом микропипетирования: сАМР (0,2 М, рН 7,4) («Sigma», США) подводили отрицательным током силой 60—80 нА в течение 2—4 мин, ангиотензин II (0,1 М, рН 5,0) («Sigma», США), подводили положительным током силой 60—80 нА в течение 3—5 мин. Биологически активные вещества апплицировали так же в раствор, омывавший ганглий: сАМР— $10^{-6}$  М, ангиотензин II— $10^{-7}$  М.

сАМР был выбран нами для исследований в связи с тем, что обычно используемые для внеклеточных подведений его производные могут вызывать эффекты, отличные от действия сАМР, и, кроме того, установлено, что внеклеточные аппликации циклического нуклеотида вызывают специфические биологические эффекты, хотя и ослабленные, но принципиально схожие с теми, которые возникают при его введении внутрь клеток или в экспериментах, проводимых *in vitro*.

Отводимые от нейрона потенциалы регистрировали на двухлучевом осциллографе и быстродействующем чернилопишущем приборе НЗ27/5.

Перед экспериментом ганглий улитки в течение 30 мин окрашивали хлортетрациклином (10 мкМ) («Sigma», США).

Визуальную идентификацию и спектрофотометрию нейронов проводили с использованием люминисцентного микроскопа ЛЮМАМ КФ, в комплект которого входит микрофлуориметрическая приставка ФМЭЛ-1. Согласно некоторым рекомендациям [8, 9], с целью выявления  $\text{Ca}_c^{2+}$  окрашенные хлортетрациклином структуры возбуждали светом в области с максимумом 410 нм, а флуоресценцию регистрировали в области с максимумом 520 нм. В таких условиях выявляется флуоресценция комплексов, включающих хлортетрациклин и  $\text{Ca}_c^{2+}$ , связанные с компонентами внутриклеточных мембран [4, 6, 9]. По современным представлениям, компонентами мембран, связывающих  $\text{Ca}_c^{2+}$ , являющуюся преимущественно белковой молекулы [11].

В проведенных исследованиях оптический сигнал, поступающий на ФМЭЛ-1, преобразовывали посредством ФЭУ-69 в электрический, который усиливали потенциометрическим усилителем У5-7 и регистрировали на самопишущем приборе типа КСП-4.

Всего было зарегистрировано и исследовано 43 нейрона.

## Результаты и обсуждение

После окрашивания хлортетрациклином были выявлены отчетливые различия флуоресценции нейронов и глиальных элементов ганглия: интенсивность свечения глиальных клеток была в несколько раз выше, чем нейронов, расположенных рядом. Более высокое содержание меченого  $\text{Ca}^{2+}$  в глиальных клетках, по сравнению с нейронами, обнаружено также Lazarewicz и соавт. [12].

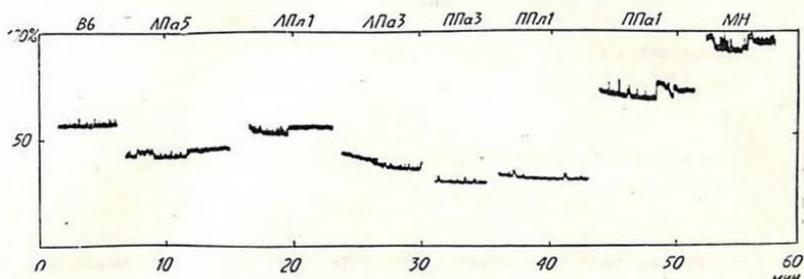


Рис. 1. Спектрофотометрия идентифицированных нейронов виноградной улитки, окрашенных хлортетрациклином. По оси абсцисс—время эксперимента в минутах; по оси ординат—условная шкала интенсивности флуоресценции в %. За 0 принят уровень флуоресценции неокрашенного препарата. Нейроны регистрировали в одном препарате.

При сравнительном исследовании интенсивности флуоресценции различных нейронов было обнаружено, что функционально неоднородные нейроны обладают разным содержанием  $\text{Ca}^{2+}$  и неодинаковой динамикой его сродства (рис. 1). Низкое содержание  $\text{Ca}^{2+}$  и наименее выраженная динамика его связывания были выявлены в командных нейронах безусловного оборонительного рефлекса улиток: ЛПа3, ППа3, ЛПа2, ППа2, ЛПл1, ППл1, В6 [13]. Внутри группы командных нейронов исследуемые показатели оказались также неоднородными: в нейронах ППа3 и ЛПа3 количество  $\text{Ca}^{2+}$  было относительно ниже, чем в остальных командных нейронах. Не совпадали характеристики симметричных нейронов: ППа3 и ЛПа3, ЛПл1 и ППл1.

Более высокая интенсивность флуоресценции хлортетрациклина, по сравнению с командными нейронами, была отмечена в клетке В4 и клетках группы Д [10]. Промежуточное положение занимали мотонейроны вегетативного ганглия [14], а также нейроны ППа1 и В6 [10].

По характеру изменений флуоресценции хлортетрациклина в корреляции с биоэлектрической активностью можно выделить три типа динамики связывания  $\text{Ca}^{2+}$ .

Волны порядка I—плавные изменения количества  $\text{Ca}^{2+}$  (в течение десятков минут), совпадавшие с медленными изменениями мембранного потенциала (рис. 2). Амплитуда этих волн могла достигать 30—40% от всего количества  $\text{Ca}^{2+}$ .

Волны II-го порядка длительность была от десятков секунд до нескольких минут, амплитуда 2—4%. Нередко они характеризовались почти скачкообразным увеличением интенсивности флуоресценции, затем плато и относительно быстрым снижением до исходного уровня (рис. 2). Другие из них имели пирамидообразную или более сложную форму (рис. 1). Следует отметить наиболее важные особенности волн II-го порядка. Во-первых, цикличность их возникновения—в ряде

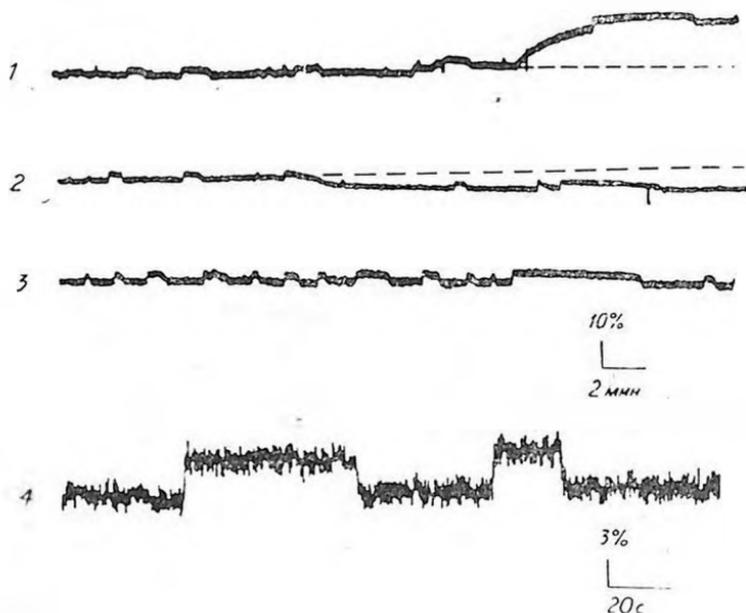


Рис. 2. Типы волн динамики связывания  $\text{Ca}^{2+}$  в нейронах. Волна порядка I в сторону увеличения (1, над пунктирной линией) и уменьшения (2, под пунктирной линией) содержания  $\text{Ca}_c^{2+}$ . Волны этого типа видны также на спектрофотометрических кривых 1 и 2. Две волны порядка II, а также волны порядка III, представляющие собой колебания на спектрофотометрической записи длительностью менее 1 сек. (4). По оси абсциссе—время эксперимента; по оси ординат—условная шкала интенсивности флуоресценции. За 100 % принят уровень флуоресценции окрашенного препарата по отношению к неокрашенному.

случаев спонтанно или под воздействием биологически активных веществ отсутствовавшие или неупорядоченные волны II-го порядка возникали через приблизительно равные промежутки времени, при этом они имели схожую конфигурацию и амплитуду (рис. 3). Отмечено совпадение волн II-го порядка с осцилляциями мембранного потенциала, сопровождавших, в частности, пачечную активность нейронов (рис. 4). Наиболее отчетливая корреляция была выявлена с залповой активностью нейрона ППа1.

Волны III-го порядка—быстрые, в пределах 1с, колебания флуоресценции. Амплитуда колебаний была сравнима с амплитудой волн II-ого порядка (рис. 2). В некоторых случаях была обнаружена корреляция возрастания частоты волн III-го порядка с активацией или усилением пейсмекерных волн нейронов.

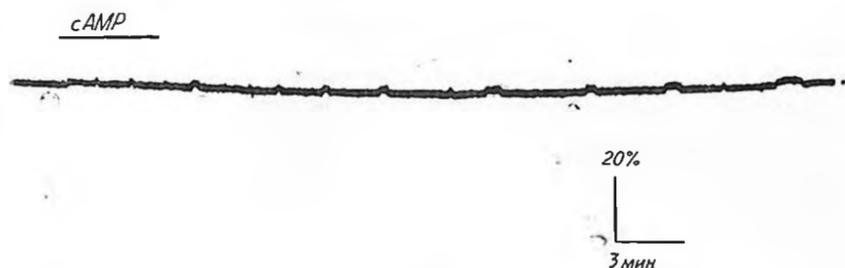


Рис. 3. Инициация сАМР волн порядка II у нейрона В7. Утолщенная линия—время микроинъекционного подведения сАМР. По оси абсцисс и ординат обозначения те же, что на рис. 2.

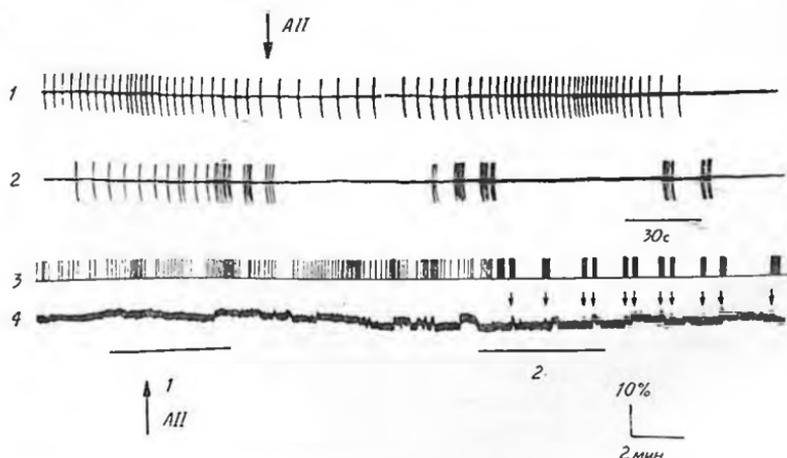


Рис. 4. Инициация ангиотензином II (А II) пачечной активности и волн порядка II у нейрона IIIa1. Исходная биоэлектрическая активность (внеклеточное отведение) и аппликация А II (отмечена стрелкой)—1. Продолжение записи нейронограммы через 10 мин—2. Схема нейронограммы—3, сопоставленная по времени со спектрофотометрической записью—4. Стрелками обозначены волны порядка II, совпадающие с пачками потенциалов действия. Утолщенные линии под спектрофотометрической кривой—сопоставленные по времени отрезки нейронограмм 1 и 2.

По оси абсцисс и ординат обозначения те же, что на рис. 2.

Описанные типы динамики содержания  $Ca^{2+}$  были обнаружены во всех исследованных нейронах. Однако степень их выраженности оказалась неодинаковой: наиболее выражены были волны выявленных типов у клеток, содержавших большее количество  $Ca^{2+}$ .

Биологически активные вещества оказывали значительное влияние на волны всех типов. Подведение сАМР обычно вызывало фазные изменения волны I-ого порядка с начальным уменьшением количества  $\text{Ca}_c^{2+}$  и последующей его стабилизацией, либо увеличением. Латентный период реакций составлял 1—2 мин, длительность—десятки минут и более. Действие сАМР сопровождалось также инициацией волны II-ого порядка (рис. 3). Во время подведения сАМР волны II-ого порядка возникали циклично, через равные промежутки времени, будучи схожими по конфигурации и амплитуде. После окончания аппликации цикличность нарушалась, волны становились изменчивыми по форме и амплитуде. Временные параметры описанных изменений совпадали с таковыми для волны I-ого порядка. В ряде случаев было отмечено возникавшее под влиянием сАМР учащение волны III-ого порядка.

В экспериментах отчетливо выявлялась способность сАМР к корреляции электрофизиологических и метаболических процессов нервных клеток. Это проявлялось в том, что сАМР либо инициировал волны различных порядков и соответствующие им изменения биоэлектрической активности, либо совмещал динамику обоих показателей в случае, если в исходной фоновой активности нейрона присутствовали осцилляции мембранного потенциала и колебания количества  $\text{Ca}_c^{2+}$ . После окончания подведения сАМР имевшая место корреляция между обоими показателями постепенно исчезала (в течение десятков минут и более).

Ангиотензин II вызывал метаболические и электрофизиологические перестройки активности нейронов, принципиально сходные с таковыми при действии сАМР. Существенное отличие заключалось в большей продолжительности латентных периодов реакций: в среднем они составляли 10—15 мин от начала подведения пептида. На рис. 4 представлены характерные реакции нейрона ППа1, вызванные подведением ангиотензина II. В фоновой активности нейрона регистрировались длинные, от десятков секунд до 1,5 мин, пачечные разряды, которые через 12—15 мин после начала подведения ангиотензина II преобразовывались в залповую активность с короткими пачками импульсов (несколько секунд). Одновременно возникали волны II-ого порядка, которые совпадали с пачечной активностью. Следует отметить, что до начала аппликации пептида также были зарегистрированы волны II-ого порядка, отличавшиеся от инициированных ангиотензином II как по форме, так и по амплитуде. Причем они возникали нерегулярно и, кроме того, отсутствовала их корреляция с биоэлектрической активностью.

Как следует из полученных нами результатов, каждый исследованный идентифицированный нейрон характеризовался определенным уровнем содержания  $\text{Ca}_c^{2+}$ . Вместе с тем, внутри группы функционально однородных нейронов были констатированы близкие количества  $\text{Ca}_c^{2+}$ , тогда как нейроны функционально различных групп характеризовались отчетливыми различиями.

Необходимо подчеркнуть наличие определенной динамики связывания  $\text{Ca}^{2+}$ , нашедшей отражение в виде волн трех порядков. Различия временных параметров и выраженности изменений дают основание предполагать существенную неоднородность характеризующих или метаболических процессов. Так, первый тип волн отличает относительно медленное и, как правило, выраженное изменение содержания  $\text{Ca}_i^{2+}$ . Развитие и латентные периоды реакций при действии биологически активных веществ, а также корреляция с медленными колебаниями мембранного потенциала у этого типа волн были сходны с исследованными нами ранее сдвигами редокс-систем в клетках [3]. Это дает основание полагать, что данные изменения, по-видимому, связаны с некоторыми базовыми метаболическими и энергетическими процессами, протекающими в нейронах.

При анализе волн II-ого порядка прежде всего обращают на себя внимание некоторые их характерные особенности: сходные по форме и амплитуде циклические колебания флуоресценции, возникавшие иногда спонтанно и значительно чаще под воздействием регуляторов внутриклеточных процессов. Наличие выраженных п-образных регуляторных сдвигов количества  $\text{Ca}_i^{2+}$  предполагает синхронное вовлечение в данный процесс достаточно большого количества компартментализованных надмолекулярных субстратов, сохранявшееся в течение десятков секунд. Одним из вероятных структурных компонентов таких комплексов могут быть микротрубочки и нейрофиламенты [15]. Имеются данные о цикличности процессов полимеризации-деполимеризации этих оргanelл [16], их зависимости от присутствия  $\text{Ca}^{2+}$  [16, 17], регуляции сборки посредством сАМР и кальмодулина [16, 18]. Кроме того, показано, что циклическое перераспределение  $\text{Ca}^{2+}$  происходит при активном захвате свободного  $\text{Ca}^{2+}$  гладким эндоплазматическим ретикулом, АТР-индуцируемом захвате  $\text{Ca}^{2+}$  митохондриями и  $\text{Na}^+$ -зависимом пассивном высвобождении  $\text{Ca}^{2+}$  из митохондрий, связывании  $\text{Ca}^{2+}$  цитоплазматическими буферными системами, в том числе кальмодулином и белками группы S-100.

Интерпретация возможного механизма возникновения волн III-его порядка затруднительна. Однако следует учитывать, что в некоторых случаях увеличение частоты этих волн совпадало с активацией пейсмекерных колебаний мембранного потенциала нейронов. В связи с этим представляют интерес данные Соколова [19] относительно вовлечения белков плазматической мембраны при активации пейсмекерных участков.

В настоящее время установлено, что в нейронах моллюсков  $\text{Ca}^{2+}$  могут вовлекаться в механизмы генерации биоэлектрической активности [20, 21]. Выдвигаются также предположения о том, что  $\text{Ca}^{2+}$ , проникающие через цитоплазматическую мембрану при спайковой активности, являются регуляторами внутриклеточных метаболических процессов [21, 22]. В этом плане привлекают внимание экспериментальные факты, полученные при исследовании нейрона ППа1. Показано, что в регуляции залповой активности этого нейрона исключи-

тельно важную роль играет внутриклеточное накопление  $\text{Ca}^{2+}$  во время залпов потенциалов действия [23, 24]. В наших экспериментах обнаружено, что в фоновой активности нейрона залпы потенциалов действия и изменения количества  $\text{Ca}_c^{2+}$ , как правило, не совпадали, и только воздействие сАМР или ангиотензина II приводило к согласованию залпов с волнами II-ого порядка.

Особо следует отметить, что в случаях совпадения сдвигов содержания  $\text{Ca}_c^{2+}$  и электрогенеза выявлялось опережающее изменение первого показателя. Это, по-видимому, свидетельствует о первичном возникновении в данных условиях именно метаболических перестроек по отношению к электрофизиологическим. Вместе с тем, относительная независимость обоих показателей свидетельствует, очевидно, о том, что данные метаболические перестройки являются скорее регуляторными, чем абсолютно необходимыми для процессов электрогенеза.

Согласно современным представлениям,  $\text{Ca}^{2+}$  участвуют в регуляции внутриклеточных процессов, необходимых для осуществления многих функций нейронов, таких как процессы дифференцировки [25], выделения и рецепции нейромедиаторов, гормонов [26], электрогенез [20, 21], регуляция активности ДНК [27], метаболизм системы циклических нуклеотидов [28] и др. Одним из основных универсальных внутриклеточных регуляторов является кальмодулин. Комплекс кальмодулина с  $\text{Ca}^{2+}$  активировывает ряд ферментов, в том числе и  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимые протеникиназы, которые участвуют в реализации описанных выше  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых процессов.

Таким образом, проведенное исследование показывает перспективность использования методического подхода для выявления участия и роли метаболических процессов в обеспечении специфических функций нейронов, экспериментально дополняя современные данные о возможных  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых механизмах регуляции молекулярных процессов, лежащих в основе интегративной деятельности нервной клетки.

## DYNAMICS OF $\text{Ca}^{2+}$ BINDING IN THE NEURONS OF GARDEN SNAIL

NIKITIN V. P., SAMOILOV M. O., SHERSTNEV V. V., MAJOROV V. N.

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

Correlation between the bioelectric activity and dynamics of  $\text{Ca}^{2+}$  binding has been studied by means of chlortetracycline test. It was discovered that functionally different neurons contain both different amounts of bound  $\text{Ca}^{2+}$  and exert different affinity to it. Minimal amount and binding of  $\text{Ca}^{2+}$  was detected in snail neurons responsible for non-conditioned defensive reflex: LPa3, PPa3, LPa2, PPa2. A higher intensity of fluorescence of chlortetracycline- $\text{Ca}^{2+}$  complex was detected in moto-

neurons. 3 types of  $Ca^{2+}$ -binding waves have been described on the basis of the correlation between fluorescence and bioelectric activity. Biologically active compounds (cAMP and angiotensin II) exert pronounced effect on the waves of all 3 types and their correlation with bioelectric activity. Possible mechanisms of these metabolic changes are discussed.

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Анохин П. К. Успехи физиол. наук, т. 5, № 2, с. 5—92, 1974.
2. Osborne N. N. Biochemistry of characterised neurons. Pergamon press, Oxford, 1978.
3. Самойлов М. О., Никитин В. П., Семенов Д. Г., Майоров В. Н., Шерстнев В. В. V Всесоюзный семинар по развитию общей теории функциональных систем «Интегративная деятельность нейрона», с. 29—30, М., 1979.
4. Вадимиров Ю. А., Коган Э. М., Коркина Л. Г., Сороковой В. Н.—В кн.: Актуальные проблемы пересадки органов, с. 150—165, М., Медицина, 1979.
5. Hallett M., Schneider A. S., Carbone E. J. Membrane Biol., v. 10, № 1, p. 31—44, 1972.
6. Caswell A. N., Hutchison J. D. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 43, p. 625—630, 1971.
7. Caswell A. N. J. Membrane Biol., v. 7, p. 345—364, 1972.
8. Schaffer W. T., Olson M. S., v. 27, p. 1319—1325, 1976.
9. Carvalho C. A. M. J. Neurochem., v. 30, p. 1149—1155, 1978.
10. Сахаров Д. А. Генеалогия нейронов, М., Наука, 1974.
11. Kretsinger R. H. CRC Critical Reviews in Biochemistry, v. 12, p. 119—174, 1930.
12. Lazarewicz J. W., Kanje M., Sellström A., Hanberger A. J. Neurochem., v. 29, p. 495—502, 1977.
13. Балабан П. М., Литвинов Е. Г. Журн. высш. нерв. деят-сти, т. 27, № 3, с. 538—544, 1977.
14. Балабан П. М. Журн. высш. нерв. деят-сти, т. 31, № 2, с. 315—322, 1981.
15. Нейрохимия. Л., Изд-во ЛГУ, 1979.
16. Каппучинелли П. Подвижность живых клеток, М., Мир, 1982.
17. Воробьев В. С.—В кн.: Итоги науки и техники. ВИНТИ. Морфология человека и животных. Антропология, с. 6—26, 1983.
18. Stoboda R. D., Dentler W. L., Rosenbaum J. L. Biochemistry, v. 15, p. 4497—4504, 1976.
19. Соколов Е. Н. Нейронные механизмы памяти и обучения, М., Наука, 1981.
20. Костюк П. Г., Крышталь О. А. Механизмы электрической возбудимости нервной клетки, М., Наука, 1981.
21. Кэндел Э. Клеточные основы поведения, М., Мир, 1980.
22. Kostyuk P. G., Veselovsky N. S., Fedulova S. A. Neuroscience, v. 6, p. 2431—2437, 1981.
23. Gorman A. L., Hermann A., Thomas M. V. J. Physiol. (Gr. Brit.), v. 327, p. 185—217, 1982.
24. Alvarez-Leefmans F. J., Rink T. J., Tsien R. Y. J. Physiol. (Gr. Brit.), v. 315, p. 531—548, 1981.
25. Костенко М. А., Мусиенко В. С., Смолихина Т. Н. Цитология, т. 23, с. 779—787, 1981.
26. Глебов Р. Н., Крыжановский Г. Н. Функциональная биохимия синапсов. М., Медицина, 1978.
27. Разумовская П. И., Домбинова С. А., Демина М. Н., Говарова Л. В. Бюл. эксперим. бюл. и мед., т. 91, с. 677—679, 1981.
28. Rasmussen H., Godman D. Physiol. Rev., v. 57, p. 421—510, 1977.



## ВЫЯВЛЕНИЕ ДИМОРФИЗМА ХРОМАФФИННЫХ КЛЕТОК НАДПОЧЕЧНИКОВ ГИСТОХИМИЧЕСКОЙ РЕАКЦИЕЙ НА АДЕНИЛАТЦИКЛАЗУ

РОСТОМЯН М. А., АБРАМЯН К. С.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Представлены результаты гистохимического выявления аденилатциклазы (АЦ) в мозговом слое надпочечников крыс. Показаны особенности локализации АЦ в интрамуральном нервиом ганглии. Выявлены различия в иннервации адреналин- и норадреналинпродуцирующих клеток, свидетельствующие об их диморфизме.

Вопрос о гетерогенности популяции хромаффинных клеток надпочечника был поставлен вскоре после открытия норадреналина. И, несмотря на относительно длительную историю, дискуссия о мономорфизме и диморфизме хромаффинных клеток мозгового слоя актуальна и в настоящее время. Исследователи, признающие зависимость морфологических различий клеток от их функционального состояния, и авторы, отстаивающие представления о наличии различных типов клеток, продуцирующих различные моноамины, продолжают публиковать данные, подтверждающие ту или иную точку зрения, описывать и анализировать адекватность методов дифференцированного выявления этих типов клеток [1—3]. Среди успешных попыток выявления этих различий на светомикроскопическом уровне, следует отметить формалинндуцируемую флуоресценцию, йодатную и аргентаффинную реакции и некоторые другие гистохимические и гистологические методы [3—6].

Решение вопроса, связанного с гетерогенностью хромаффинных клеток, осложнено тем обстоятельством, что биоактивные вещества, продуцируемые клетками мозгового слоя надпочечников, очень близки по химической природе и, более того, являются предшественниками друг друга.

В связи с этим, обнаружение в клетках мозгового слоя того или иного амина позволяет с достоверностью судить об их содержании в клетках в момент исследования, а не о способности к продукции различных аминов. Более убедительными представляются данные по сопоставлению серийных срезов надпочечников, окрашенных на адре-

налин и порадреналин, у животных с четко выраженными различиями в локализации адреналин- и порадреналинпродуцирующих клеток с одновременным учетом их морфологических особенностей.

В настоящей работе гистохимическим методом исследована локализация АЦ в различных структурных образованиях мозгового вещества—хромаффинных гранулах и нитрамуральном нервном ганглии. Показаны особенности иннервации адреналин- и порадреналинпродуцирующих клеток и предпринята попытка рассмотрения результатов гистохимического выявления АЦ в мозговом слое надпочечников в свете представлений о гетерогенности популяции хромаффинных клеток.

### Материалы и методы

Гистохимическое выявление АЦ проводили по методу, предложенному ранее [7], с некоторыми модификациями состава инкубационной среды.

Для инкубации использовали замороженные срезы надпочечников крыс (толщиной 30 мкм), фиксированные перфузией 2,5%-ным глутаральдегидом на 0,1 М трис-малеатом или какодильевом буфере pH 7,4. Срезы готовили через 18—20 ч после дополнительного фиксирования материала в фиксаторе такого же состава. Инкубацию проводили при температуре 32—34°. При использовании в качестве субстрата АТФ материал инкубировали 30—60 мин, а с синтетическим субстратом аденилилимидодифосфатом—4 ч и более.

Состав инкубационной среды (5 мл): 0,1 М трис-малеатный или какодильевый буфер pH 7,4—8,9 (в зависимости от целей исследования и использованных субстратов) с 8% сахарозы или глюкозы; в качестве субстрата использовали 0,5 ммоль АТФ с примесью ванадия («Sigma», США) для ингибирования АТФаз или 0,5 ммоль аденилилимидодифосфата («Serva», ФРГ), 4 ммоль  $MgSO_4$ , 2 ммоль теофиллина («Sigma», США), и 1,5—2,4 ммоль  $Pb(NO_3)_2$ , добавляемого в инкубационную среду непосредственно перед употреблением. После инкубации срезы последовательно промывали в дистиллированной воде, 1%-ной уксусной кислоте (1 мин), в воде и 5 мин в 0,5%-ном сульфиде натрия для визуализации нитрофосфата свинца, маркирующего места проявления ферментативной активности. Срезы после промывки монтировали на предметные стекла, высушивали при комнатной температуре в течение суток и заключали в глицерин-желатину.

Продукт ферментативной активности в виде темного осадка маркировал места проявления активности АЦ.

О специфичности реакции судили по результатам контрольных экспериментов (рис., а) с инкубацией срезов в среде без субстрата, с тепловой денатурацией, с ингибиторами специфических и неспецифических фосфоэстераз, а также с гормональной стимуляцией.

Для дифференцированного выявления хромаффинных клеток использовали метод окраски толуидиновым синим [8].

Электронномикроскопическое исследование проводили на надпочечниках крыс, перфузированных 2,5%-ным забуференным глутаральдегидом, обезживание—по стандартной схеме, заливку и последующее ориентированное ультрамикротомирование различных видов клеток—методом перезаливки, предложенным ранее [9].

### Результаты и обсуждение

При гистохимическом выявлении АЦ в мозговом веществе надпочечников крыс обнаруживается четко выраженная реакция, проявляющаяся во внутринадпочечниковом нервном аппарате. Характер локализации реакции напоминает картину, получаемую при имперганции

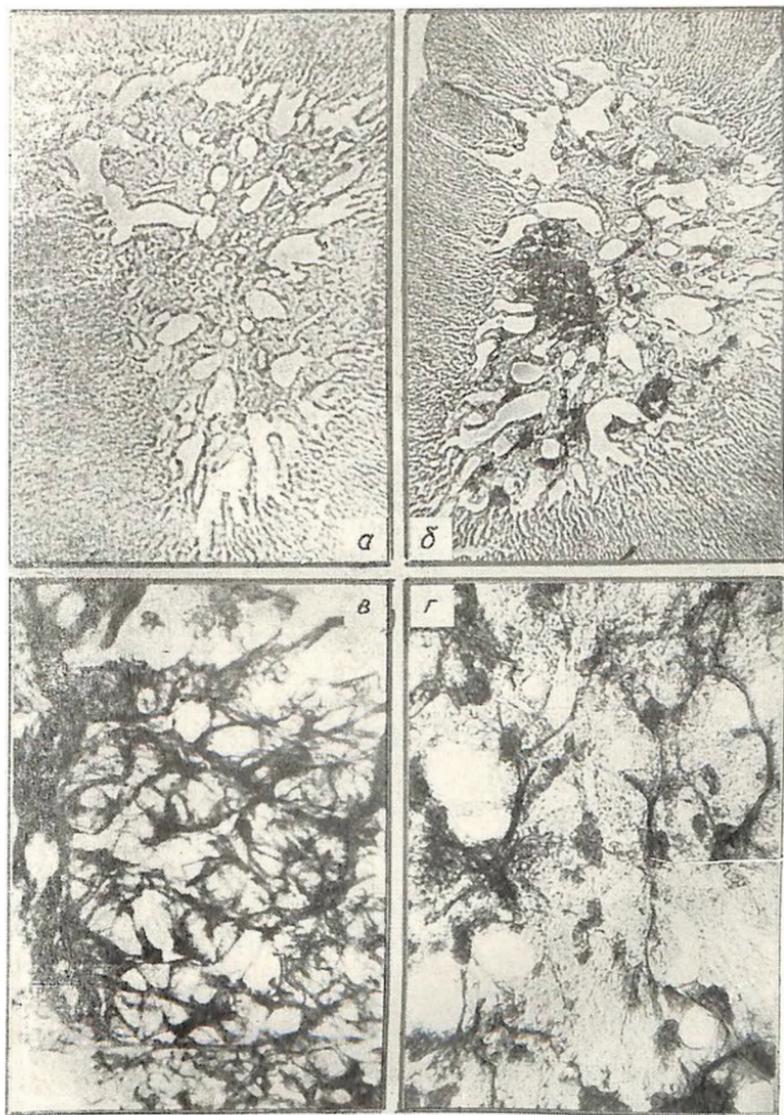


Рис. Гистохимическая реакция на ацетилхолинэстеразу в мозговом слое надпочечников: *а*—контрольный препарат. В срезе надпочечника виден корковый и мозговой слой без признаков реакции на АЦ. Об. 4, ок. 8; *б*—реакция на АЦ локализована в интрамуральном ганглии, нервных волокнах и островках парадrenalинпродуцирующих клеток. Об. 4, ок. 8; *в*—фрагмент рис. б. Интрамуральный нервный ганглий при большем увеличении. Реакция проявляется в нервных волокнах и в мембранах нервных клеток. Об.25, ок.8. *г*—нервные волокна подходят к островкам парадrenalинпродуцирующих клеток. Об.12.5, ок. 8.

температуры, относятся соответственно к адреналин- и норадреналинпродуцирующим клеткам [4—6, 14].

Как видно из приведенных данных, описанные типы клеток отличаются типичными свойствами, иннервацией и, как следствие этого, должны отличаться характером метаболизма, а также регуляцией синтеза и секреции различных катехоламинов. Отражением метаболических различий в этих типах клеток мозгового вещества может служить также выявленный гистохимическим методом неоднородный характер окрашивания на гликоген [15].

Приведенные ультраструктурные и гистохимические особенности «окраски» мозгового вещества свидетельствуют о наличии, по крайней мере, двух типов хромоаффинных клеток. Примечательно, что эти различия выявляются и в отношении системы циклических нуклеотидов, которые имеют определенную роль в осуществлении экзоцитоза [16] и других процессов, связанных с проявлением функций надпочечников.

Как показано выше, реакция на АЦ проявляется не только в хромоаффинных гранулах, в мембранах которых она сосредоточена вместе с дофамин- $\beta$ -гидроксилазой [11], но и в нервных элементах надпочечника. Нервные волокна интрамурального ганглия, проявляющие четко выраженную реакцию на АЦ, связаны преимущественно с островками норадреналинпродуцирующих клеток. Очевидно, это свидетельствует о том, что их регуляция в большей мере, чем регуляция адреналинпродуцирующих клеток, зависит от нервных влияний, медируемых посредством системы АЦ-сАМР.

Тесная анатомическая связь между интрамуральным нервным сплетением и островками норадреналинпродуцирующих клеток, объединяющая их как бы в единое целое, позволяет высказать предположение, что вопреки сложившимся представлениям [17], именно эту систему клеток, а не все мозговое вещество, можно считать аналогом постганглионарного сплетения.

## HISTOCHEMICAL REACTION FOR ADENYLATE CYCLASE REVEALS CHROMAFFIN CELLS DIMORPHISM

ROSTOMIAN M. A., ABRAMIAN K. S.

Institute of Biochemistry of Armenian Academy of Science, Yerevan

The localization of adenylylase (AC) was determined histochemically in rat adrenal medulla. AC was detected in chromaffin granules and in intramural ganglion. Due to AC reaction the difference between the innervation of adrenalin- and noradrenalin-producing cells was discovered.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Семашко М. И. Арх. анат., т. 73, № 7, с. 37—41, 1977.
2. Menchimol S., Cantin M. Histochemistry, v. 51, № 1, p. 9—26, 1977.
3. Кацнельсон Э. С., Стабровский Е. М. Гистология и биохимия хромоаффинной ткани надпочечников, «Медицина», Л., 1975.
4. Coupland R. E. The natural history of the chromaffin cell, Longmans, p. 1—279, London, 1965.
5. Eränkö O.—In: Aforenergic mechanisms (ed. J. R. Vane), p. 103—108, Boston, 1960.
6. Horwood D. Progr. Histochem. Cytochem., v. 3, p. 1—66, 1971.
7. Ростомян М. А., Абрамян К. С. Арх. анат., т. 76, № 1, с. 56—59, 1979.
8. Honoré L. H. J. Histochem. and Cytochem., v. 19, № 8, p. 483—486, 1971.
9. Рейнгольд В. Н., Шестопалова Н. М., Борисов В. М., Абрамян К. С. Тезисы V Всесоюзн. конф. по электронной микроскопии, с. 22, Сумы, 1965.
10. Grynspan-Winograd O. C. r. Acad. sci., v. 268, № 10, p. 1420—1422, 1969.
11. Zinder O., Menard R., Lovenberg W., Pollard H. B. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 79, № 3, p. 707—712, 1977.
12. Zinder O., Nicodijevic O., Hoffman Ph. G., Pollard H. B. J. Biol. Chem., v. 251, № 7, p. 2179—2181, 1976.
13. Winkler H., Carmichael S. W.—In: The secretory granule. (Polsner A. M., Trifaro J. M. eds), p. 3—79, Elsevier Biochemical Press, 1982.
14. Coupland R. E. J. Anat., v. 99, № 2, p. 231—254, 1965.
15. Ростомян М. А., Абрамян К. С. Тезисы XII конф. морфологов Чехословакии, с. 125, 1977.
16. Pollard H. B., Pazoles Ch. J., Creutz C. E., Zinder O. Int. Rev. of Cytology, v. 58, p. 195—197, 1979.
17. Тонких А. В.—В кн.: Адреналин и норадреналин, с. 38—45, М., Наука, 1964.

Поступила 4. XI. 1984



## КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 612.815.1.577.354

### ВЫДЕЛЕНИЕ РЕЦЕПТОРА ГАМК ИЗ МОЗГА КРЫС АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЕНАЗЕПАМА

КАРАНОВА М. В., КУЗНЕЦОВ В. И., ТОНКИХ А. К.

Институт биологической физики АН СССР, Пушкино-на-Оке

ГАМК является основным тормозным медиатором ЦНС млекопитающих. Согласно современным представлениям, постсинаптический ГАМК-рецептор является частью макромолекулярного комплекса, включающего в себя также связывающие участки с высоким сродством и для бензодиазепинов [1]. Это обстоятельство предполагает возможность очистки ГАМК-рецепторных участков с использованием в качестве аффинного сорбента бензодиазепинов. Отдельные попытки показали, что очистка на бензодиазепиновом сорбенте приводила к увеличению ГАМК-рецепторного связывания [2, 3].

В настоящей работе приведены результаты очистки ГАМК-рецепторных участков аффинной хроматографией, где в качестве сорбента использовался отечественный бензодиазепин—феназепам [4].

Фракцию ( $P_2$ ) грубых мембран мозга крыс получали общепринятыми методами. Отмывание мембран 0,02%-ным тритоном X-100, солиubilизацию мембран 0,2%-ным ДОХ-Na и осаждение солиubilизата сульфатом аммония проводили, как описано Asano, Ogasawara [5]. Связывание  $^3H$ -мусцимола с солиubilизованным ГАМК-рецептором определяли, используя фильтрование на нитроцеллюлозных фильтрах «Супрог» (ЧССР) с размером пор 0,4—0,8 мкм, как было описано ранее для связывания с препаратами мембран [6]. Оценку величин  $M_r$  солиubilизованного ГАМК-рецептора проводили методом гель-фильтрации на колонке с сефарозой CL-6B (1,6×50 см), на которую наносили 2 мл солиubilизованного препарата (10 мг белка/мл) и промывали 50 мМ трис-HCl буфера (pH 7,4) с 0,1%-ным тритоном X-100 со скоростью 15 мл/ч. В элюируемых фракциях (по 2 мл) определяли специфическое ГАМК-рецепторное связывание  $^3H$ -мусцимола.

В качестве аффинного сорбента использовали феназепам, который реакцией алкилирования присоединяли к АН-сефарозе, как описано в работе Cuatrecasas [7]. Колонку (1×10 см) заполняли феназепам-сефарозой и уравнивали её 50 мМ трис-HCl буфером (pH 7,4) с 0,1%-ным тритоном X-100. Затем через неё пропускали 100 мл раствора солиubilизованного ГАМК-рецептора в этом же буфере с концентрацией белка 1 мг/мл при скорости около 50 мл/ч и промывали 500 мл буфера. Для элюции применяли растворы бензодиазепинов с концентрацией 5 мМ, которые предварительно растворяли в этаноле, а затем в 50 мМ трис-буфере, так, чтобы конечная концентрация этанола составляла 10%. Элюирующий раствор содержал также

0,5%-ный ДОХ-На или 0,1%-ный тритон X-100. За ходом элюции следили, измеряя специфическое связывание  $^3\text{H}$ -мусцимола. Элюируемый белок выходил пиком в объеме 40 мл. Так как 10%-ный этанол уменьшает удержание солиобилизованного белка фильтрами, а растворенные бензодиазепины затрудняют точное определение белка, элюируемый белок анализировали против 50 мМ трис-НСl (рН 7,4) с 0,1%-ным тритоном X-100.

Электрофорез в ПААГ с ДДС-На проводили по методу Weber и Osborn [8]. Белок перед солиобилизацией ДДС-На осаждали 12%-ной ТХУ и определяли по методу Lowry и соавт. [9].

В работе использовали  $^3\text{H}$ -мусцимол с У.А. 15 Ки/ммоль («Amersham», Англия), немеченый мусцимол («Serva», ФРГ), сефарозу CL-6B и АН-сефарозу 4B («Pharmacia», Швеция), феназепам, нитразепам и диазепам были любезно предоставлены С. А. Андронати (Физико-химический институт АН УССР). Остальные реактивы были импортные или отечественные, категории «осч».

На рис. 1 представлена хроматография солиобилизованных в 0,2%-ном ДОХ-На мембран мозга крыс на колонке с сефарозой CL-6B. Пик  $^3\text{H}$ -мусцимол связывающей активности приходится на  $M_r \sim 600$  кД. Интересно отметить, что во всех описанных случаях при

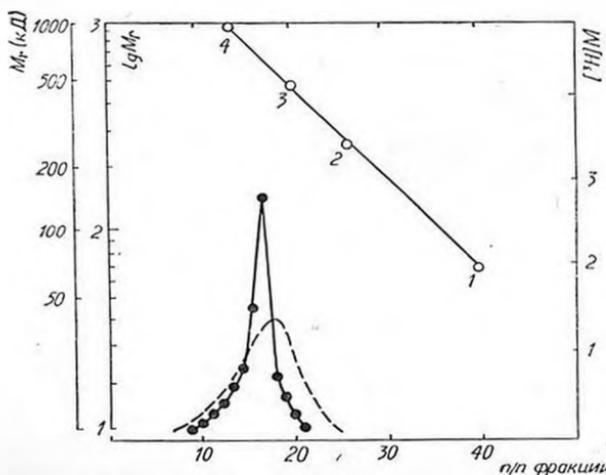


Рис. 1. Гель-фильтрация на сефарозе CL-6B фракции  $P_2$  мозга крыс, солиобилизованной в ДОХ-На. 1—альбумин ( $M_r = 68\ 000$ ), 2—каталаза ( $M_r = 240\ 000$ ), 3—мономер ферритина ( $M_r = 450\ 000$ ), 4—димер ферритина ( $M_r = 990\ 000$ ), — — — экстинкция при 280 нМ; — — —  $^3\text{H}$ -М—специфическое связывание  $^3\text{H}$ -мусцимола (пмоль/2 мл фракции).

солиобилизации мембран с ДОХ-На образуются комплексы с величинами  $M_r$  от 550 до 900 кД [10—12], в то время как солиобилизование неионными детергентами, например, тритоном X-100, приводит к величине  $M_r$  около 230 кД [13]. Поэтому, возможно, что полученная нами величина  $M_r$ , равная 600 кД, соответствует димеру или тетрамеру.

После нанесения на колонку с феназепам-сефарозой 100 мл солиобилизованного препарата со специфическим связыванием  $^3\text{H}$ -мус-

цимола порядка 10 пмоль/мг белка, на колонке адсорбируется около 50% связывающей активности, так как в белковом пике, выходящем сразу же из колонки, специфическое связывание уменьшено вдвое. При дальнейшем промывании колонки специфическое связывание  $^3\text{H}$ -мусцимола в элюате практически не обнаруживалось.

Элюцию проводили, используя три разных бензодиазепина в концентрации 5 мМ: нитразепам, диазепам и феназепам. Наибольший выход специфического связывания был получен с феназепамом. После анализа элюата против 50 мМ трис-НСl с 0,1%-ным тритоном

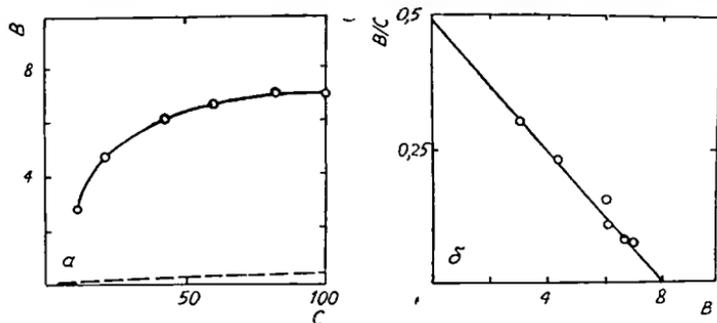


Рис. 2. Связывание  $^3\text{H}$ -мусцимола с предварительно диализованным элюатом из колонки с феназепам-сэфарозой: *a*—в обычных координатах—по оси абсцисс— $^3\text{H}$ -мусцимол (пМ), по оси ординат—связанный  $^3\text{H}$ -мусцимол (пмоль/мл раствора); *б*—в координатах Скэтчарда—по оси абсцисс—связанный  $^3\text{H}$ -мусцимол (пмоль/мл раствора). Пуиктиром обозначен уровень неспецифического связывания.

X-100, максимум насыщаемого связывания соответствовал примерно 8 пмоль/мл элюата при концентрации белка в растворе менее 10 мкг/мл (рис. 2), что соответствовало специфическому связыванию  $^3\text{H}$ -мусцимола более 800 пмоль/мг белка. Мы полагаем, что эта величина занижена, так как элюированный из аффинной колонки солиubilizat подвергался 2—3-часовому диализу, во время которого возможна некоторая потеря связывающей активности. Если предположить, что величина  $M_r$  комплекса в мономере около 200 кД, как это следует из ряда определений величин  $M_r$  разными методами [11, 13], и ГАМК-рецептор имеет один связывающий участок для мусцимола, то предполагаемая максимальная очистка должна приводить к связыванию около 5 нмоль/мг белка. Полученная нами величина (более 0,8 нмоль/мг белка) и известная из литературы (более 1,3 нмоль/мг белка) [3] приближаются к теоретической. Константа связывания  $^3\text{H}$ -мусцимола с солиubilizatом после аффинной колонки ( $\approx 16$  пМ) соответствовала константе связывания с солиubilizatом, наносимым на колонку.

Электрофорез в ПААГ с ДДС-На даст одну четкую полосу, расположенную между полосами контрольных белков с  $M_r$  45 и 68 кД, что находится в полном соответствии как с данными электрофореза

ГАМК- и бензодиазепинового рецепторов после аффинной хроматографии [2, 3], так и с данными по фотоаффинному мечению мембран мозга  $^3\text{H}$ -мусцимолом и  $^3\text{H}$ -бензодиазепинами [14].

Таким образом, данная работа подтверждает возможность высокой степени очистки ГАМК-рецепторных участков аффинной хроматографией на бензодиазепиновом сорбенте, что открывает дальнейшие возможности для изучения постсинаптических ГАМК-рецепторных комплексов.

## ISOLATION OF RAT BRAIN GABA RECEPTOR BY AFFINITY CHROMATOGRAPHY ON PHENAZEPAM-SEPHAROSE

KARANOVA M. V., KUZNETSOV V. I., TONKYKH A. K.

Institute of Biological Physics, Academy of Sciences of USSR, Poustchino

Phenazepam-Sepharose was used for affinity chromatography of the deoxycholate solubilized  $^3\text{H}$ -muscimol binding sites from rat brain.  $B_{\text{max}}$  of the purified preparation was 0,8 nmol/mg of protein. On SDS-PAGE one major band with  $M_r$  about 55000 has been detected.

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Olsen R. W. J. *Neurochem.*, v. 37, p. 1—13, 1981.
2. Gavish M., Snyder S. H. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 78, p. 1939—1942, 1981.
3. Sigel E., Mamalakt C., Barnard E. A. *FEBS Lett.*, v. 147, p. 45—48, 1982.
4. Богатский А. В., Андронати С. А., Якубовская М. Н. Феназепам (под ред. А. В. Богатского), Киев, Наукова думка, 1982.
5. Asano T., Ogasawara N. *Life Sci.*, v. 26, p. 1131—1137, 1980.
6. Кузнецов В. И., Тонких А. К., Қим О. Н., Асланов Х. А. *Укр. биохим. журн.*, т. 54, с. 428—431, 1982.
7. Cuatrecasas P.—In: *Advances in Enzymology*, v. 36, p. 29—38, 1972, Interscience, 1972.
8. Weber K., Osborn M. J. *Biol. Chem.*, v. 244, p. 4406—4415, 1969.
9. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. *J. Biol. Chem.*, v. 183, p. 255—275, 1951.
10. Greenlee D. V., Olsen R. W. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, v. 88, p. 380—387, 1979.
11. Asano T., Ogasawara N. *Life Sci.*, v. 29, p. 193—200, 1981.
12. Stephenson A., Watkins A. E., Olsen R. W. *Eur. J. Biochem.*, v. 123, p. 291—298, 1982.
13. Chang Li-Ren., Barnard E. A. *J. Neurochem.*, v. 39, p. 1507—1518, 1982.
14. Asano T., Sakakibara J., Ogasawara N. *FEBS Lett.*, v. 151, p. 277—280, 1983.

Поступила 11. XII. 1984



УДК 577.17:612.815.1

АПАМИН—КОНКУРЕНТНЫЙ ИНГИБИТОР СВЯЗЫВАНИЯ  
 $^3\text{H}$ -ГАМК С РЕЦЕПТОРОМ ГАМККУЗНЕЦОВ В. И., ТОНКИХ А. К., КАРАНОВА М. В., КИМ О. Н.,  
ТАКАНАЕВ А. А., САДЫКОВ А. С.Институт биофизики АН СССР, Пущино; Институт биоорганической  
химии АН УзССР, Ташкент

Апамин-октадекапептид с двумя дисульфидными связями [1, 2] из яда медоносной пчелы *Apis mellifera* поражает преимущественно ЦНС [3]. Имеются данные о том, что апамин ингибирует неадренергические тормозные потенциалы [4] и является селективным блокатором  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимого калиевого канала [5].

ГАМК—основной тормозной медиатор ЦНС позвоночных и периферической нервной системы [6]. В настоящей работе приведены результаты изучения действия апаминина на связывание ГАМК и мусцимола (агониста ГАМК из *Amanita muscaria*) с рецептором ГАМК мозга крыс (в мембранном и в солюбилизованном виде) и с мембранами мышц креветки.

В работе были использованы  $^3\text{H}$ -ГАМК, 24 Ки/ммоль («Изотоп» СССР);  $^3\text{H}$ -мусцимол, 15,5 Ки/ммоль («Amersham», Англия); мусцимол, ДОХ-На и тритон X-100 («Serva», ФРГ). Все остальные реактивы—марки «осч», отечественные. Апамин был любезно предоставлен А. И. Мирошниковым из Института биоорганической химии им. М. М. Шемякина. Фильтры интротеллюлозные, диаметр пор—0,4—0,8 мкм («Synpor», СССР).

Целый мозг гомогенизировали в 10 объемах 0,32 М сахарозы. Гомогенат центрифугировали при 1000 g, 10 мин, полученный супернатант—при 17000 g, 30 мин. Осадок замораживали, оттаивали, инкубировали с 0,05%-ным тритоном X-100 и трижды отмывали в 20 объемах 50 мМ трис-НСI, рН 7,4. Отмытый препарат хранили в жидком азоте и использовали в опытах по связыванию или солюбилизовали. Для солюбилизации фракцию мембран инкубировали в 20 объемах 50 мМ буфера трис-НСI, рН 7,4, содержащего 0,2%-ный ДОХ-На и 1 М КСI, 15 мин при 4°. Суспензию центрифугировали при 105000 g, 60 мин. Надосадочную жидкость диализовали против 300 объемов 50 мМ трис-НСI, рН 7,4 с 0,1%-ным тритоном X-100 и 0,15 М КСI 2 ч при 4°. После диализа и центрифугирования при 30000 g, в течение 20 мин к надосадочной жидкости добавляли сульфат аммония до 20%-ного насыщения, осадок собирали центрифугированием, растворяли его в 50 мМ трис-НСI, рН 7,4, с 0,1%-ным тритоном X-100 и 0,15 М КСI до нужной концентрации белка и хранили в жидком азоте.

Мышцы креветок мелко разрезали, гомогенизировали в 10 объемах 0,25 М сахарозы (8000 об/мин, 4 мин) и процеживали через три слоя марли. Гомогенат центрифугировали при 700 g, 10 мин, надосадочную жидкость—при 100000 g, 1 ч. Осадок (фракцию мембран) собирали и хранили в жидком азоте.

Специфично связанную ГАМК (или мусцимол) определяли, как описано в работе Кузнецова и соавт. [7]. В пробирки вносили 10 мкл различных концентраций  $^3\text{H}$ -мусцимола, добавляли 10 мкл воды или немеченого мусцимола ( $10^{-4}$  М) в 80 мкл суспензии мембран или солибилизованного препарата (около 100 мкг белка). Смесь перемешивали, инкубировали 30 мин при  $3^\circ$  и наносили на фильтр, вымоченный в дистиллированной воде. Радиоактивность измеряли на счетчике «Intertechnique» (Франция). Специфичное связывание определяли как разницу между общим и неспецифичным. Белок определяли по методу Lowry и соавт. [8].

На рис. 1 приведены кривые вытеснения  $^3\text{H}$ -ГАМК апамином для синаптических мембран мозга крыс ( $K_i=3,3$  мкМ) и мембран мышц креветки ( $K_i=1$  мкМ). Величины  $K_i$  для апамина сопоставимы с таковыми для бикукуллина, единственного известного антагониста ГАМК. На рис. 2, а приведены кривые связывания  $^3\text{H}$ -ГАМК с солибилизованным рецептором ГАМК мозга крыс в норме и в присутствии апамина. Графики в координатах Лайнувера-Берка указывают на конкурентный характер ингибирования ( $K_i=0,7$  мкМ). Аналогич-

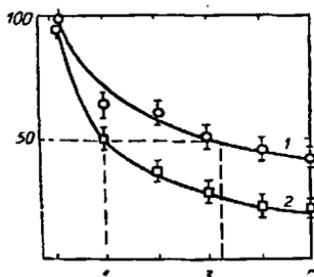


Рис. 1 Ингибирование апамином связывания  $^3\text{H}$ -ГАМК с синаптическими мембранами мозга крыс (1) и с мембранами мышц креветки (2). По оси абсцисс—концентрация апамина, мкМ; по оси ординат—специфическое связывание  $^3\text{H}$ -ГАМК, в %. Каждая точка представляет среднее из 3—6 измерений с указанными стандартными отклонениями.

ные кривые для связывания  $^3\text{H}$ -мусцимола приведены на рис. 2, б;  $K_i=1,1$  мкМ. Для сравнения показано действие фосфолипазы А на связывание  $^3\text{H}$ -мусцимола с солибилизованным рецептором ГАМК. Ингибирующее действие фосфолипазы носит неконкурентный характер.  $K_i$  несколько меньше для солибилизованного рецептора ГАМК, чем для мембран, возможно, благодаря лучшей доступности связывающего участка для апамина. Как известно, в активный участок апамина входят 2 остатка аргинина [9]. В связи с этим интересно сопоставить действие двух других веществ, также содержащих гуанидиновые группы, на связывание мусцимола. Одно из них, амилорид, совершенно не влияло на связывание. Тетродотоксин ингибировал специфичное связывание с  $K_i \approx 5-10$  нМ [10]. Помимо традиционного представления о тетродотоксине как специфичном блокаторе  $\text{Na}^+$ -каналов, из литературы известно также, что это вещество затрагивает примембранный цитоскелет, а также ингибирует связывание агонистов с М-холинорецептором [11]. Все это указывает на то, что

механизм действия апамина может не ограничиваться блокированием  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимого  $\text{K}^+$ -канала. В одной из более ранних работ [12] утверждается, что апамин не взаимодействует с рецептором ГАМК. Расхождение этих результатов с нашими, возможно, объясняется различиями в методах приготовления мембран (отсутствует обработка мембран 0,05%-ным тритоном X-100) и определения связывания (метод центрифугирования).

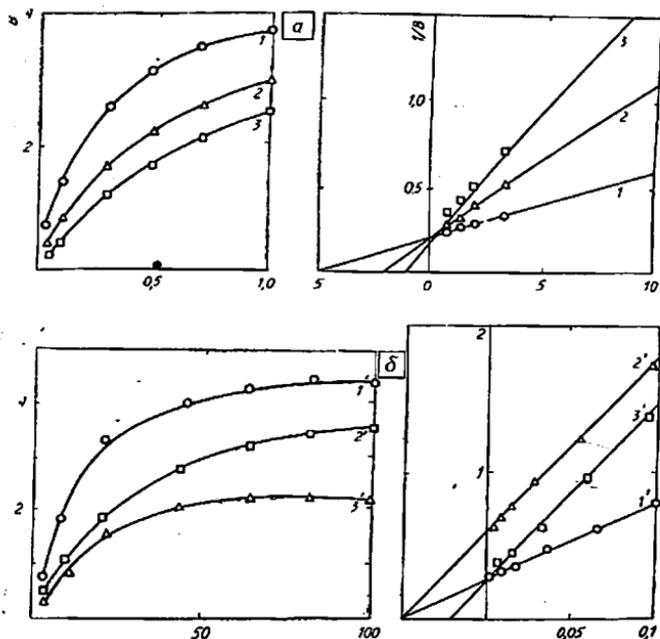


Рис. 2. Связывание  $^3\text{H}$ -ГАМК (а) и  $^3\text{H}$ -мусцимола (б) с препаратом солиubilизированного рецептора ГАМК в прямых и двойных обратных координатах Лайнувер-Берка. 1—в отсутствие апамина,  $K=0,2$  мкМ; 2—в присутствии 1 мкМ апамина,  $K=0,47$  мкМ; 3—в присутствии 2 мкМ апамина,  $K=0,8$  мкМ; 1'—в отсутствие апамина; 2'—в присутствии 1 мкМ апамина; 3'—после обработки фосфолипазой А. Каждая точка представляет среднее из 3—6 измерений. По оси абсцисс—концентрация  $^3\text{H}$ -ГАМК (а) или  $^3\text{H}$ -мусцимола (б); (10 мкг фермента, 1 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 37°, 15 мин), по оси ординат—связанная  $^3\text{H}$ -ГАМК (а) или  $^3\text{H}$ -мусцимол (б).

Таким образом, апамин является специфичным блокатором ГАМК-ергической передачи как у позвоночных, так и беспозвоночных. Апамин как антагонист ГАМК имеет ряд преимуществ по сравнению с биккуллином—хорошо растворим в воде, стабилен при физиологических рН, в нем возможны химические модификации без потери активности.

# APAMIN—A COMPETITIVE INHIBITOR OF $^3\text{H}$ -GABA-BINDING WITH RECEPTOR

KUZNETSOV V. I., TONKYKH A. K., KARANOVA M. V., KIM O. N.,  
TAKANAIEV A. A., SADYKHOV A. S.

Institute of Biophysics, Academy of Sciences USSR, Poustchino,  
Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences  
Uzbek. SSR, Tashkent

Apamin—a neurotoxin from bee venom—inhibits coupling of  $^3\text{H}$ -GABA with muscle membranes more drastically than with brain membranes in rats. It turned to be a more potent inhibitor than bicucullin. Inhibition of  $^3\text{H}$ -GABA binding with solubilized membranes is competitive with  $K_i$  of 0,7  $\mu\text{M}$ .

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Haux P., Sawerthai H., Habermann E., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., v. 348, p. 727—732, 1967.
2. Callewaert I. L., Shipolini R., Vernon A. FEBS Lett., v. 1, p. 111—115, 1968.
3. Habermann E., Cheng-Rande D. Toxicon, v. 13, p. 465—469, 1975.
4. Байдан А. В., Владимирова Н. А., Мирошников А. И., Таран Г. А. Докл. АН СССР, т. 241, с. 1224—1227, 1978.
5. Hugues M., Romey G., Duval D., Vincent I. P., Lazdunski M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 79, p. 1308—1312, 1982.
6. Крнјевић К. Physiol. Rev., v. 54, p. 418—540, 1974.
7. Кузнецов В. И., Тонких А. К., Ким О. Н., Асламов Х. А. Укр. биохим. журн., т. 54, с. 428—431, 1982.
8. Lowry O. H., Rosenbrough N. Y., Farr A. L., Randall R. I. J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
9. Vincent I. P., Schweltz H., Lazdunski M. Biochemistry, v. 14, p. 2521—2525, 1975.
10. Кузнецов В. И., Тонких А. К., Каранова М. В., Орлов В. И. I Всесоюзн. биофизич. съезд, Тезисы докл., т. 1, с. 60, М., 1982.
11. Baumgold I., Gallant P., Terakawa S., Pant H. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 103, p. 653—658, 1981.
12. Cavey D., Vincent I. P., Lazdunski M. Toxicol., v. 17, p. 176—179, 1979.

Поступила 3. I. 1985



УДК 591.543.42; 612.822.1

## БЕЛКИ И РНК В КЛЕТКАХ СУПРАОПТИЧЕСКОГО ЯДРА И ДОРЗАЛЬНОГО ЯДРА ШВА ГОЛОВНОГО МОЗГА СУСЛИКОВ, НЕВПАДАВШИХ В ЗИМНЮЮ СПЯЧКУ В ОКТЯБРЕ—МАРТЕ

ГОЛОВИНА Т. И., МАЛИКОВ У. М., РУБИНСКАЯ Н. Л.

Кабардино-Балкарский госуниверситет, Нальчик;  
Институт физиологии им. И. П. Павлова АН СССР, Ленинград

Организация сложной динамики процесса зимней спячки связана с генетически закрепленными у зимоспящих животных эволюционно выработанными нейроэндокринными механизмами [1—7]. Жесткая генетическая детерминированность эндогенных цирканнуальных ритмов у зимоспящих является, в частности, причиной того, что представители некоторых видов сусликов при содержании их в течение холодного времени года в виварии при 22° в спячку не впадают, но ряд физиологических сдвигов в том же направлении, что и при ней, у них развивается [3, 8—10].

При наших исследованиях некоторых нейрохимических коррелятов в динамике зимней спячки малых кавказских сусликов (*Citellus rugtaeae* Pall.) в глубоком ее периоде (в декабре) и в период подготовки к пробуждению (в марте) [3], для контроля часть животных одновременно с сусликами, находившимися в спячке, содержали в виварии при 21°; эти контрольные суслики в спячку не впадали. Таких животных также исследовали в декабре и марте. Общим контролем служили данные, полученные при исследовании в августе вполне еще активных сусликов.

Результаты исследования контрольных животных, полученные в декабре и в марте, при сравнении их с величинами, установленными в августе, сами по себе привлекли внимание. Их рассмотрение и является предметом настоящего сообщения: частично эти данные были изложены ранее [11].

Подопытные животные были отловлены в районе Чегемского ущелья Кабардино-Балкарской АССР на высоте 500—600 м над уровнем моря. Ректальная температура у сусликов, впавших в зимнюю спячку в естественные сроки (в середине октября) при содержании их при 4—10° как в декабре, так и в марте составляла 4—6°. У животных же, остававшихся в те же сроки активными, ректальная температура, как и в августе, была 36—37°.

При исследовании животных всех групп (по 6 в каждой), находившихся в состоянии бодрствования и относительного покоя, быстро декапитировали (без наркоза), извлекали головной мозг и в срезах фиксированных и заключенных в парафин соответствующих проб производили фотоспектрофотометрические определения концентрации суммарных белков и нуклеиновых кислот отдельно в нейронах (в их цитоплазме) и в их глиальных клетках-сателлитах (в целом) супраоптического ядра гипоталамуса и дорзального ядра шва. На основе величин концентрации определяемых веществ и величин объема соответственно цитоплазмы нейронов и цельных глиоцитов находили абсолютное содержание белков и нуклеиновых кислот на 1 клетку. Так как содержание ДНК в отдельных клетках постоянно, то все изменения количества нуклеиновых кислот относили за счет РНК. Используемые методы исследования были подробно описаны ранее [12—14].

Полученные данные представлены на рисунке в виде средних отклонений в процентах от величин, установленных у бодрствовавших животных в августе.

Оказалось, что в декабре (в период глубокой спячки сусликов на холоду) как в цитоплазме нейронов, так и в глиоцитах *супраоптического ядра* у бодрствовавших в это время животных происходило достоверное снижение абсолютного содержания на 1 клетку суммарных цитоплазматических белков; однако при этом из-за некоторого уменьшения объема цитоплазмы нейронов небольшое снижение концентрации белков в ней было недостоверным. Снижалось абсолютное содержание белков и в глиоцитах, но объем этих клеток не изменялся, поэтому и концентрация белков в них уменьшалась в тех же пределах. Что касается РНК, то ни содержание их на 1 клетку, ни их концентрация в клетках супраоптического ядра как в декабре, так и в марте не отличались от контрольных летних величин. Как это видно на рисунке, такую картину в марте наблюдали в случае белков—при некотором повышении их абсолютного содержания в цитоплазме нейронов, в глиоцитах было даже обнаружено дальнейшее значительное падение содержания белков на 1 клетку при сниженном уровне их концентрации.

Таким образом, в клетках супраоптического ядра период декабрь—март сопровождался у непадавших в это время в зимнюю спячку сусликов заметной тенденцией к превалированию распада белков над их синтезом при стабильности количественных характеристик РНК.

В то же время представленные на рисунке данные, относящиеся к *дорзальному ядру шва*, демонстрируют совершенно другое положение. Так, в декабре абсолютное содержание белков в цитоплазме нейронов этого ядра не снижалось, а наоборот, проявляло тенденцию к повышению по сравнению с уровнем летних данных при неизменной концентрации белков вследствие небольшого повышения объема цитоплазмы. Существенное же увеличение объема глиоцитов (на 22%) вызывало уменьшение концентрации белков в этих клетках. В марте имело место уже достоверное повышение абсолютного содержания белков в цитоплазме нейронов и в глиоцитах. Данные, касающиеся

содержания РНК в клетках дорзального ядра шва, также отличались от тех, которые были получены при исследовании клеток супраоптического ядра. В декабре из-за выраженного увеличения объема глиоцитов, несмотря на некоторое повышение содержания в них РНК, концентрация последних в глиоцитах снижалась. То же самое было

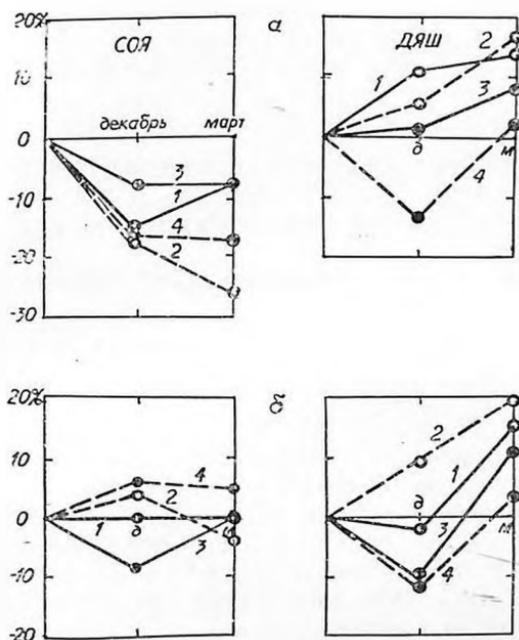


Рис. Абсолютное содержание на 1 клетку (1 и 2) и концентрация (3 и 4) белков (а) и РНК (б) соответственно в цитоплазме нейронов (1 и 3) и в их глиальных клетках-сателлитах (2 и 4) супраоптического ядра (СОЯ) и дорзального ядра шва (ДЯШ) головного мозга сусликов, не впадавших в зимнюю спячку в октябре—марте. По оси ординат: отклонения от контрольных величин, установленных у бодрствовавших сусликов в августе, (%).

отмечено и в цитоплазме нейронов при стабильности содержания РНК на 1 клетку. В марте по сравнению с декабрьскими данными заметно возрастало абсолютное содержание РНК не только в нейронах, но и в глиоцитах, наряду с увеличением также концентрации РНК на фоне превышения величины их объема уже всего на 15%.

Следовательно, период декабрь—март в противоположность данным, полученным при исследовании клеток супраоптического ядра, в системе нейрон—нейроглия дорзального ядра шва характеризовался тенденцией к превышению синтеза белков и РНК над их катаболизмом, что было особенно выраженным в марте.

На основании полученных результатов можно заключить, что в стволовой части головного мозга сусликов, которые, находясь в теплом помещении, в течение зимы и начала весны не впадали в свойственную для них в этот период зимнюю спячку, функционально разные структуры—нейросекреторное супраоптическое ядро и связанное с регуляцией цикла бодрствования—сон дорзальное ядро шва характеризовались и различной динамикой белково-нуклеинового метаболизма. В установленных при этом отличиях от контрольных августовских данных, несомненно, также нашел свое выражение врожденный сезонный ритм.

## PROTEINS AND RNA IN nn. SUPRAOPTICUS ET RAPHE DORSALIS CELLS OF GROUND SQUIRELS NOT HIBERNATING DURING OCTOBER—MARCH

GOLOVINA T. N., MALIKOV U. M., RUBINSKAYA N. L.

Kabardino-Balkarsk State University, Nalchik; I. P. Pavlov Institute of Physiology, USSR Academy of Sciences, Leningrad

The cytospectrophotometric investigation both in December and in March of neurons and glial cells of n. supraopticus of non-hibernating ground squirrels (*Citellus pygmaeus* Pall.) kept at 21°C has revealed a protein content decrease, the RNA quantity being as in control animals (August data). On the contrary, in n. raphe dorsalis cells a progressive substantial protein and RNA accumulation was observed (with a concomitant fall in RNA concentration in gliocytes due to increase in the volume of these cells). Thus, an endogenic circannual rhythm manifested itself in the case of protein-nucleic acid metabolism in brain stem structures of such hibernators as ground squirrels even in the absence of hibernation state, i. e. during December—March.

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Слоним А. Д. Экологическая физиология животных, М., Высшая школа, 1971.
2. Зимняя спячка и сезонные ритмы физиологических функций (ред. А. Д. Слоним), Новосибирск, Наука, 1971.
3. Механизмы сезонных ритмов кортикостероидной регуляции зимоспящих (ред. М. Г. Колпаков), Новосибирск, Наука, 1974.
4. Куприянович Л. И. Биологические ритмы и сон, М., Наука, 1976.
5. Механизмы зимней спячки млекопитающих (ред. Ю. Ф. Пастухов, С. Р. Чаплыгина), Владивосток, ДВНЦ АН СССР, 1977.
6. Муравьева Л. И., Буданцев А. Ю. Успехи соврем. биол., т. 96, с. 117—131, 1983.
7. Карманова И. Г. Журн. эволюц. биохим. и физиологии, т. 20, с. 49—53, 1984.
8. Юрисова М. Н.—В кн.: Зимняя спячка и сезонные ритмы физиологических функций, с. 8—27, Новосибирск, Наука, 1971.
9. Михневич О. Ч.—В кн.: Рефераты научных сообщений IV Конференции физиологов Средней Азии и Казахстана, с. 37, Новосибирск, 1969.

10. *Колтаков М. Г., Колаева С. Г., Луценко Н. Д., Робинсон М. В., Шабурова Г. С.*—В кн.: Механизмы зимней спячки млекопитающих, с. 53—58, Владивосток, ДВНЦ АН СССР, 1977.
11. *Карманова И. Г., Попова Д. И., Рубинская Н. Л., Хомуцецкая О. Е., Шортанова Т. Х., Головина Т. Н.* Докл. АН СССР, т. 278, с. 495—497, 1984.
12. *Воронка Г. Ш., Демин Н. Н., Певзнер Л. Э.* Докл. АН СССР, т. 198, с. 974—977, 1971.
13. *Воронка Г. Ш., Демин Н. Н., Рубинская Н. Л., Соловьева И. А.* Укр. біохім. журн., т. 44, с. 712—717, 1972.
14. *Демин Н. Н., Коган А. Б., Моисеева Н. И.* Нейрофизиология и нейрохимия сна, Л., Наука, 1978.

Поступила 7. VII. 1984

О ЛОКАЛИЗАЦИИ КАЛЬМОДУЛИНА В  
ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ВЫСТИЛКЕ

ФУРАЕВ В. В., СУВОРОВ С. А.

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

Молекулярные механизмы восприятия сигналов, переработки и передачи полученной информации в настоящее время представляют большой интерес для нейрохимии. В этом плане хеморецепторные клетки обонятельного эпителия представляют собой уникальный объект, поскольку являются первичными нейронами, то есть нейронами, воспринимающими сигнал непосредственно из окружающей среды. В этом отношении мембрана обонятельной клетки в известной мере подобна постсинаптической мембране, воспринимающей медиатор из части своего «окружения» — синаптической щели.

В синаптической передаче сейчас уделяют большое внимание роли кальмодулина (КМ) [1, 2]. Ранее нами было показано наличие в обонятельной выстилке (ОВ) большого количества КМ, сравнимого с его содержанием в ткани мозга [3, 4]. Однако вопрос о распределении КМ в обонятельном эпителии между обонятельными волосками, непосредственно воспринимающими химические стимулы, и остальной тканью и соотношении между водорастворимой и мембраносвязанной формами КМ оставался не изучен. Его выяснение являлось задачей настоящей работы.

Исследование было проведено на ОВ быка, которую отмывали в растворе Рингера, замораживали и гомогенизировали в жидком азоте. Для получения препарата КМ ткань экстрагировали 5-кратным объемом буфера (10 мМ трис-НСl, рН 7,5, 2 мМ ЭГТА, 1 мМ MgSO<sub>4</sub>), центрифугировали при 12000g 40 мин. Осадок ресуспендировали в буфере 10 мМ трис-НСl, рН 7,5, 150 мМ КСl, 1 мМ MgSO<sub>4</sub> (буфер А) и снова центрифугировали при 12000g 40 мин. Надосадочные жидкости объединяли и использовали как препарат растворимой фракции КМ. Осадок, содержащий мембраны, обрабатывали буфером А с 1%-ным раствором тритона X-100 для экстракции мембраносвязанного КМ [5]. Полученные препараты перед определением содержания КМ подвергали кипячению на водяной бане при 98° 4 мин и центрифугировали затем при 12000g 40 мин. Препараты фракций, содержащих обонятельные волоски получали из свежей и отмытой выстилки обработкой буфером А с 0,1%-ным тритоном X-100 в течение 3 мин. Как показано в работе Брон-

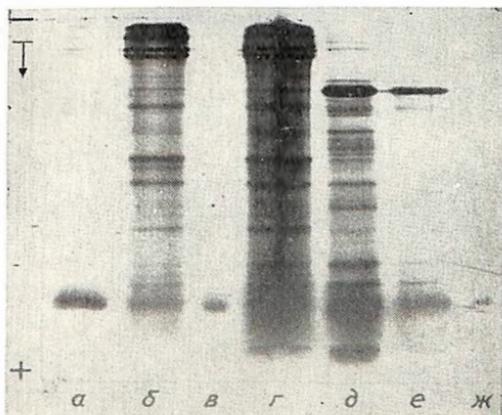


Рис. Электрофореграмма белков в ПААГ. Стандартный препарат каль-  
 модулина мозга (КМ): а—7,5 мкг, в, ж—1,5 мкг; мембранная фракция  
 ОВ: б—40 мкг белка+1,5 мкг КМ, е—67,7 мкг белка; растворимая  
 фракция ОВ: д—15 мкг белка; фракция, содержащая волоски: е—10 мкг  
 белка

штейн [6], при такой обработке волоски полностью растворялись за несколько десятков секунд. Далее взвесь, содержащую волоски, подвергали такой же обработке, как и другие образцы тканей. Содержание КМ определяли по его способности активировать КМ-зависимую фосфоэстеразу (ФДЭ) циклических нуклеотидов [5]. ФДЭ и очищенный препарат КМ получали из мозга быка, как описано в работе Суворова, Этнигоф [3]. Активность ФДЭ определяли по Scheing [7]. Для подавления действия протеаз при определении активности ФДЭ в пробы добавляли бычий сывороточный альбумин в концентрации 0,01%. Для подтверждения наличия КМ в исследуемых препаратах, их подвергали электрофорезу в 0,1%-ном ДДС-На в 15%-ном ПЛАГ [8]. В качестве стандарта использовали очищенный препарат КМ мозга [3]. Белок определяли по Lowry и соавт. [9].

Из полученных результатов, представленных на рисунке, следует, что во всех препаратах проявлялась белковая полоса, соответствующая по подвижности чистому КМ. Обращает на себя внимание относительно большое количество КМ в волосках. Полоса, соответствующая КМ, была в этом препарате одной из наиболее выраженных (рис., е). Из средних данных, суммированных в таблице, очевидно, что доля мембраносвязанного КМ (37 мкг/г) составляет 25% от общего содержания КМ (растворимая и мембранная фракция). Эти ре-

Таблица

Содержание кальмодулина (КМ) во фракциях ткани обонятельной выстилки

Фракции	Вес взятой ткани выстилки, г	Количество экстракта, мл	Общее содержание КМ, мкг	Содержание КМ в мкг/г ткани выстилки
Фракция, содержащая волоски	1,1	4,0	3,7±0,2	3,4±0,2
Растворимая фракция	3,7	31,0	409±34	111±9
Мембранная фракция	2,7	5,8	100±7	37±3

зультаты согласуются с имеющимися данными о мембраносвязанном и цитозольном распределении КМ в ткани мозга [5]. В волосках содержится 3,4 мкг КМ/г ткани, что составляет 2,3% от его общего содержания в ОВ. Следует, однако, отметить, что доля волосков в выстилке по массе составляет примерно 0,2%. Эту цифру легко можно получить, основываясь на данных Менсо и соавт. [10] о диаметре, длине и количестве волосков в ОВ быка. Соответственно, содержание КМ в волосках по отношению к его содержанию в основной массе ОВ оказывается существенно выше. Для сравнения следует отметить, что содержание КМ в другой рецепторной структуре наружных сегментах палочек сетчатки весьма невелико [11]. Выяснение конкретной роли КМ в обонятельных волосках является задачей дальнейших исследований.

Таким образом, в ОВ присутствует белок с типичными для КМ свойствами и значительная его часть локализована в мембранной фракции и волосках, что дает основание для предположения о существенном значении КМ в процессе первичного восприятия химических сигналов.

# CALMODULIN LOCALIZATION IN THE OLFACTORY EPITHELIUM

FURAEV V. V., SUVOROV S. A.

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

The distribution of calmodulin in different fractions of olfactory tissue was determined. Its amount in soluble fraction is 111  $\mu\text{g}$ , in membranes—37  $\mu\text{g}$ , and in olfactory cilia—3,4  $\mu\text{g}$  per g of tissue. Taking into account that olfactory cilia compose no more than 0,2% of all olfactory epithelium we conclude that the content of calmodulin in cilia is the highest.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Grab D. V., Carlin R., Siekevits P. J. Cell. Biol., v. 86, p. 433—440, 1981.
2. Rephali A., Persons S. M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 79, p. 5783—5787, 1982.
3. Суворов С. А., Этингоф Р. Н. Докл. АН СССР, т. 27, № 4, с. 1009—1012, 1983.
4. Острецова И. Б., Суворов С. А., Левко А. В., Этингоф Р. Н. Биохимия, т. 49, № 5, с. 777—780, 1984.
5. Kakiuchi S., Yasuda S., Yamazaki R., Teshima Y., Kanda K., Kakiuchi P., Sobue K. J. Biochem., v. 92, № 1041—1048, 1982.
6. Бронштейн А. А. Обонятельные рецепторы позвоночных (под ред. Я. А. Винникова), Л., Наука, с. 116—124, 1977.
7. Cheung W. Y. Biochim. et biophys. acta, v. 191, № 303—315, 1969.
8. Laemmli U. K. Nature, v. 227, p. 680—684, 1970.
9. Lowry O. H., Rosenbrough N. I., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
10. Menco B. P. M., Leunissen J. L. M., Bannister L. H., Dodd G. H. Cell. Tiss. Res., v. 193, p. 503—524, 1978.
11. Kohnken R. E., Chanfoulus Y. G., Eidle D. M., Means A. R., McConnell D. G. J. Biol. Chem., v. 256, p. 12517—12520, 1981.

Поступила 20. VIII 1984



УДК 612.8.015:547.953:616.005.4

СОДЕРЖАНИЕ ФОСФОЛИПИДОВ И МАЛОНИЛДИАЛЬДЕГИДА  
В КОРЕ БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЙ ПРИ ИШЕМИИ МОЗГА КРЫС

ЗАМУРУЕВ О. Н.

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

Фосфолипиды (ФЛ) являются не только постоянными структурными компонентами клеточных мембран, но и принимают активное участие в ряде важнейших процессов жизнедеятельности нервной ткани, поэтому нарушение фосфолипидного обмена может повлечь за собой существенные изменения функциональной активности ЦНС. При резком ухудшении мозгового кровоснабжения обмен ФЛ заметно нарушается—от снижения интенсивности обмена гидрофильной части молекул ФЛ при двусторонней перевязке общих сонных артерий у крыс [1] до уменьшения содержания ФЛ при полной ишемии [2—4].

Имеющиеся в настоящее время немногочисленные данные указывают на возможность усиления перекисного окисления липидов (ПОЛ), в частности ФЛ, при аноксии и ишемии мозга [2, 5, 6]. ФЛ богаты ненасыщенными жирными кислотами, что и определяет их высокую чувствительность к процессам свободнорадикального окисления. Как и в других тканях, определенный уровень ПОЛ обнаруживается в ткани мозга при нормальных условиях, но накопление продуктов ПОЛ может вызывать тяжелые последствия—разобщение окислительного фосфорилирования, дезинтеграцию мембранных белков, изменение проницаемости мембран и т. д. [7].

Все вышеуказанное может способствовать резкому снижению жизнеспособности нервных клеток и необратимым потерям их функций.

Целью настоящей работы было изучение содержания ФЛ и малоилдальдегида (МДА) как одного из конечных продуктов перекисного окисления ненасыщенных жирных кислот в коре больших полушарий мозга крыс при тяжелой ишемии.

Исследования проводили на крысах-самцах линии Вистар, массой 240—280 г. Ишемию мозга вызывали комбинацией снижения артериального давления (АД) и двусторонней перевязки общих сонных артерий. Для измерения АД использовали ртутный манометр, который через катетер подключали к бедренной артерии. Сразу

после пережатия обеих общих сонных артерий АД снижали до 50 мм Hg забором крови через бедренную артерию и поддерживали на постоянном уровне в течение всего периода ишемии (30 или 60 мин).

Липиды из ткани мозга экстрагировали по Folch и соавт. [8], разделение ФЛ на отдельные фракции осуществляли методом ТСХ на силикагеле в модификации, описанной нами ранее [1]. Исследовали сфингомиелиновую (СФМ), фосфатидилхолиновую (ФХ), монофосфонситидную (МФИ), фосфатидилсериновую (ФС) и фосфатидилэтаноламиновую (ФЭА) фракции. О содержании ФЛ судили по количеству фосфора ФЛ.

Содержание МДА в коре больших полушарий мозга крыс определяли методом, основанным на цветной реакции МДА с тиобарбитуровой кислотой [2].

Животных наркотизировали нембуталом, который вводили внутривенно за 30 мин до начала операции из расчета 10 мг/100 г массы. За 15 мин до начала операции в бедренную вену вводили гепарин в количестве 250 МЕ.

В качестве контроля брали животных, у которых приемы анестезии, отсепарирования общих сонных артерий, гепаринизации, измерения АД были аналогичны экспериментальным группам.

Как видно из представленной таблицы, содержание суммарных ФЛ к 30- и 60-й мин ишемии снижалось и составляло 88,7 и 84,6% от контрольных значений соответственно. Из исследованных фракций

Содержание ФЛ ( $P_1$ /г ткани) и малонового диальдегида (нмоль/г ткани) в коре головного мозга крыс при его неполной ишемии

Фракции	Контроль	Ишемия 30 мин	Ишемия 1 ч
Суммарные фосфолипиды	1529,03±4,87 (14)	1356,56±47,28* (14) $p < 0,01$	1294,02±43,06** (17) $p < 0,001$
Сфингомиелин	56,28±4,28 (16)	53,66±2,79 (15) $p > 0,1$	52,70±5,21 (16) $p > 0,1$
Фосфатидилхолин	526,47±21,30 (15)	522,12±21,09 (15) $p > 0,1$	506,40±21,80 (15) $p > 0,1$
Монофосфонситид	72,01±4,15 (15)	72,65±2,03 (15) $p > 0,1$	66,30±7,09 (14) $p > 0,1$
Фосфатидилсерин	232,48±13,09 (13)	201,09±10,55 (15) $p < 0,05$	203,79±5,69 (15) $p < 0,05$
Фосфатидилэтаноламин	406,57±11,16 (17)	413,80±11,57 (14) $p > 0,1$	403,56±21,02 (14) $p > 0,1$
Малоновый диальдегид	7,18±0,47 (16)	9,77±0,73*** (10) $p < 0,01$	9,57±0,49**** (13) $p < 0,01$

Примечание.  $p$ —достоверность отличия от контроля. Изменеше к контролю (%): \*—11,3; \*\*—15,4; \*\*\*+36,1; \*\*\*\*+33,3.

ФЛ во фракции ФХ, и особенно ФС, заметна отчетливая тенденция к снижению их содержания. Ранее нами было показано, что к 60-й мин ишемии, вызванной двусторонней перевязкой общих сонных артерий, снижалась интенсивность обмена гидрофильной части фосфолипидных молекул как в суммарных ФЛ, так и во фракциях ФХ и ФС, содер-

жание же этих ФЛ не менялось. Следовательно, вызываемая двусторонней перевязкой общих сонных артерий в сочетании с гипотонией исполняя ишемия мозга приводила к более резким изменениям фосфолипидного обмена в нервной ткани. Результаты других исследователей, полученные при полной ишемии мозга показали, что к 5-й мин. ишемии в ткани мозга снижается содержание суммарных ФЛ, а также фракций ФХ и аминофосфолипидов [2—5]. Таким образом, сопоставление представленных в настоящей работе фактов с полученными ранее результатами и литературными данными указывает на то, что, чем резче ухудшение мозгового кровоснабжения, тем выраженнее нарушения фосфолипидного обмена и тем раньше они наступают.

Исследование содержания МДА в коре больших полушарий мозга крыс показало, что к 30- и 60-й мин. ишемии оно увеличивается по сравнению с контрольными значениями на 36,1 и 33,3% соответственно. Найденное увеличение содержания МДА в определенной степени может свидетельствовать об усилении перекисного окисления ненасыщенных жирных кислот в коре больших полушарий мозга. Поскольку значительная часть ненасыщенных жирных кислот ткани мозга входит в состав молекул ФЛ, можно предположить, что реакции ПОЛ затрагивают фосфолипидный компонент мембран нервной ткани.

Таким образом, при тяжелой неполной ишемии мозга одной из причин необратимых изменений в ЦНС может быть повреждение мембран, связанное, в частности, с нарушением фосфолипидного обмена и изменением состава гидрофобной части молекул ФЛ, вовлеченных в реакции ПОЛ.

## BRAIN CORTICAL PHOSPHOLIPIDS AND MALONYLDIALDEHYDE DURING INCOMPLETE ISCHEMIA IN RATS

ZAMURUJEV O. N.

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

Severe incomplete brain ischemia in rats was induced by bilateral common carotid artery clamping combined with hypovolemic hypotension with mean arterial blood pressure of 50 mm Hg. By the 30min. of ischemia the level of cortical total phospholipids (PhL) decreased by 11,3%, and the level of malonyldialdehyde (MDA), end-product of lipid peroxidation, increased by 36,1%, remaining on this level in the next 30 min of ischemia.

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Замуруев О. Н. Бюл. эксперим. биол. и мед., № 10, с. 419—421, 1978.
2. Majewska M. D., Strosznajder J., Lazarewicz J. Brain Res., v. 158, № 2, p. 423—434, 1978.

3. *De Medio G. E., Trovarelli G., Goracci G., Palmarini C. A., Floridini A., Fint C., Mazzari S., Finesso M., Porcellati G.*—In: Proc. Eur. Soc. Neurochem. 2nd Meet. ESN, Göttingen, p. 311—319, Weinheim—New York, 1978.
4. *Sobotka P., Hinzen D. H.* *Activ. nerv. super.*, v. 15, № 1, p. 28, 1973.
5. *Demopoulos H., Flamm E., Seligman M., Fower R., Pletronigro D., Ransohoff J.*—In: Oxygen and physiological function (ed. Jöktis F. F.), p. 491—508, Professional Information Library, Dallas, 1977.
6. *Yoshida S., Inoh S., Assano T., Sano K., Kubota M., Shimazaki K., Ueta N.* *J. Neurosurg.*, v. 53, p. 323—331, 1980.
7. *Владимиров Ю. А., Арчаков А. М.* Перекисное окисление липидов в биологических мембранах, с. 162—175, М., Наука, 1972.
8. *Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. N.* *J. Biol. Chem.*, v. 226, № 1, p. 497—509, 1957.

Поступила 24. V. 1984



## БИОХИМИЧЕСКАЯ АСИММЕТРИЯ МОЗГА

ЛУЦЕНКО В. К., КАРГАНОВ М. Ю.

Научно-исследовательский институт общей патологии и патологической физиологии АМН СССР, Москва

В обзоре обобщены современные данные о биохимической асимметрии мозга. Рассматриваются проблема происхождения нейрохимической латерализации, межполушарные различия в захвате дезоксиглюкозы, распределении медиаторов, сдвигах метаболизма, вызванных фармакологическими агентами, и др. С точки зрения возможного качественного различия пептидов правой и левой половин ЦНС проанализирована проблема «химического переноса» асимметрии позы. Отмечены функциональные и клинические аспекты нейрохимических как предсуществующих, так и возникающих в результате внешних воздействий асимметрий.

Открытие функциональной специализации полушарий оказало «революционизирующее влияние на представления о физиологических основах человеческой психики—сознании и мышлении» [1], позволило по-новому взглянуть на происхождение таких нервных и психических заболеваний, как шизофрения, истерия, эпилепсия, маниакально-депрессивный психоз, алкоголизм [2—4]. Различные формы избирательного воздействия на одно полушарие начали применять в клинике [5, 6].

Возникает закономерный вопрос—имеет ли функциональная асимметрия хотя бы отчасти биохимическую основу или же специализация полушарий целиком и полностью обусловлена надмолекулярными структурами? В настоящей работе приводятся доказательства реального существования биохимической асимметрии (БА) мозга, функциональной значимости биохимической латерализации и рассматриваются некоторые теоретические проблемы, связанные с этим феноменом.

### Происхождение биохимической асимметрии мозга

Существуют убедительные примеры генетической детерминации асимметрии морфологических признаков у некоторых насекомых и моллюсков, об этом же свидетельствует высокий уровень корреляции между различными формами асимметрий у человека [7]. Эти факты

послужили основой для формулирования ряда гипотез генетической детерминации, например, гипотезы существования одного лишь гена праворукости [6]. С другой стороны, не вызывает никакого сомнения, что латерализующее влияние на функции мозговых полушарий оказывают и негенетические факторы, к которым относятся расщепление ткани зиготы, приводящее к появлению монозиготных близнецов, пренатальное повреждение мозга, инструментальное обучение и социально-культурные воздействия [6—10].

Некоторые исследователи полагают, что асимметрия предсуществует в цитоплазме яйцеклетки до оплодотворения (цитоплазматическая наследственность). Показано, в частности, что актиномицин, предотвращающий синтез РНК, не оказывает влияния на морфологическое развитие до стадии дифференциации тканей [10]. С другой стороны, различия в белках обнаружены в клеточных линиях, возникших уже от первых двух бластомеров [11]. Отсюда делается вывод, что не гены определяют направление асимметрии, а, скорее, предсуществующая асимметрия обуславливает неодинаковую экспрессию генов в клетках слева и справа от средней линии [10].

В работе Morgan [10] обращается внимание на весьма важную особенность онтогенетического развития—преимущество в скорости развития или специализации структур левой половины тела. С этой точки зрения левостороннее представительство центра речи у человека, преимущественное развитие и большая специализация левых хабенулярных ядер в мозгу позвоночных выступают в качестве частных примеров общей биологической закономерности. Макроструктурное преимущество «левостороннего» развития Morgan пытался объяснить на молекулярном уровне, а именно спецификой вторичной и третичной структуры белков, построенных из левовращающих стереоизомеров аминокислот [10]. Хотя причинная связь микро- и макроскопической «левосторонности» не доказана [7], идея избирательной репрессии ДНК в клетках левой и правой половины тела, а следовательно, и возможное различие синтезируемых этими клетками белков, может оказаться справедливой [7].

Количественные различия в содержании обычных компонентов организма (аминокислот, гормонов) на ранней стадии онтогенеза могут усилить или ослабить дальнейшую функциональную дифференциацию полушарий. Так, фенилкетонурия у молодых самок крыс приводит к большей латерализации мозга животных [12]. По мнению Гешвинда, возникновение левшества, связанного с доминированием правого полушария, обусловлено чрезмерной экспрессией гена, детерминирующего либо необычно высокое содержание тестостерона в организме плода, либо чрезмерную чувствительность организма к нему. В результате происходит замедление темпа роста обычно доминирующего левого полушария, а также тимуса, что проявляется у взрослых в форме леворукости, задержек в овладении речью и повышенном риске аутоиммунных заболеваний (цит. по Maix [13]).

Большое значение для возникновения асимметрии мозга имеет воздействие внешних факторов в течение определяемого наследственностью сенситивного периода. Микроринъекция глутамата в левое (но не в правое!) полушарие двухдневных цыплят сопровождается увеличением числа нападений и копуляционным поведением в отношении других особей. Если в последние дни инкубации яйца не освещали, функциональная латерализация мозга кур не развивалась. Было установлено, что для возникновения функциональной асимметрии мозга кур достаточно 2-часового освещения на 19-й день инкубации. Эффект освещения объясняют положением куриного эмбриона в яйце, при котором левый глаз прикрыт крылом и туловищем, а правый, прилежащий к воздушной камере, освещен. Поступающий в левое полушарие поток нервных импульсов усиливает активность нейронов, что, в свою очередь, сопровождается притоком крови, усилением синтеза белка и других пластических процессов в клетках [14].

### Асимметрии в интенсивности энергетического метаболизма

Интенсивность энергетического обмена является обобщенной характеристикой всех видов работы нервной клетки, поэтому измерение потребления энергетического субстрата было с успехом использовано для обнаружения функционально активных в данной ситуации структур мозга. С этой целью ауторадиографически оценивали накопление структурами [ $^{14}\text{C}$ ]-2-дезоксид-Д-глюкозы (ДГ), которая, подобно глюкозе, захватывается нейронами, но в отличие от нее не метаболизируется из-за отсутствия гидроксила во 2-м положении [15].

С помощью этого метода удалось обнаружить 3 вида метаболической асимметрии в ЦНС: а) различие в активности структур левой и правой сторон мозга (лобные доли, гиппокамп); б) различия, коррелирующие с направлением вращения животных (полосатое тело, средний мозг); в) абсолютные различия в активности между сторонами, которые коррелируют со скоростью вращений (таламус, гипоталамус) или со случайными движениями (мозжечок) [16]. Было установлено также, что функциональная латерализация мозга крыс зависит от пола и возраста. У новорожденных самок в стволе мозга более активны структуры левой, а в гиппокампе и промежуточном мозгу — правой стороны. Напротив, у взрослых самок накопление ДГ больше в левой половине гиппокампа. Мозг самцов по критерию захвата ДГ более симметричен: одностороннее преобладание активности справа выявлено лишь в среднем мозгу [16]. Удалось показать, что вращение животных, вызванное фенилклидином, обусловлено односторонней активацией гиппокампа, что было подтверждено в опытах с локальным разрушением структур мозга [17].

Корреляционный анализ [18] данных по распределению медиаторов и ферментов их синтеза в 9 структурах [19] левой и правой половин мозга человека позволил получить убедительные доказательства нейрохимической доминантности одной из симметричных структур. В бледном шаре обнаружено больше дофамина (ДА) и более высокая активность холинацетилтрансферазы (ХАТ). Поскольку большинство людей—правши, указанный эффект свидетельствует о преобладании ХАТ и ДА на стороне, противоположной предпочитаемой руке. Сходным образом у крыс ДА больше в полосатом теле, контралатеральном предпочитаемой лапе [20].

В работе Sorbi и соавт. [21] у 3-х пациентов-мужчин отмечено преобладание активности ХАТ слева в коре больших полушарий между Сильвиевой и Роландовой бороздами. Найдено, что асимметрии по активности ДА и ХАТ положительно коррелируют в хвостатом ядре, бледном шаре и скорлупе; ХАТ и глутаматдекарбоксилазы (ГДК)—положительно во всех областях коры и отрицательно—во всех нигростриальных структурах. У более старых пациентов все структуры мозга содержали меньше ГАМК, активность ГДК в них была ниже, асимметрия активности ХАТ между левым и правым бледным шаром меньше, чем у молодых пациентов. Положительная корреляция обнаружена между асимметрией в содержании ГАМК и активностью ГДК, являющейся ключевым ферментом ее синтеза, причем однонаправленная асимметрия для этой нейромедиаторной системы выявлена во всех исследованных структурах. Любопытно, что в пределах одной структуры сдвиги в содержании всех исследованных веществ при сравнении с одноименной структурой противоположной стороны были однонаправленными, то есть структура выступала как единый функциональный блок [18].

При изучении симметричных зон коры головного мозга человека, соответствующих зрительному, слуховому и кожному анализаторам, не наблюдалось различий в содержании норадреналина (НА) и активности MAO слева и справа. Напротив, в двигательном анализаторе выявлено левостороннее преобладание НА и MAO. Активность MAO была выше также и в двигательном центре письменной речи [22].

Сильно латерализовано распределение НА в таламусе человека. В подушке НА больше слева, тогда как в области соматосенсорного входа—справа [23]. При обсуждении полученных экспериментальных данных Оке и соавт. обращают внимание на значительную функциональную латерализацию таламуса человека, отмечая, что только при повреждении левой подушки и вентролатерального участка таламуса, но не других его структур, возникают нарушения речи. Асимметрия в содержании НА в отделах таламуса, получающих соматосенсорную информацию, по мнению авторов, может иметь отношение к латерализованным нейрофизиологическим дисфункциям при шизофрении. Межполу-

шарные различия в содержании НА обнаружены также в таламусе крысы [24].

Изучение последствий электрического раздражения хвостатых ядер у кошек свидетельствует об относительной функциональной специализации этих структур. Правому ядру более свойственны тонические влияния, обеспечивающие регуляцию позы и мышечного тонуса, а левому—фазические, запускающие генерализованные локомоторные акты типа маневрных движений. Введение кошкам L-ДОФА в большей степени подавляло повороты головы, вызванные раздражением левого хвостатого ядра, а галоперидол—облегчало эффекты стимуляции правого хвостатого ядра [25]. Авторы предполагают, что ДА-рецепторы левого полушария более чувствительны, чем правого, и указывают, что экстрапирамидные гиперкинезы у людей [26] вызывают лишь те ДА-ергические препараты, которые в опытах на кошках усиливают межквартную асимметрию (L-ДОФА, галоперидол, но не апоморфин и клозапин).

Косвенным показателем асимметрии соответствующих нейромедиаторных систем может быть вызванное химическими средствами ротационное поведение. Оказалось, что ряд дофаминергических (апоморфин, амфетамин, ЛСД, L-ДОФА), холинергических (скополамин) веществ и морфин вызывают ротационное поведение здоровых животных [27]. Ингибирование тирозингидроксилазы устраняет эффекты амфетамина (ингибирование дофамин- $\beta$ -гидроксилазы неэффективно), но не оказывает влияния на ротационное поведение, вызванное агонистом ДА-рецепторов—апоморфином. Антагонист ДА-рецепторов—галоперидол подавлял действие как амфетамина, так и апоморфина. Скополамин вызывал вращение в том же направлении, что и амфетамин, и усиливал его действие. Напротив, холиномиметик пилокарпин угнетал ротационное поведение, вызванное амфетаминном. Подводя итоги исследований фармакологии ротационного поведения, авторы делают вывод, что оно в первую очередь связано с асимметрией дофаминергических nigrostriatalных систем, тогда как другие системы, действие которых опосредуется НА, серотонином (5-OT), АХ и ГАМК, лишь модулируют ротационное поведение. Следует иметь в виду, что в ротационном синдроме можно выделить два компонента: позную асимметрию, определяющую направление вращения и обусловленную дисбалансом дофаминергических функций в левом и правом стриатуме, и увеличенную двигательную активность, вызванную стимуляцией ДА-рецепторов в п. *accumbans* [28, 29].

Введение нейролентиков больным-правшам приводит к возникновению дискинезий справа мышц верхних и нижних конечностей, что, по мнению авторов, свидетельствует о преимущественном воздействии препаратов на базальные ганглии левого (доминантного) полушария [30].

Дофаминергическая система может вовлекаться в асимметричные поведенческие эффекты веществ, не являющихся дофаминергическими

по первичному механизму действия. Например, вератрамин вызывает у животных асимметричные изменения тонуса мышц типа «борцовских движений» с чрезвычайно сильным тремором и нерегулярными перекатываниями. Апоморфин и L-ДОФА подавляли, а галоперидол усиливал действие вератрамина [31].

Хорошо известно, что ротационные синдромы, возникающие под влиянием ДА-ергических веществ при одностороннем поражении интростриальных путей обусловлены возникающей пре- и постсинаптической асимметрией ДА-системы [32, 33]. Исходя из этих данных, неоднократно предпринимались попытки обнаружить латерализацию нейромедиаторных систем, обуславливающую асимметрично поведение животных с неповрежденным мозгом. Применяя для оценки высвобождения дофамина электрохимические электроды, вживленные в левое и правое хвостатые ядра [34], не удалось обнаружить асимметрии секреции ДА в покое, однако при пищевом подкреплении одного из направлений вращения отмечено усиление высвобождения ДА на стороне, противоположной направлению вращения. После прекращения движения асимметрия в высвобождении ДА исчезала, ее не наблюдали и в условиях усиления секреции ДА под действием амфетамина. Лишь одностороннее повреждение чёрной субстанции приводило к возникновению ротационного синдрома с преобладанием высвобождения ДА на стороне, противоположной направлению вращения [35]. В исследовании Hung и соавт. [36] не было выявлено различия между сторонами в связывании меченых [<sup>3</sup>H]-спироперидола, налоксона, 5-ОТ, хиноклидинилбензилата и дигидроалпренолола тканями фронтальной коры, гиппокампа и полосатого тела мозга крысы. Не отличались эти симметричные структуры и по содержанию Met-энкефалина и вещества Р. Эти данные как будто свидетельствуют о том, что количество рецепторов ДА, АХ, опиатов, 5-ОТ и НА в полушариях мозга крысы одинаково.

Однако другой группой исследователей были получены убедительные доказательства количественной асимметрии ДА-системы у крыс. Было установлено, что ДА на 12% больше в полосатом теле на стороне, противоположной предпочтительному ходу в Т-образном лабиринте [20]. После введения амфетамина разница в содержании ДА возрастала до 25%. Напротив, никакого различия в содержании АХ в покое и после введения амфетамина между левым и правым полосатым телом не найдено. Сказанное справедливо и для содержания НА и АХ в конечном и среднем мозгу [20, 27].

Асимметрия ДА-системы выявлена на пре- и постсинаптическом уровне. Показано, что активность ДА-стимулируемой аденилатциклазы (маркер рецепции ДА) на 16,4% выше на стороне контралатеральной, а содержание диоксифенилукусной кислоты на 39% выше на стороне, ipsilateralной направлению спонтанных вращений животных. Полагают, что в норме (в отсутствие фармакологических воздействий) большая пресинаптическая ДА активность компенсируется

за счет более низкой постсинаптической чувствительности к ДА [37].

Об асимметрии постсинаптических рецепторов ДА свидетельствуют результаты ряда исследований [37, 38]. При изучении связывания [<sup>3</sup>H]-спирерона—антагониста дофаминовых рецепторов—было найдено, что число мест связывания в полосатом теле слева на 23% выше, чем справа, а в гомогенате ткани (обонятельный бугорок и вентральная часть аккумбентного ядра) связывание правосторонней структурой на 10% выше, чем левосторонней [38]. Асимметричные изменения активности полушарий наблюдали также при воздействии соединений, отличных от агонистов и антагонистов ДА. Недавно получены первые доказательства различного влияния химических препаратов на метаболизм медиаторов в левом и правом полушариях мозга. Такие известные психотропные вещества, как литий и хлорамипрамин, избирательно влияют на асимметрию мезостриатных метаболитов серотонина и конформацию ключевого фермента биосинтеза серотонина—триптофангидроксилазы, что проявляется в изменении сродства к ее кофактору—тетрагидробионтерину [39].

Интрацеребральное введение этаноламин-о-сульфата и внутрибрюшинное аминокснуксуной кислоты (ингибитора апофермента и кофактора ГАМК-трансминазы [ГАМК-Т] соответственно) приводит спустя 4 и 24 ч к одинаковому ингибированию ГДК и ГАМК-Т в симметричных ядрах полушарий, но не одинаковым изменениям уровня ГАМК в них. Так, справа увеличение ГАМК значительно выше в черной субстанции, верхнем двухолмии и аккумбентном ядре, слева—в вентральной покрышке, вентромедиальной области таламуса и хвостатом ядре. В бледном шаре межполушарных различий не выявлено [40]. Поскольку накопление ГАМК в нервной ткани обусловлено импульсной активностью нейронов [41], латерализация в накоплении ГАМК может отражать врожденную асимметрию в функциональном состоянии ГАМК-ергических путей в двух полушариях.

Характерная для головного мозга человека [6] латерализация аффективных реакций недавно обнаружена у крыс. Оказалось, что асимметрия в чувствительности подкрепления связана с направлением самопроизвольных, а также вызванных амфетаминном вращений: порог для самостимуляции ниже в латеральном гипоталамусе, противоположном направлению вращения [42]. В низких дозах амфетамин влиял преимущественно на структуры мозга с низким порогом, тогда как морфин—с высоким порогом для самостимуляции. Высказано предположение, что шизофрения может быть нарушением, обусловленным гиперактивностью ДА-ергических путей подкрепления в доминантном полушарии [16].

## Нейромедиаторные системы, опосредующие асимметрии позы, вызванные нейропептидами

После внутрижелудочкового введения животным тиреолиберина в случае предварительного введения апоморфина возникает кружение животных от головы к хвосту *по часовой стрелке*, тогда как на фоне действия резерпина—*против часовой стрелки*. Аналогичный эффект тиреолиберина наблюдали и на фоне действия амфетамина. Тиреолиберин и амфетамин сами по себе не вызывали ротаций. Был сделан вывод, что действие тиреолиберина обусловлено неспрямой стимуляцией высвобождения ДА [43].

Под влиянием соматостатина у крыс возникали перекатывания (вращение относительно длинной оси тела), причем только в левую сторону. Препараты, изменяющие ДА-ергическую активность (апоморфин, резерпин, амфетамин), не оказывали влияния на перекатывания, вызванные соматостатином, тогда как блокатор холинорецепторов— атропин—их полностью устранял. Подводя итоги обоих исследований, Сohn и соавт. [43] приходят к выводу, что тиреолиберин и соматостатин действуют противоположным образом не только на секрецию гормонов клетками передней доли гипофиза, но антагонистически регулируют широкий диапазон поведенческих реакций, включая ротации, двигательную активность, наркоз и температуру тела. Регулирование поведения этими гормонами, по-видимому, происходит в результате постоянного уравнивания управляемой тиреолиберином ДА-ергической и контролируемой соматостатином холинэргической системами.

Перекатывания, вызванные введением соматостатина, по-видимому, обусловлены увеличением активности холинэргических нейронов гиппокампа, поскольку выявлено усиление кругооборота АХ в этой структуре, связанное с возникновением вращений [44, 45].

Помимо соматостатина, перекатывания животных с неповрежденным мозгом способен вызывать также вазопрессин. При введении в желудочки мозга крыс 1,6-аминосуберил-Arg<sup>8</sup>-вазопрессина возрастал мышечный тонус, туловище искривлялось, крысы лежали на одном боку. В отличие от соматостатина, направление вращения при перекатывании у части животных было в левую, а у других—в правую сторону, однако у каждой крысы оно было однонаправленным в течение всего эксперимента.

Дофаминовые антагонисты (флуфеназин, галоперидол), 6-оксидофамин, вызывающие избирательное уменьшение ДА в мозгу [46], или блокада синтеза катехоламинов с помощью  $\alpha$ -метил-п-тирозина, усиливали перекатывания, вызванные вазопрессином. Блокатор мускариновых холинорецепторов устранял потенцирующее действие флуфеназина на вазопрессиновые реакции, а D-Ala<sup>2</sup>-Met<sup>4</sup>-Phe<sup>4</sup>-Met<sup>5</sup>-энкефалин в умеренных дозах (20 нг/крысу, внутрижелудочковое введение) не влиял на его эффекты. Таким образом, вызываемая сомато-

статинном и вазопрессинном особая форма ротационного поведения—перекаты вправо—включает торможение ДА-ергических и усиление холинергических [47] процессов.

Опиоидные пептиды также вызывают изменение позы у животных. При нанесении на спинной мозг хордотомированной крысы Met-энкефалина возникает преимущественно флексия левой конечности, а Leu-энкефалина—правой задней конечности [48].

Поскольку различия в содержании Met-энкефалина и связывании [<sup>3</sup>H]-налоксона между левой и правой половинной головного мозга крысы пока выявить не удалось [36], а соответствующие данные для спинного мозга отсутствуют, механизмы действия опиоидных пептидов на позу остаются неизвестными.

### Нейрохимические асимметрии, связанные с полом животных

Показано, что внутрибрюшинное введение амфетамина (20 мг/кг) вызывает у самок крыс Спрэг-Дуэли более латерализованное ротационное поведение, чем у самцов [49], а ранняя постнатальная гиперфенилаланинемия только у самок крыс сопровождается увеличением числа спонтанных ротаций в зрелом возрасте [50]. С другой стороны, апоморфин (10 мг/кг) увеличивал число ротаций у самцов Спрэг-Дуэли в большей степени, чем у самок. У крыс линии Фишер чувствительность самок и самцов к апоморфину была одинакова. Был сделан вывод, что у самок Спрэг-Дуэли преобладает пресинаптическая асимметрия по ДА, тогда как у самцов—постсинаптическая. Хотя эффекты апоморфина у самцов и самок линии Фишер не различались, тот факт, что у самок большее число вращений вызывал амфетамин, чем апоморфин, а у самцов эффективность этих препаратов была противоположной, позволил предположить, что и у крыс линии Фишер преобладающие механизмы ротационного синдрома у двух полов различны [51].

Недавно обнаружена четкая нейрохимическая латерализация, связанная с репродуктивной функцией. Микронъекция эстрадиола (метаболита тестостерона) в левую половинку гипоталамуса поворожденных самок крыс приводила к дефеминизации (уменьшению у взрослых крыс женского полового поведения и положительной обратной связи с секретцией лютеинизирующего гормона), а в правую половинку—к маскулинизации, то есть, развитию мужского полового поведения. Так как дефеминизация и маскулинизация опосредованы разными ядрами гипоталамуса, полученные результаты свидетельствуют об асинхронном развитии соответствующих симметричных структур [52].

У взрослых самцов крыс линии Вистар в утренние часы (но не вечером!) люлиберин больше в правой, а у беспородных крыс—в левой половине гипоталамуса, и только справа у крыс Вистар отмечено уменьшение люлиберина при удалении контралатерального се-

менника [53]. Компенсаторное увеличение размеров интактного ячника после удаления контралатеральной железы можно предупредить в случае разрушения только правого голубого пятна [54].

### Нейрохимические механизмы асимметричного нарушения функций и процессы компенсации после повреждения структур одной половины мозга

Различные последствия insults левого и правого полушарий головного мозга человека известны давно [6], однако исследования нейрохимических изменений, обуславливающих или сопутствующих наблюдаемым функциональным сдвигам, только начинаются. Недавно было показано, что перевязывание правой средней мозговой артерии [55] или ограниченное правостороннее (левостороннее неэффективно) повреждение коры головного мозга у крыс [56] вызывает поведенческие эффекты, проявляющиеся в увеличенной активности животных, изменениях агрессивности, вызванной электрошоком, и самостимуляции гипоталамуса [57, 58].

После поражения правого полушария отмечено уменьшение концентрации НА и/или ДА как в ипси-, так и в контралатеральной коре, черной субстанции и голубом пятне. Большое значение уменьшения содержания НА для возникновения «эффектов правого полушария» следует из наблюдения, что внутрибрюшинное введение блокатора захвата НА-дез-метилмипрамина или предоперационное интраинтестинальное введение 6-оксидофамина предотвращало развитие гиперактивности [58]. Некоторое сомнение в том, что асимметрию нарушения функций можно отнести за счет НА-ергической системы породили данные о последствиях одностороннего введения в кору 6-оксидофамина и каннтовой кислоты. В этом случае снижение содержания НА возникало как при лево-, так и при правостороннем введении этих препаратов, тогда как гиперактивность вызывала лишь их правосторонняя микроинъекция [59, 60].

Представленные данные указывают на то, что нейронные механизмы, обуславливающие возникновение гиперактивности, являются постсинаптическими для НА-ергических нервных окончаний. Поскольку повреждение клеток коры каннтовой кислотой вызывает уменьшение содержания ДА в хвостатых ядрах, что, по-видимому, связано с кортикомезостриатной деафферентацией, гиперактивность животных может быть обусловлена подкорковыми структурами.

Повреждение группы нейронов вызывает адаптивные морфофункциональные перестройки в денервированных структурах и компенсационные процессы, обуславливающие устранение функционального дефекта. Так, одностороннее разрушение нижнего и медиального вестибулярных ядер приводит после введения апоморфина к вращению животных в направлении разрушенного ядра, а латерального и верхнего—в противоположном направлении. Авторы полагают, что в пер-

вом случае происходит повышение чувствительности рецепторов ДА в полосатом теле на контра-, а во втором на ипсилатеральной стороне [61].

Характерным для всех позвоночных животных является компенсирование с течением времени нарушений позы и локомоции у животных, вызванных односторонним повреждением вестибулярной системы. Тем не менее, специфические химические воздействия указывают на сохранение химической асимметрии мозга у животных с вестибулярной компенсацией. Холиномиметики вызывают у лягушек полную декомпенсацию с появлением всех симптомов, характерных для вестибулопатии перед развитием компенсации. Напротив, холинолитики вызывают изменение позы и движения, являющихся зеркальными по отношению к тем, которые предшествовали компенсации. Полагают, что компенсаторная перестройка в ЦНС при вестибулопатии включает модификацию холинергических синапсов ствола мозга [62].

#### «Химический перенос» асимметрии позы

Разрушение половины передней дольки мозжечка у животных приводит к возникновению сгибания ипси- и разгибания контралатеральной задней лапы, причем хордотомия на уровне Th<sub>7</sub> не устраняет асимметрии тонуса задних конечностей, если период существования асимметрии тонуса превышает 45 мин (период консолидации «спинальной памяти») [63]. Для выявления возникающей в этом случае асимметрии моносинаптических рефлексов поясничного отдела спинного мозга необходимо нормальное функционирование НА-ергических нервных окончаний (нисходящих трактов?). Истощение запасов НА в нервных окончаниях вследствие резерпинизации животных приводит к устранению асимметрии рефлексов, однако после введения этим крысам ДОФА она тотчас возникает [64]. Отсюда следует, что само формирование следа в спинальных центрах осуществляется какой-то другой нейрохимической системой, отличной от моноамнергической. В этой связи представляют значительный интерес данные Giurgea и соавт. [65], свидетельствующие о том, что в головном и спинном мозгу крыс с удаленной половиной передней дольки мозжечка появляется пептидный фактор, значительно укорачивающий время, необходимое для возникновения устойчивой спинальной асимметрии у другого, сходным образом оперированного животного [66]. Некоторое недоумение вызывает расхождение величин латентного периода консолидации спинальной памяти (30—45 мин) и первых признаков выявления пептидов в мозгу (больше 2-х ч).

В цитированных выше работах следовые изменения на уровне спинного мозга рассматривались в качестве ответа на усиление нисходящих (ретикулоспинальных?) влияний, то есть как форма спинальной памяти. В исследованиях Вартапяна [67, 68] феномен спинальной памяти получил другое объяснение. Было показано, что создание

препятствия для распространения ликвора из цистерн головного мозга к спинальному уровню препятствует возникновению асимметрии мышечного тонуса задних конечностей. С другой стороны, ликвор или экстракт мозга, взятый у животных с мозжечковым поражением, при непосредственном воздействии на спинной мозг интактного животного воспроизводит эффект унилатерального мозжечкового поражения. На основании этих данных был сделан вывод о том, что фактор (пептид с  $M_r$  1—2 кД), обнаруживаемый в ликворе и мозгу крыс с мозжечковым поражением, является «химическим эквивалентом патологического состояния» и индуктором устойчивых асимметричных сдвигов возбудимости на спинальном уровне.

Нами изучалась роль пептидов в осуществлении ротационного поведения, возникающего после односторонней коагуляции ядра Дейтерса или его гиперактивации (создание генератора патологически усиленного возбуждения с помощью столбнячного токсина) [69]. Оказалось, что экстракты головного мозга крыс с этими формами вестибулопатии при внутрижелудочковом или внутримозговом введении интактным крысам вызывают у них четко латерализованный ответ, а именно задержку в подтягивании пассивно отставленной задней конечности (пассивная экстензия—ПЭ конечности), односторонней с той, которая была разогнута у донора. Сам ротационный синдром (вестибулопатию) вызвать не удалось, но, как указано выше [28, 29], специфическим для ротационного синдрома является именно характер изменения мышечного тонуса, определяющий направление вращения.

Анализ эффектов экстрактов показал, что независимо от способа получения дисбаланса активностей ядер Дейтерса двух сторон (унилатеральное разрушение или активация) ПЭ у реципиента во всех случаях возникала на стороне, соответствующей более активному ядру, определяющему направление вращения. Судя по величине  $M_r$  (1—2 кД), чувствительности к протезу, термоустойчивости, факторами «вестибулопатии» также являются пептиды [69].

При другой форме асимметричного поражения ЦНС—односторонним разрушением участка моторной коры головного мозга—в ликворе человека и крысы появляются факторы позной асимметрии (ФПА), способные вызвать у интактных реципиентов усиление моносинаптических рефлексов на стороне флексии задней конечности у донора [70, 71]. Сопоставление времени возникновения унилатеральной флексии задней конечности с активностью ФПА в ликворе оперированных животных свидетельствовало об известном параллелизме обонх феноменов [72], а изучение локализации ФПА показало, что после повреждения коры ФПА сначала обнаруживается в гипофизе, потом в ликворе и, наконец, в мозгу (соответственно через 5, 24, 48 ч). Обобщив полученные данные, Вартанян и Клементьев [71] пришли к выводу, что «повреждение пирамидной системы мозга сопровождается активацией высвобождения (по-видимому, из гипофиза) нейропептид-

ного фактора, индуцирующего перестройки спинного мозга... и начинающего собирать новую систему с самого основания—сегментарного уровня». На стадии компенсации асимметрии в экстрактах мозга обнаружен фактор компенсации, инактивирующий ФПА [77].

Сказанное выше не объясняет самого главного: почему одностороннее повреждение или активация ЦНС приводит к появлению пептидов—«асимметринов»? Самым простым предположением является гипотеза о предсуществовании асимметрии распределения в мозгу «лево»- и «правосторонних» факторов и их рецепторов. Эта гипотеза была проверена двумя группами исследователей [73—75]. Несмотря на различия видов животных (крыса, бык), способов экстракции ткани головного мозга, методов тестирования изменений мышечного тонуса задних конечностей, протеолитических ферментов, использованных для доказательства пептидной природы факторов, основные выводы исследователей совпадают. Левая половина головного мозга содержит пептидные факторы, вызывающие у интактных реципиентов усиление тонуса мышц левой задней конечности, тогда как факторы правой активируют люмбальные мотонейроны справа [74]. Поскольку антагонисты опиатных рецепторов (налуксон, налорфин) подавляют асимметричные изменения тонуса, вызванные факторами из мозга животных с вестибулопатией [69] и из половины мозга [74], а энкефалины [48] и их синтетические аналоги [76] способны вызывать устойчивую асимметрию тонуса конечностей у спинальных крыс, то можно было думать, что именно асимметрия в распределении эндогенных опиоидов и их рецепторов выявляется в феномене «химического переноса» асимметрии позы. Однако тот факт, что введение налуксона одновременно с фактором из правой половины мозга лишь задерживает, но не предотвращает появления асимметрии тонуса мышц задних конечностей, свидетельствует против этого предположения [75].

В настоящее время достигнуты значительные успехи в очистке пептидных факторов из правой половины мозга [78], факторов мозжечкового [79] и коркового [80] повреждений, однако пока не удалось получить данных о химической структуре этих веществ.

### Заключение

Представленные выше данные не оставляют сомнений в реальности существования и функциональной значимости химической асимметрии мозга. Выявлено одностороннее преобладание в содержании медиаторов (или модуляторов) в структурах, ответственных за регуляцию мышечного тонуса [18], речь [23], письмо [22], репродуктивную функцию [53]. Обнаружена корреляция асимметрии в нейрональной активности и уровне потребления дезоксиглюкозы [16]. Доказано, что пространственное предпочтение в значительной степени

обусловлено дисбалансом активностей между лево- и правосторонней ингостриальной ДА-ергическими системами [20] и высказываются предположения о возможной биохимической основе латерализации эффекта [42]. Асимметричные изменения мышечного тонуса, вызванные введением животным экстрактов правого и левого полушарий, возможно, свидетельствуют о качественной химической латерализации ЦНС [73—75].

Симметричный способ функционирования на физиологическом уровне нередко достигается за счет существования или возникновения множественных нейрохимических асимметрий. В этом случае количественные межполушарные различия в содержании одного медиатора могут коррелировать с асимметрией в распределении другого медиатора, составляющего с первым единый функциональный блок [18]. Асимметрия в содержании нейромедиаторов в пресинаптических нейронах может быть скомпенсирована асимметрией противоположного знака в эффективности постсинаптической рецепции [37]. Отсюда следует, что для поиска биохимических коррелятов физиологических феноменов требуется техника более высокого разрешения, позволяющая анализировать химические явления в микроструктурах (например, дезоксиглюкозный метод) и в микроинтервалах времени (в частности, с помощью электрохимических электродов). Поскольку нейрохимическая латерализация зависит от многих факторов (наследственности, пола, возраста, суточного цикла и др.), ее выявление сопряжено со значительными трудностями.

Прикладные аспекты нейрохимической асимметрии мозга очевидны. С нейрохимической латерализацией приходится считаться при анализе фармакологических воздействий, поскольку один и тот же фактор, например ингибитор пиридоксальфосфатзависимых ферментов или психотропный препарат, способен вызывать неодинаковые сдвиги в содержании медиаторов в различных лево- и правосторонних структурах, что не может не иметь функционального значения [39, 40]. При планировании нейрохимического эксперимента следует иметь в виду, что асимметричное реагирование мозговых полушарий сопряжено с реципрокными нейрохимическими сдвигами в одноименных структурах [81], что не позволяет использовать второе полушарие в качестве контроля.

Исследование биохимической асимметрии мозга поднимает много важных вопросов, в частности проблему формирования нейронных комплексов, выступающих в роли процессоров специализированных функций (речь, письмо), пластичности в широком смысле (обучение, компенсация), биохимической специализации и др., без решения которых невозможно понимание функциональной латерализации и механизмов согласованного функционирования мозговых полушарий.

# BIOCHEMICAL ASYMMETRY OF BRAIN

LUTSENKO V. K., KARGANOV M. YU.

Institute of General Pathology and Pathological Physiology,  
USSR Academy of Medical Sciences, Moscow

The review is devoted to the problem of origin of neurochemical lateralization, differences in deoxyglucose uptake, neurotransmitter distribution, changes of metabolism, evoked by pharmacological agents between hemispheres. The problem of "chemical transfer" of postural asymmetry is analyzed, taking into consideration the apparent possibility of qualitative difference between peptides from right and left halves of central nervous system. The attention is paid to the functional and clinical aspects of neurochemical asymmetries both pre-existing and appearing as a result of environmental actions.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Симонов П. В.—В сб.: Мозг (под ред. П. В. Симонсва). с. 25—30, М., Мир, 1981.
2. Доброхотова Т. А., Брагина Н. Н. Функциональная асимметрия и психопатология очаговых поражений мозга, М., Медицина, 1977.
3. Flor-Henry P. Amer. J. of Psychiatry, v. 26, p. 400—403, 1969.
4. Flor-Henry P.—In: Origins and evolution of language and speech (S. Harnad, H. Steklis, J. Lancaster eds.). Acad. of Sciences, N. Y., 1976.
5. Чуприков А. Л.—В сб.: Взаимоотношения полушарий мозга, с. 205, Тбилиси, 1982.
6. Спрингер С., Дейч Г. Левый мозг, правый мозг. М., Мир, 1983.
7. Levy J.—In: Lateralization in the nervous system (S. Harnad, R. W. Doty, L. Goldstein, J. Jaynes, G. Krauthamer eds.), p. 195—209, Acad. Press, N.-Y., 1977.
8. Collins R. L. Science, v. 187, p. 181—184, 1975.
9. Collins R. L.—In: Lateralization in the nervous system (S. Harnad, R. W. Doty, L. Goldstein, J. Jaynes, G. Krauthamer eds.), p. 137—150, Acad. Press, N. Y., 1977.
10. Morgan M.—In: Lateralization in the nervous system (S. Harnad, R. W. Doty, L. Goldstein, J. Jaynes, G. Krauthamer, eds) p. 173—194, Acad. Press, N.-Y., 1977.
11. Donohoo P., Kafatos F. C. Developmental Biology, v. 32, p. 224—229, 1973.
12. Glick S. D., Greengard O. Brain Res., v. 202, p. 243—248, 1980.
13. Marx J. L. Science, v. 217, p. 141—144, 1982.
14. Rogers L. J. Nature, v. 297, p. 223—225, 1982.
15. Sokoloff L. J. of cerebral blood flow and metabolism, v. 1, p. 7—36, 1981.
16. Glick S. D., Ross D. A. Trends Neurosci., v. 4, № 8, p. 196—199, 1981.
17. Glick S. D., Melbach R. S., Cox R. D., Maayani S. Brain Res., v. 196, p. 99—107, 1980.
18. Glick S. D., Ross D. A., Hough L. B. Brain Res., v. 234, p. 53—63, 1982.
19. Rossor M., Garrett H., Iversen L. J. Neurochem., v. 35, p. 743—745, 1980.
20. Zimmerberg B., Glick S. D., Jerussi T. P. Science, v. 185, p. 623—625, 1974.
21. Sorbi S., Amaducci L., Albanesi A., Gainotti G. Bull. Soc. ital. biol. sper., v. 56, p. 2266—2270, 1980.
22. Кононенко В. С. Физиол. журн. СССР, с. 65, с. 357—363, 1979.
23. Oke A., Keller R., Mefford I., Adams R. N. Science, v. 200, p. 1411—1413, 1978.
24. Oke A., Lewis R., Adams R. N. Brain Res., v. 188, p. 269—272, 1980.
25. Дутов А. А., Анохов С. С. Физиол. журн. СССР, т. 69, с. 322—325, 1983.

26. *Baldessarini R. J.* Postgrad. Med., v. 65, p. 123—128, 1979.
27. *Glick S. D., Jerussi T. P., Fleisher L. N.* Life Sci., v. 18, p. 889—896, 1976.
28. *Pycock C. J., Marsden C. D.* Eur. J. Pharmacol., v. 47, p. 167—175, 1978.
29. *Kelly P. H., Moore K. E.* Nature, v. 263, p. 695—696, 1976.
30. *Waziri R.* Psychopharmacology, v. 68, p. 51—53, 1980.
31. *Koga T., Fucuda T., Suenaga N.* Japan J. Pharmacology, v. 24, Suppl. 63, 1974.
32. *Ungerstedt U.* Acta physiol. scand. (Suppl.), v. 367, p. 49—66, 1971.
33. *Ungerstedt U.* Acta physiol. scand. (Suppl.), v. 367, p. 69—93, 1971.
34. *Yamamoto B. K., Lane R. F., Freed C. R.* Life Sci., v. 30, p. 2155—2162, 1982.
35. *Freed C. R., Morgan M. E.*—In: Adv. Dopamine Res., Proc. Satell. Symp. 8th Int. Congr. Pharmacol., Okayama, July, 1981, 243—248, Oxford, 1982.
36. *Hung C.-R., Hang J.-S., Bondy S. C.* Neuroscience, v. 7, p. 2295—2298, 1982.
37. *Jerussi T. P., Glick S. D., Johnsen C. L.* Brain Res., v. 129, p. 385—388, 1977.
38. *Schneider L., Murphy R. B., Coons E. E.* Neurosci. Lett., v. 3, p. 281—284, 1982.
39. *Knapp S., Mandell A. J.* Neuropharmacology, v. 19, p. 1—7, 1980.
40. *Starr M. S., Kilpatrick I. C.* Neurosci. Lett., v. 25, p. 167—172, 1981.
41. *Perez de la Mora M., Fuxe K., Höfelfelt T., Ljungdal A.* Neurosci. Lett., v. 5, p. 75—82, 1977.
42. *Glick S. D., Weaver L. M., Meibach R. C.* Science, v. 207, p. 1093—1095, 1980.
43. *Cohn M. L., Cohn M., Taylor F. H.* Brain Res., v. 96, p. 134—137, 1975.
44. *Multhe-Sorensson D., Wood P. L., Cheney D. L., Costa E. J.* Neurochem., v. 31, p. 685—691, 1978.
45. *Wood P. L., Cheney D. L., Costa E. J.* Pharmacol. and Exp. Ther., v. 209, p. 97—103, 1979.
46. *Fucuda T., Yamada K., Suenaga N., Takishita S.* Arch. int. Pharmacodyn., v. 230, p. 100—111, 1977.
47. *Yamada K., Furukawa T.* Arch. int. Pharmacodyn., v. 251, p. 88—94, 1981.
48. Бакалкин Г. Я., Ярыгин К. Н., Трушина Е. Д., Титов М. Н., Смирнов В. Н., Чазов Е. Н. Докл. АН СССР, т. 252, с. 762—765, 1980.
49. *Robinson T. E., Becker J. B., Ramirez V. D.* Brain Res. Bull., v. 5, p. 539—545, 1980.
50. *Glick S. D., Greengard O.* Brain Res., v. 202, p. 243—248, 1980.
51. *Brass C. A., Glick S. D.* Brain Res., v. 223, p. 229—294, 1981.
52. *Nordeen E. J., Yahr P.* Science, v. 218, p. 391—394, 1982.
53. Бакалкин Г. Я., Цибезов В. В., Сюткин Е. А., Веселова С. П., Кривошеев О. Г. Докл. АН СССР, т. 269, с. 763—767, 1983.
54. *Marx J. L.* Science, v. 220, p. 458—490, 1983.
55. *Robinson R. G.* Science, v. 205, p. 707—710, 1979.
56. *Pearlson G. D., Robinson R. G.* Brain Res., v. 213, p. 233—242, 1981.
57. *Robinson R. G., Schoemaker W. J., Scheumpf M., Valk T., Bloom F. E.* Nature v. 225, p. 332—334, 1975.
58. *Robinson R. G., Bloom F. E.* J. comp. physiol. Psychol., v. 92, p. 969—976, 1978.
59. *Robinson R. G., Stitt T. G.* Brain Res., v. 213, p. 387—395, 1981.
60. *Kuhos K. L., Pearlson G. D., Robinson R. G.* Brain Res., v. 239, p. 303—309, 1982.
61. *Shima F., Kitamura K.* Appl. Neurophysiol., v. 41, p. 371—372, 1981.
62. *Abeln W., Bienhold H., Flohr H.* Brain Res., v. 222, p. 458—462, 1981.
63. *Chamberlain T. J., Halcik P., Gerard R. W.* J. Neurophysiol., v. 26, p. 4662—4673, 1963.
64. Латаш Л. П.—В сб.: Гагские беседы. Нейрофизиологические основы памяти, с. 118—132, Тбилиси, Мецниереба, 1979.
65. *Giurgea C., Daliers J., Rigaux M. L.* Arch. int. Pharmacodyn., v. 191, p. 292—300, 1971.
66. *Giurgea C., Mouravieff-Lesuisse F.* Arch. int. Pharmacodyn., v. 191, p. 287—291, 1971.

67. *Вартанян Г. А., Балабанов Ю. В.* Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 85, № 8, с. 147—150, 1978.
68. *Вартанян Г. А., Балабанов Ю. В.*— В сб.: Гагрские беседы. Нейрофизиологические основы памяти, с. 279—287, Тбилиси, Мецниереба, 1979.
69. *Крыжановский Г. Н., Луценко В. К., Карганов М. Ю., Торшин В. И.* Бюл. эксперим. биол. и мед., № 10, с. 404—406, 1981.
70. *Вартанян Г. А., Мороз Б. Т., Сливко Э. И.* Физиология человека, т. 97, с. 295—302, 1981.
71. *Вартанян Г. А., Клементьев Б. А.* Физиология человека, т. 9, с. 122—129, 1983.
72. *Балабанов Ю. В., Варлинская Е. И.* Вестн. АМН СССР, № 6, с. 64—67, 1981.
73. *Карганов М. Ю.* Патологическая физиология и экспериментальная терапия, № 5, с. 93, 1981.
74. *Крыжановский Г. Н., Луценко В. К., Карганов М. Ю.* Бюл. эксперим. биол. и мед., № 1, с. 14—16, 1982.
75. *Бакалкин Г. Я., Ярыгин К. Н., Кобылянский А. Г., Самовилова Н. Н., Клементьев Б. И., Вартанян Г. А., Смирнов В. Н., Чазов Е. И.* Докл. АН СССР, т. 260, с. 1271—1275, 1981.
76. *Вартанян Г. А., Клементьев Б. И., Варлинская Е. И., Балабанов Ю. В., Даниловский М. А., Ярыгин К. Н., Трушина Е. Д., Бакалкин Г. Я., Титов М. И.* Бюл. эксперим. биол. и мед., № 9, с. 50—52, 1982.
77. *Вартанян Г. А.*—В сб.: XIV Съезд Всесоюзного физиологического общества им. И. П. Павлова. т. 1, с. 357—359, Л., Наука, 1984.
78. *Крыжановский Г. Н., Луценко В. К., Карганов М. Ю., Беляев С. В.* Патол. физиология и эксперим. терапия, № 3, с. 69—73, 1984.
79. *Балабанов Ю. В., Шатик С. В., Токарев А. В.* Вестн. ЛГУ, № 3, с. 46—51, 1984.
80. *Вартанян Г. А., Клементьев Б. И., Петров Е. С.* Вопр. мед химии, т. 30, № 3, с. 43—46, 1984.
81. *Levitel V., Chesselet M. F., Glowinski J., Cheramy A.* Brain Res., v. 223, p. 257—272, 1981.

Поступила 25. VII. 1981



УДК 612.822.1:577.153.4

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ХОЛИНЭСТЕРАЗ НЕРВНОЙ ТКАНИ  
МЛЕКОПИТАЮЩИХ И ЧЛЕНИСТОНОГИХ К ИНГИБИТОРАМ

РОЗЕНГАРТ В. И., ШЕРСТОБИТОВ О. Е.

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

В обзоре приведены литературные данные и результаты собственных исследований, касающиеся субстратной специфичности и чувствительности к фосфоорганическим ингибиторам холинэстераз нервной ткани млекопитающих, насекомых и клещей. Показаны существенные различия между ферментами разного происхождения. Избирательное угнетение холинэстеразы членистоногих может быть достигнуто изменениями структуры как фосфорильной, так и отщепляемой части молекулы ингибитора. Особый интерес представляет избирательность, связанная с конформацией гетероцикла и с введением ацетиленовой группы в отщепляемую часть молекулы.

В настоящее время соединения с антихолинэстеразным механизмом действия приобрели широкое распространение как агенты, уничтожающие вредных насекомых и клещей, — средства защиты растений и животных. Поэтому поиски новых веществ, обладающих высоконизбирательной инсектоакарицидной активностью, неизбежно связаны с исследованием свойств холинэстераз (ХЭ) нервной ткани разных животных и с изучением зависимости между строением новых соединений и их антихолинэстеразной активностью. В обзоре рассмотрены литературные данные и некоторые результаты исследований, проведенных в последние годы в нашей лаборатории по сравнительной чувствительности ацетилхолинэстеразы (АХЭ) разных видов животных к ее ингибиторам. Мы не ставили перед собой задачу исчерпывающего рассмотрения всех имеющихся фактов. Некоторые из них описаны в обзорах Бресткина и соавт. [1] и Hollingworth [2]. В книге по избирательной токсичности фосфоорганических соединений (ФОС) [3] этому вопросу посвящена специальная глава. Поэтому основное внимание в настоящем обзоре уделено попытке установить закономерности, связывающие особенности строения ингибиторов АХЭ с их способностью угнетать эти ферменты разного происхождения.

Изучение антихолинэстеразной активности приобретает особое значение в том случае, когда такие исследования проводят не с еди-

ничными соединениями, а с рядами, имеющими логически изменяющуюся структуру. Именно такие исследования позволяют получить информацию об особенностях строения различных участков активной поверхности АХЭ, и их результаты могут послужить основой для практических рекомендаций по синтезу высококонзбирательных инсектоакарицидов.

В соответствии с огромным числом видов, составляющих класс насекомых, разнообразием их экологии, особенностями онтогенетического развития и анатомического строения ХЭ членистоногих отличаются чрезвычайной пестротой как по активности, так и по субстратной и ингибиторной специфичности. В настоящее время нет достаточных оснований для строгой классификации ХЭ членистоногих: отнести их к АХЭ или к бутирилхололинэстеразе (БХЭ), да и нет уверенности, что такое разделение по аналогии с ХЭ млекопитающих (и позвоночных вообще) в принципе корректно. Однако имеются основания считать, что главная биологическая функция АХЭ—быстрое разрушение нейромедиатора АХ, связанная с синаптической передачей нервного импульса,—одинакова у разных видов животных, в том числе у членистоногих. Об этом убедительно свидетельствует обнаруженное в последние годы наличие высокой активности ХЭ по ходу синаптической щели в ганглиях саранчи [4] и американского таракана [5]. Поэтому и фермент членистоногих мы будем называть АХЭ, поскольку речь идет о синаптическом ферменте, ингибирование которого нарушает передачу нервного импульса. В ходе изложения приведены как литературные, так и собственные данные о действии различных веществ не только на АХЭ нервной ткани, но и АХЭ эритроцитов, так как можно считать установленным, что для каждого вида млекопитающих существует полное сходство свойств АХЭ эритроцитов и головного мозга [3, 6].

## 1. Субстратная специфичность

Некоторые данные о субстратной специфичности АХЭ позвоночных и насекомых приведены в табл. 1, из которой видно, что для ферментов позвоночных характерно большее единообразие, чем для насекомых. Ни одна из АХЭ позвоночных не расщепляет перечисленные в таблице субстраты быстрее, чем АХ. Для ферментов всех позвоночных характерна практически полная неспособность гидролизовать бутирилхололин (БХ). В отличие от этого АХЭ насекомых, особенно мух и пчел, весьма активна по отношению и к БХ. Ферменты четырех видов из семи, приведенных в таблице, разрушают мехолин (МеХ) быстрее, чем АХ. Все это свидетельствует о несомненном отличии АХЭ насекомых от фермента позвоночных. И тем не менее нет оснований говорить о какой-то типичной АХЭ насекомых. Разнообразие субстратной специфичности и, как будет показано ниже, чувствительности-

Субстратная специфичность АХЭ позвоночных и насекомых  
(по данным разных авторов)

Вид животного	Объект исследования	Относительная скорость гидролиза (скорость гидролиза АХ принята за 100)		
		пропионил- холлин	бутирил- холлин	мехолин
<b>Позвоночные</b>				
Человек	эритроциты	70	4,1	47
Бык	"	78	3,0	35
Бык	головной мозг	72	1,5	27,5
Крыса	"	79	0,5	37
Голубь	"	78	0	90
Электрический скат	электрический орган	33	0	23
Электрический угорь	"	97	1	22
<b>Насекомые</b>				
Комнатная муха	голова	85	150	22
Полевая муха	"	81	77	25
Медоносная пчела	"	83	122	167
Поцелуйный клоп	"	58	38	45
Американский таракан	нервная цепочка	85	13	190
Желудевый долгоносик	целые насекомые	73	38	168
Полевая саранча	"	260	25	450

*Примечание.* Скорость гидролиза каждого субстрата определяли при его оптимальной концентрации

сти к ингибиторам у АХЭ насекомых разных видов настолько велико, что делает обобщение здесь практически невозможным.

## 2. Чувствительность к обратимым ингибиторам

Большую серию исследований по сравнительному изучению свойств АХЭ бычьих эритроцитов и головы мух выполнил Кгурка [7]. Было изучено действие на обе АХЭ симметричных четвертичных аммониевых соединений, содержащих алкильные радикалы различного размера. Результаты этих опытов представлены в табл. 2. Увеличение

Таблица 2

Сродство аммониевых соединений строения  $NR_4^+$   
к разным АХЭ (усл. ед.)

R	АХЭ эритроци- тов быка	АХЭ головы мух
$CH_3$	1	1
$C_2H_5$	2,4	3,6
$n-C_3H_7$	25	—
$n-C_4H_9$	43	190
$n-C_5H_{11}$	7,4	320

размера алкильных радикалов в опытах с АХЭ эритроцитов вначале давало заметный эффект. Особенно велик вклад *n*-пропильной и *n*-бутильной групп. Однако при переходе к тетрапентиламмонии (ТПА)

средство резко снижалось, что может свидетельствовать о стерических ограничениях. В случае АХЭ мух эффект от увеличения радикала был выражен гораздо больше, и у пентильного производного средство не только не снижалось, но, напротив, резко возрастало. Эти данные логичнее всего объяснить тем, что гидрофобная область вокруг анионного центра АХЭ мух протяженнее, шире, чем у АХЭ эритроцитов, и в связи с этим в случае АХЭ мух меньше стерических препятствий для взаимодействия с углеводородными радикалами.

В пользу гипотезы о более обширных гидрофобных областях вокруг анионного центра АХЭ мух свидетельствуют также опыты, в которых изучали способность обратимых катионных ингибиторов защищать оба фермента от необратимого воздействия метансульфонилфторида [8]. Оказалось, что даже очень крупные катионы, такие, как тетрафениларсоний, не защищали от сульфонилирования АХЭ мух, тогда как АХЭ эритроцитов они защищали весьма эффективно. Это можно объяснить тем, что в обширных гидрофобных областях АХЭ мух крупные катионы располагаются свободно, не маскируя эстеразный центр. В АХЭ эритроцитов, в которой гидрофобные области менее обширны, большие катионы выталкиваются на эстеразный центр и препятствуют подходу к нему метансульфонилфторида.

O'Brien [9] сравнивал влияние тетраалкиламмониевых солей на фермент эритроцитов человека и голов мух. В случае АХЭ эритроци-

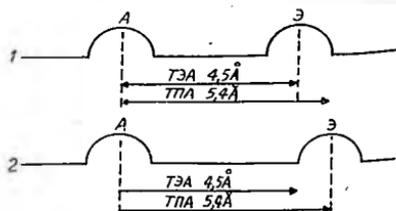


Рис. 1. Схема, иллюстрирующая возможные различия в расстояниях между анионным (А) и эстеразным (Э) центрами у АХЭ млекопитающих (1) и АХЭ мух (2) [9].

тов тетраэтиламмоний (ТЭА) и ТПА оказывали одинаковый защитный эффект против фосфорилирующего действия ФОС. Это говорит о том, что когда положительно заряженный атом азота связывается с анионным центром, у обоих катионов размеры алкильных групп достаточны, чтобы прикрыть эстеразный центр, тем самым защитив его от фосфорилирования. Совершенно иную картину наблюдали в случае АХЭ мух: защитное действие ТПА оказалось в 32 раза выше, чем ТЭА. Следовательно, маскировка эстеразного центра АХЭ мух ТПА осуществляется более эффективно (рис. 1). O'Brien пришел к выводу, что у АХЭ эритроцитов расстояние между анионным и эстеразным центрами должно быть меньше, чем радиус ТЭА, то есть меньше 0,45 нм, тогда как у АХЭ мух это расстояние больше 0,45 нм, но не превышает 0,54 нм—радиуса ТПА.

Различия в действии обратимых ингибиторов на АХЭ эритроцитов человека и АХЭ злаковой тли обнаружены в работе Морале-

ва [10]. В низких концентрациях холлин ( $4 \cdot 10^{-3}$  М), тетраметиламмоний ( $1,3 \cdot 10^{-2}$  М) и ТЭА ( $4 \cdot 10^{-3}$  М) оказывали на АХЭ тли, но не АХЭ человека, активирующее действие, а при более высоких концентрациях ингибировали фермент. Тетрабутил- и триметилацетиламмоний не активировали, а только тормозили АХЭ тли, причем в концентрациях больших, чем АХЭ человека. Эти факты свидетельствуют о том, что гидрофобная область вокруг анионного центра АХЭ тли, по-видимому, менее протяжена, чем у АХЭ человека. Аллостерический пункт АХЭ тли, обуславливающий активацию гидролиза субстратов, не приспособлен к сорбции объемных алкильных радикалов аммониевых соединений.

### 3. Чувствительность к ингибиторам необратимого типа действия

3.1. Чувствительность к арилфосфатам. ФОС, содержащие фенольный радикал в отщепляемой части молекулы, — весьма распространенная группа инсектоакарицидов, обладающих высокой избирательностью действия. Изучение механизма избирательного действия метилнитрофоса

$(\text{CH}_3\text{O})_2\text{P}(\text{S})\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2$  показало [11], что кислородный

родный аналог этого соединения ( $p=0$ ), в который превращается в живом организме метилнитрофос, а также некоторые близкие по структуре фосфаты обладают значительно более выраженным действием на АХЭ мух, чем на АХЭ эритроцитов (табл. 3). Вве-

Таблица 3

Антихолинэстеразная активность производных кислородного

аналога метилнитрофоса строения  $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{P}(\text{O})\text{O}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{R})-\text{NO}_2$

R	$K_{II} \cdot 10^{-5} (\text{M}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1})$		I/II
	АХЭ голов мух	АХЭ эритроцитов быка	
	I	II	
H	2,9	5,2	0,56
$\text{CH}_3$	7,6	0,73	10,3
изо- $\text{C}_3\text{H}_7$	22,6	0,22	100

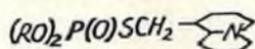
дение метильной и изопропильной группы в положении 3 резко снижало ингибирование АХЭ эритроцитов. При этом ингибирование АХЭ мух значительно усиливалось. Это позволило авторам предположить, что алкильный радикал в положении 3 фенила повышает сродство веществ к участку АХЭ мух, расположенному в районе анионного центра, тогда как в АХЭ эритроцитов быка и, по-видимому, вообще млекопитающих, имеются стерические препятствия для сорбции веществ, содержащих такой радикал. Следовательно, представления о

различном расстоянии между анионным и эстеразным центрами в АХЭ мух и млекопитающих, полученные на основании изучения антихолинэстеразной активности арилфосфатов, совпадают с результатами опытов с обратными ингибиторами.

3. 2. *Чувствительность к ФОС, содержащим гетероциклы.* ФОС, содержащие в отщепляемой части молекулы атом азота, способный протонироваться, существенно повышают антихолинэстеразную эффективность за счет ионного взаимодействия с анионным центром фермента. Было исследовано [12] действие таких ФОС на АХЭ млекопитающих, некоторых насекомых, паутиного клеща. Использованные соединения имели общую формулу  $(RO_2)P(O)SCH_2R'$ , где R представлял собой нормальный радикал различной длины, а R' был остатком природного алкалоида лупинина или его конформационного изомера эпилюпинина, отличающихся друг от друга только тем, что у лупинина заместитель в гетероцикле расположен аксиально, а у эпилюпинина—экваториально. Таким образом, можно было отдельно оценить вклад в биологическую активность как строения гетероцикла, так и величины фосфорильной части молекулы. В табл. 4 приведены

Таблица 4

Антихолинэстеразная активность ( $k_{11}$ ,  $M^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ ) ФОС-производных лупинина строения



Источник фермента	R			
	$C_2H_5$	$C_3H_7$	$C_4H_9$	$C_5H_{11}$
Мозг мыши	$2,1 \cdot 10^4$	$3,6 \cdot 10^4$	$3,6 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^4$
Эритроциты человека	$2,2 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^5$	$3,5 \cdot 10^5$	$5,8 \cdot 10^5$
Эритроциты кролика	$1,1 \cdot 10^4$	$7,5 \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^5$	$5,5 \cdot 10^4$
Голова мухи	$3,4 \cdot 10^8$	$1,2 \cdot 10^8$	$2,9 \cdot 10^7$	$2,3 \cdot 10^6$
Злаковая тля	$1,5 \cdot 10^5$	$4,4 \cdot 10^4$	$1,0 \cdot 10^4$	$9,6 \cdot 10^3$
Рисовый долгоносик	$1,4 \cdot 10^3$	$1,0 \cdot 10^3$	$9,0 \cdot 10^2$	$6,1 \cdot 10^2$
Мучнистый червец	$8,2 \cdot 10^5$	$4,0 \cdot 10^5$	$1,0 \cdot 10^5$	$4,8 \cdot 10^4$
Паутиный клещ	$3,7 \cdot 10^5$	$2,0 \cdot 10^5$	$8,0 \cdot 10^4$	$5,6 \cdot 10^3$

данные об активности лупининовых производных. Закономерность антихолинэстеразного действия на ферменты млекопитающих была одинаковой и заключалась в том, что при удлинении алкильных радикалов до  $C_4H_9$  антихолинэстеразная активность существенно усиливалась. Это вполне согласуется с известными представлениями о наличии в районе эстеразного центра ХЭ млекопитающих гидрофобных участков, с которыми могут взаимодействовать О-алкильные радикалы ФОС [13]. Характер действия изученных ФОС с АХЭ млекопитающих в большинстве случаев не зависел от того, какой гетероцикл (остаток лупинина или эпилюпинина) входил в состав отщепляемой части ФОС.

Взаимодействие ФОС с АХЭ насекомых и клеща оказалось со-

вершено иным, чем с АХЭ млекопитающих. У производных лупинина при удлинении О-алкильных радикалов во всех случаях, независимо от абсолютной величины  $k_{11}$ , имело место снижение антихолинэстеразной эффективности. Некоторые соединения обладали чрезвычайно высокой способностью угнетать АХЭ голов мух. Так, абсолютные величины бимолекулярной константы скорости ингибирования достигали  $10^8$ ; например, для вещества с  $R=C_2H_5$  АХЭ мух оказалась в 15 000 раз чувствительнее, чем АХЭ эритроцитов человека. У производных эпилупинина не было выявлено закономерной зависимости антихолинэстеразного действия от длины углеводородных радикалов.

Приведенные факты свидетельствуют о существенных различиях в строении активной поверхности АХЭ млекопитающих и разных членистоногих. В предыдущей части обзора были приведены данные о том, что у АХЭ мух расстояние между анионным и эстеразным центрами больше, чем у АХЭ млекопитающих. Следует отметить, что гидрофобная область вокруг анионного центра АХЭ мух более обширна, чем у АХЭ эритроцитов. Вполне вероятно, что этими особенностями можно объяснить и чрезвычайно высокую чувствительность АХЭ мух к производным алкалоидов. По-видимому, расстояние между фосфором и азотом в три углеродных атома ( $=P(O)SCH_2CH_2CH_2N<$ ) в этих соединениях, а также наличие гетероцикла (особенно лупинина) делают соединения значительно более комплексными по отношению к активному центру АХЭ мух, чем к АХЭ других членистоногих и млекопитающих.

Резкое снижение антихолинэстеразной активности лупининовых ФОС по отношению к ферментам исследованных членистоногих, связанное с удлинением О-алкильных радикалов, зависит от различий в гидрофобном окружении эстеразного центра АХЭ разных классов животных. Возможно, у исследованных членистоногих гидрофобные области в районе эстеразного центра имеют меньший размер, чем у ферментов млекопитающих и сразу за ними расположены гидрофильные участки, препятствующие сорбции крупных углеводородных радикалов. Это может быть причиной снижения антихолинэстеразной эффективности.

В последнее время высокая инсектицидная активность обнаруже-

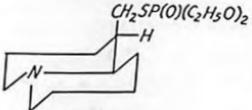
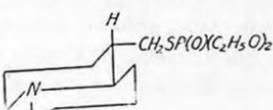
на у винилфосфатов строения:  $(RO)_2P(O)-O-C(=C)(CHBr)Cl$ . У соеди-

нений этого ряда отмечено четкое соответствие между антихолинэстеразной активностью по отношению к АХЭ мух и токсичностью для этих насекомых. Антихолинэстеразная активность и токсичность были наивысшими у метильных производных. При удлинении алкильных радикалов отмечено резкое снижение действия на АХЭ мух и энтомотоксичности [14]. Таким образом, характер изменения антихолинэстеразной активности в зависимости от строения фосфорильной

части молекулы этой группы ФОС полностью совпал с тем, который мы наблюдали на фосфатах—производных лупинина.

3. 3. Роль конформационной изомерии в избирательности действия на разные АХЭ была впервые выявлена при сопоставлении антихолинэстеразной активности производных лупинина и эпилупинина. Частично различия между этими группами отмечены в предыдущем разделе. Специальное сравнение (табл. 5) показало, что конформа-

Таблица 5  
Действие производных лупинина и эпилупинина на различные холинэстеразы ( $k_{11}$ ,  $M^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ )

АХЭ	 Производное лупинина I	 Производное эпилупинина II	I/II
Мозг мыши	$2,1 \cdot 10^4$	$2,4 \cdot 10^4$	0,9
Эритроциты человека	$2,2 \cdot 10^4$	$2,0 \cdot 10^4$	1,1
Злаковая тля	$1,5 \cdot 10^5$	$3,0 \cdot 10^3$	50
Голова мухи	$3,4 \cdot 10^8$	$1,1 \cdot 10^7$	33
Паутинный клещ	$3,7 \cdot 10^5$	$3,7 \cdot 10^4$	10

ция гетероцикла не играла никакой роли в действии на АХЭ млекопитающих (человека и мыши), тогда как АХЭ насекомых и клеща оказались значительно более чувствительны к лупининовому производному [12]. Надо заметить, что лупининовый конформер имеет более лабильную конформацию, чем эпилупининовый [15]. Это облегчает его взаимодействие с участком активной поверхности АХЭ в районе аннонного пункта в среде, оптимальной для проявления ферментативной активности (рН 7,5—8,0).

Однако, как отмечено выше, это свойство производных лупинина проявляется только в отношении фермента насекомых, но не млекопитающих, что, по-видимому, свидетельствует о конформационных различиях между ферментами обоих классов животных. Таким образом, конформационную изомерию ФОС можно рассматривать как один из факторов, определяющих избирательность их действия на АХЭ.

3. 4. Чувствительность к ФОС, содержащим ацетиленовую связь. ФОС, содержащие тройную (ацетиленовую) связь,—малонзученный класс соединений. Некоторые из таких веществ обладают высокой биологической активностью, поэтому исследование их антихолинэстеразной эффективности весьма интересно. С этой целью были синтезированы и изучены ряды новых ФОС различного строения, содержащие ацетиленовую связь в отщепляемой части молекулы [16—18]. Для сравнения в каждом случае определяли антихолинэстеразное действие насыщенного аналога.

Как оказалось, ацетиленовые ФОС ингибировали ХЭ сильнее (иногда на несколько порядков), чем их предельные аналоги. Это явление было названо «ацетиленовым эффектом» и для его количественной оценки использовали величину отношения бимолекулярной константы скорости торможения активности ХЭ ( $k_{11}$ ) ацетиленовым ФОС к  $k_{11}$  предельного аналога. Ацетиленовый эффект варьировал в очень широких пределах. Его величина зависела как от строения ФОС, так и от природы АХЭ. Анализ показал [18], что ацетиленовый эффект связан не со стадией фосфорилирования ХЭ, а с предшествующей стадией реакции ингибирования—образованием фермент-ингибиторного комплекса, в котором ацетиленовая группа, обладающая значительной электронной плотностью, взаимодействует с каким-то, вероятно, полярным, участком активной поверхности фермента, имеющим высокое сродство к ацетиленовой группе и расположенным в районе эстеразного центра фермента; его химическая природа пока не установлена.

Некоторые из полученных данных, касающихся, главным образом, действия ацетиленовых ФОС на разные АХЭ, представлены в табл. 6 и 7.

Табл. 6 содержит результаты исследования двух рядов ФОС, в которых ацетиленовая группа занимает разное положение в незамещенной углеводородной цепи. В первом ряду (соединения 1—3) общая длина цепи одинакова (6 углеродных атомов), а во втором ряду

Таблица 6  
Антихолинэстеразная активность ( $k_{11}$   $M^{-1} \text{ мин}^{-1}$ ) некоторых ацетиленовых ФОС строения  $(C_2H_5O)_2P(O)S-X$

X	Источник АХЭ				
	эритроциты человека	головной мозг мыши	голова мух	свеклозичная гля	паутинный клещ
$C \equiv CC_4H_9$	$9,5 \cdot 10^6$ (2500)	$7,1 \cdot 10^6$ (7100)	$1,5 \cdot 10^9$ (169000)	$4,6 \cdot 10^7$ (6,570)	$6,0 \cdot 10^7$ (8600)
$CH_2C \equiv CC_3H_7$	$1,4 \cdot 10^3$ (3,7)	$7,0 \cdot 10^3$ (7,0)	$3,0 \cdot 10^5$ (34)	$1,7 \cdot 10^4$ (2,4)	$4,0 \cdot 10^4$ (5,7)
$CH_2CH_2C \equiv CC_2H_5$	$4,0 \cdot 10^3$ (1,0)	$6,6 \cdot 10^3$ (6,6)	$1,1 \cdot 10^5$ (12,3)	$1,7 \cdot 10^4$ (2,4)	$3,0 \cdot 10^4$ (4,3)
$C \equiv CH$	$2,3 \cdot 10^7$ (32000)	$2,2 \cdot 10^7$ (220000)	$3,0 \cdot 10^8$ (2700000)	$1,4 \cdot 10^7$ (140000)	$4,8 \cdot 10^7$ (48000)
$CH_2C \equiv CH$	$2,2 \cdot 10^5$ (3000)	$7,0 \cdot 10^4$ (1400)	$1,2 \cdot 10^5$ (4000)	$1,5 \cdot 10^4$ (500)	$6,3 \cdot 10^4$ (300)
$CH_2CH_2C \equiv CH$	$4,0 \cdot 10^3$ (6,3)	$1,7 \cdot 10^3$ (5,9)	$1,1 \cdot 10^4$ (0,6)	$2,0 \cdot 10^3$ (0,7)	$2,6 \cdot 10^3$ (0,09)

Примечание. В скобках дана величина ацетиленового эффекта ( $k_{11}$  ацетиленового ФОС/ $k_{11}$  ненасыщенного аналога)

(соединения 4—6) по мере удаления ацетиленовой связи от атома серы растет и длина цепи. Ясно видно, что в обоих рядах перемещение ацетиленовой связи из  $\alpha$ - в  $\beta$ -положение тиоэфирного радикала (переход от вещества 1 к 2 и от 4 к 5) приводило к резкому снижению скорости ингибирования АХЭ различного происхождения, дости-

гавшему 2—3,5 порядков. В соответствии с этим уменьшалась и величина ацетиленового эффекта. Дальнейший переход тройной связи в  $\gamma$ -положение тиоэфирной группы в первом ряду соединений (вещество 3) не дало никакого дополнительного изменения. Во втором же ряду это (вещество 6) сопровождалось дальнейшим выраженным снижением ацетиленового эффекта, причем выявились существенные различия между ферментами млекопитающих и членистоногих. В случае АХЭ человека и мыши  $\gamma$ -производное проявляло небольшой, но четко выраженный ацетиленовый эффект, для АХЭ мухи и тлей полностью отсутствовал, а для фермента клеща отстал обратным: ацетиленовое производное ингибировало АХЭ клеща в 10 раз слабее, чем предельное.

Следовательно, положение ацетиленовой группы в молекуле ингибитора имеет значение не только для величины ацетиленового эффекта, но и для избирательности действия на различные ферменты. Особенно наглядно различия в избирательности видны из данных, приведенных в табл. 7. Все ФОС, использованные в этой серии опытов;

Таблица 7

Антихолинэстеразная активность ( $k_{II}$   $M^{-1} \text{ мин}^{-1}$ ) некоторых ацетиленовых ФОС

Строение ФОС	Источник АХЭ				
	эритроциты человека	мозг мыши	голова мух	свекловичная тля	паутинный клещ
$CH_3(C_6H_5O)P(O)SCH_2C \equiv$ $CCl_2Cl$	$3,1 \cdot 10^6$ (62)	$9,3 \cdot 10^6$ (140)	$1,0 \cdot 10^5$ (21000)	$6,6 \cdot 10^6$ (51)	$9,0 \cdot 10^5$ (4,5)
$C_6H_5(C_6H_5O)P(O)SCH_2C \equiv$ $CCl_2Cl$	$4,0 \cdot 10^5$ (50)	$4,7 \cdot 10^4$ (9)	$1,0 \cdot 10^5$ (31)	$9,0 \cdot 10^6$ (310)	$2,7 \cdot 10^4$ (11)
$C_6H_5(C_6H_5O)P(O)SCH_2C \equiv$ $CCl_2SO_2H_3$	$6,2 \cdot 10^5$ (31)	$4,6 \cdot 10^4$ (38)	$4,4 \cdot 10^5$ (44)	$5,6 \cdot 10^6$ (670)	$1,1 \cdot 10^5$ (85)
$(CH_3O)_2P(O)SCH_2C \equiv$ $CCl_2SC_2H_5$	$3,2 \cdot 10^5$ (270)	$3,3 \cdot 10^5$ (140)	$7,0 \cdot 10^6$ (580)	$2,9 \cdot 10^6$ (2000)	$3,8 \cdot 10^6$ (7600)

Примечание. В скобках дана величина ацетиленового эффекта ( $k_{II}$  ацетиленового ФОС/ $k_{II}$  насыщенного аналога)

имели ацетиленовую связь в  $\beta$ -положении, но от ранее описанных веществ они отличались строением фосфорильной части, а также тем, что при конечном углеродном атоме отщепляемой части содержался заместитель: хлор или этилмеркапто-группа. Из таблицы видно, что ацетиленовый эффект может быть избирательно выражен для отдельных ферментов: соединение 1—для АХЭ мух, соединения 2 и 3—для фермента тлей, соединение 4—для АХЭ обонх этих насекомых, особенно, для фермента паутинного клеща.

Таким образом, приведенные данные дают основание предполагать, что в расположении и (или) строении ацетиленсорбирующей группы на активной поверхности разных АХЭ имеются различия, и, следовательно, введение в молекулу ФОС ацетиленовой группы может придать соединению способность избирательно действовать на АХЭ отдельных видов.

3. 5. Особенности АХЭ тлей. Уникальной особенностью АХЭ тлей, отличающей ее от всех других исследованных АХЭ, является угнетение ее активности некоторыми тиоловыми реагентами, например, 5,5-дитио-бис-(1-нитробензоатом) (ДТНБ), широко используемом в методе определения активности ХЭ. Впервые это свойство было обнаружено Smissaert [19] для персиковой тли. В дальнейшем эта особенность АХЭ тлей была изучена отечественными авторами [10, 20]. Было показано, что чувствительность к SH-реагентам свойственна и АХЭ других видов тлей. Ингибирование АХЭ злаковой тли посредством ДТНБ развивается во времени, то есть идет образование ковалентной связи (необратимое торможение). Субстрат частично защищает АХЭ от ингибирования ДТНБ. Это свидетельствует о том, что SH-группа расположена вблизи активного центра фермента. АХЭ тлей отличается от фермента млекопитающих низкой термостабильностью и низкой величиной оптимального значения pH (pH 7,0). По-видимому, это зависит от более рыхлой третичной структуры молекулы АХЭ тлей [10, 19].

Анионный центр у АХЭ тли больше выражен, чем у АХЭ других исследованных насекомых (муха, американский таракан, саранча) и АХЭ млекопитающих, о чем свидетельствует большее отношение величины  $k_{II}$  катионсодержащих ФОС к  $k_{II}$  их бескатионных аналогов [1, 4, 10, 21]; для АХЭ злаковой и гороховой тлей это отношение равнялось 10000, тогда как для других ферментов—не превышало 1000 [21, 22].

### Заключение

Изложенные данные убедительно говорят о том, что каталитическая поверхность АХЭ разных животных наряду с выраженными чертами сходства имеет и существенные различия. Сходство состоит в том, что функциональные группы активного центра АХЭ, ответственные за взаимодействие с субстратом, одинаковы у разных фермент-

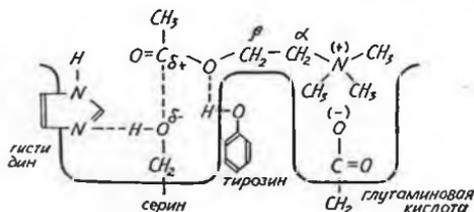


Рис. 2. Схема фермент-субстратного комплекса АХЭ [23].

тов, так же, как одинаков и собственно химический механизм гидролиза АХ. На рис. 2 представлена современная схема фермент-субстратного комплекса, образующегося на первой стадии процесса, катализируемого АХЭ [23]. Видны два четко отличимых каталитических участка: эстеразный и анионный. Главные функциональные группы первого—гидроксил серина, имидазольная группа гистидина и, ве-

роятно, гидроксил тирозина. Второй участок образован  $\omega$ -карбоксильной группой глутаминовой или аспарагиновой кислоты. На рисунке показано, с какими частями молекулы АХ взаимодействуют эти группы.

По этому принципу построена активная поверхность всех АХЭ. Однако между ферментами разных видов животных существуют и различия, которые нередко бывают весьма значительными и могут касаться расстояния между эстеразным и аннионным пунктами, гидрофобного окружения каждого из этих пунктов, общей конформационной подвижности всей активной поверхности и других свойств, определяемых высшими структурами белка. Эти различия являются причиной разной субстратной специфичности ХЭ и разной чувствительности их к ингибиторам, что используется для создания ингибиторов, избирательно действующих на АХЭ вредных насекомых и клещей.

Данные, приведенные в обзоре, показывают, что избирательная антихолинэстеразная активность может быть достигнута изменением структуры как фосфорильной, так и отщепляемой части молекулы ФОС. Особый интерес вызывает найденная в нашей лаборатории избирательность, связанная с конформационной изомерией гетероцикла и с введением ацетиленовой группы в отщепляемую часть молекулы ингибитора.

Необходимо отметить, что изучение избирательности действия ФОС на АХЭ различных животных имеет не только практическое значение для изыскания высокоизбирательных инсектоакарицидов, но представляет и большой теоретический интерес, так как позволяет глубже понять строение каталитической поверхности АХЭ и оценить видовые различия структуры этого фермента.

## SENSITIVITY OF THE MAMMALIAN AND INSECTS NERVOUS TISSUE CHOLINESTERASES TO INHIBITORS

ROZENGART V. I., SHERSTOBITOV O. E.

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

The review covers recent literature data and personal results, concerning substrate specificity of the mammalian, insects and mites nervous tissue cholinesterases and their sensitivity to some organophosphorus compounds. A considerable distinction between the enzymes of different origin is pointed out. Selective inhibition of insect cholinesterase may be achieved by structural change of either the phosphoryl or the leaving part of the inhibitor molecule. The selectivity connected with the conformation of heterocycle and with the introduction of acetylene group into the leaving part of the inhibitor molecule is of special interest.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Brestkin A. P., Brick I. L., Grigor'eva G. M.*—In: Intern. Encycl. Pharm. Therap. (Ed. M. J. Michelson) Sect. 85, v. 1, p. 241—344, Pergamon Press, Oxford, New York, 1973.
2. *Hollingworth R. M.*—In: Insecticide Biochem. and Physiol. (Ed. C. F. Wilkinson) p. 431—506, Plenum Press, New York, 1976.
3. *Розенгарт В. И., Шерстобитов О. Е.* Избирательная токсичность фосфорорганических инсектоакарицидов, с. 174, Л., Наука, 1978.
4. *Мандельштам Ю. Е.* Нейрон и мышца насекомого, с. 169, Л., Наука, 1983.
5. *Mueller A., Stark U.* Zool. J., v. 85, p. 435—456, 1982.
6. *Розенгарт В. И.*—В кн.: Успехи нейрохимии (Ред. Е. М. Крепс), с. 196—209, Л., Наука, 1974.
7. *Krupka R. M., Hellenbrand K.* Biochim. et biophys. acta, v. 370, p. 208—215 1974.
8. *Krupka R. M.* Biochim. et biophys. acta, v. 370, p. 197—207, 1974.
9. *O'Brien R. D. J.* Agric. Food Chem., v. 11, p. 163—166, 1963.
10. *Моралев С. Н.* Выделение и свойства холинэстераз злаковой тли в связи с проблемой избирательности действия инсектицидов. Автореф. канд. дисс., с. 20, Л., 1983.
11. *Hollingworth R. M., Fukuto T. R., Metcalf R. L. J.* Agric. Food Chem., v. 15, p. 235—241, 1967.
12. *Балашова Е. К., Кугушева Л. И., Розенгарт В. И., Васильева Т. И., Шерстобитов О. Е.,* Журн. эволюц. биохимии и физиологии, т. 16, № 3, с. 244—249, 1980.
13. *Кабачник М. И., Бресткин А. П., Годовиков Н. Н., Михельсон М. Я., Розенгарт В. И., Розенгарт Е. В., Михайлов С. С.,* Успехи химии, т. 39, № 6, с. 1050—1074, 1970.
14. *Fulde S., Krocinski J., Malinowski H.* Pest. Sci., v. 11, p. 20—22, 1980.
15. *Садыков А. С., Далимов Д. Н., Годовиков Н. И.* Успехи химии, т. 52, вып. 10, с. 1602—1623, 1983.
16. *Балашова Е. К., Бресткин А. П., Вихрева Л. А., Розенгарт В. И., Шерстобитов О. Е.* Журн. эволюц. биохимии и физиологии, т. 18, № 4, с. 325—329, 1982.
17. *Годовиков Н. Н., Вихрева Л. А., Бабашева К. К., Балашова Е. К., Шерстобитов О. Е., Кугушева Л. И., Розенгарт В. И., Бресткин А. П.* Изв. АН СССР, сер. хим., № 7, с. 1602—1605, 1983.
18. *Балашова Е. К., Бресткин А. П., Жуковский Ю. Г., Вихрева Л. А., Розенгарт В. И., Шерстобитов О. Е.* Докл. АН СССР, т. 272, № 2, с. 503—506, 1983.
19. *Smitssaert H. R.* Pest. Biochem. Physiol., v. 6, p. 215—222, 1976.
20. *Сазонова И. Н., Козлова Е. В., Майзель Е. Б., Новожилов К. В.* IV Всесоюзный биохимический съезд (тезисы научных сообщ.), т. 2, с. 167, 1979.
21. *Никанорова Е. В.*—В кн.: Бюл. ВИЗР (ред. К. В. Новожилов), № 49, с. 31—32, 1980.
22. *Моралев С. Н., Майзель Е. Б.* Докл. АН СССР, т. 259, № 1, с. 235—238, 1981.
23. *Main A. R.* Pharmacol. Therap., v. 6, p. 579—628, 1979.

Поступила 5. VI. 1984

## V СОБРАНИЕ ЕВРОПЕЙСКОГО ОБЩЕСТВА НЕЙРОХИМИКОВ (август 1984 г., Будапешт, Венгрия)

С 21 по 26 августа 1984 г. состоялось очередное V Европейское собрание по нейрохимии в Будапеште. В его работе принимала участие советская делегация в составе 14-ти человек под руководством академика *П. Г. Костюка*. Советскими нейрохимиками по приглашению Оргкомитета нейрохимического собрания были прочитаны пленарная лекция (*Костюк П. Г.*) и симпозиальный доклад (*Галоян А. А.*), а также представлены 3 стендовых сообщения (*Абутидзе К., Гаршивили Т.* «Стимуляция липидной пероксидации в синапсомембранах и связывание спондов»; *Оганесян В. С., Амбарцумян В. Г.* «Свойства мембраносвязанной формы фосфатазависимой глутаминазы в синапсомембранах и митохондриях головного мозга крысы» и *Азарян А. В., Кирике Х., Бархударян Н. А., Галоян А. А.* «Некоторые свойства катепсина В из головного мозга человека и быка»).

Собрание открыл председатель Оргкомитета, президент Академии наук ВНР *Ja. Szentagothai*, отметивший огромные достижения нейрохимии, способствующие развитию биологии и медицины. Он особо подчеркнул успехи молекулярной нейрохимии и патологической нейрохимии, изучающей генетические дефекты нервной системы.

Следует отметить, что состоявшийся форум был наиболее представительным собранием Европейских нейрохимических обществ. В его работе приняло участие около 700 ученых, в том числе крупные нейрохимики США, Японии и других стран.

С большой пленарной лекцией «Ионные каналы—новые проблемы» выступил академик *П. Г. Костюк*. В его докладе была рассмотрена роль фосфорилирования белков нейромембран в организации биопотенциалов нейронов. Используя предложенный им метод перфузии одиночных нейронов, автор показал значение циклических нуклеотидов, реакции трансфосфорилирования в возникновении биопотенциалов мембран. Был выдвинут ряд новых положений в развитии этого направления.

Значительное место в работе конгресса занимали следующие вопросы: 1. Механизм выделения нейромедиаторов. 2. Рецепторы нейротрансмиттеров. 3. Трансмиттеры и нейроэндокринная регуляция. 4. Иммуноцитохимия трансмиттеров. 5. Бензодиазепины и рецепторы ГАМК. 6. Нейрохимия холинергических нейронов. 7. Моноамины у беспозвоночных.

Ряд заседаний был посвящен ганглиозидам, метаболизму нейропептидов. Широко были представлены работы по нейрохимии Паркинсоновой болезни, старческого слабоумия и т. д.

В докладе *D. Cox* (Англия) были приведены данные о взаимоотношении энергетического состояния мозга и нейрональной функции, рассмотрены нейрохимические нарушения при гипогликемии и гипоксии. Установлено, что степень гипоксического состояния определяется увеличением содержания уровня, лактата, уровень же фосфокальцина при этом уменьшается. При глубокой гипоксии обнаруживается также изменение уровня адениннуклеотидов.

*R. Jork* и *H. Matthies* (ГДР) выступили с докладом о молекулярных аспектах формирования (processing) информации. Они исследовали макромолекулы (белки, гликопротеины, липиды), как важные компоненты структуры синаптических мембран,

и установили параллелизм между изменением поведенческих реакций при стимулировании электрическим током гипоталамуса и модификацией белков (включение меченого лейцина и фукозы). Одновременно было показано, что нейротрансмиттеры оказывают влияние на гликозилирование белков в гипокампе крыс. Изучено влияние допамина на включение в белки маннозы, галактозы и N-ацетил-глюкозамина.

Работа *H. Winkler* и соавт. (Австрия) была посвящена биосинтезу и созреванию растворимых белков хромаффинных гранул, в которых были идентифицированы дофамин- $\beta$ -гидроксилаза и гликопротеин III, являющийся минорным компонентом растворимого лизата в составе хромаффина А, В. В хромаффинных гранулах были идентифицированы Leu- и Met-энкефалины. Наличие этих минорных компонентов в хромаффинных гранулах можно объяснить эндогенным протеолизом.

*D. Annis* (Франция) привел данные о роли микротрубочек и микрофиламентов (цитоскелет) в процессах выделения катехоламинов. Он изучал взаимоотношения хромаффинных гранул с белками цитоскелета. В исследованиях, проведенных с культурой хромаффинных клеток, было показано, что мембраны хромаффинных гранул могут быть связаны с микротубулином и актином.

Значительный интерес представлял доклад *M. Relja* (Югославия). Она показала наличие дофаминергических рецепторов в генитоуринарной системе, а также наличие дофаминергических структур в почках, мочевом пузыре, матке, *vas deferens* и в крови.

*H. Zimmerman* и соавт. (ФРГ) показали, что холинергические и пораднергические синаптические везикулы, хромаффинные гранулы, а также гранулы тромбоцитов содержат АТФ наряду с нейротрансмиттерами и различными физиологически активными соединениями. Установлено, что АТФ вместе с АХ играет важную роль в нейротрансмиссии в холинергических синапсах.

*E. S. Vizi* (Венгрия) привел большой фактический материал о выделении пораднергалина  $Ca^{2+}$ -независимым механизмом и высказал предположение, что это выделение осуществляется из цитоплазмы нейрона. *M. Wollemann* (Венгрия) привела данные о молекулярных механизмах функционирования  $\beta$ -адренергических рецепторов. Как известно, *E. W. Sutherland* считал, что  $\beta$ -адренергический рецептор является субъединицей аденилатциклазы. В последующем, однако, оказалось, что  $\beta$ -адренорецептор составляет комплекс вместе с нуклеотидсвязывающим белком ( $N_s$  или G/F-фактор) и аденилатциклазой.

На симпозиуме «Метаболизм нейропептидов» (председатель проф. *A. Lajtha*, США) было представлено 6 докладов и 18 стендовых сообщений. Доклад *J. Schwartz* и соавт. (Франция) «Метаболическая инактивация энкефалинов» был посвящен изучению субстратной специфичности «энкефалиназы» на модельных субстратах и аналогах Met-энкефалина. Сравнивая субстратную специфичность «энкефалиназы» относительно амидированного и деамидированного Met-энкефалина с таковой ангиотензинпревращающего фермента и термолизина, авторы приходят к заключению, что «энкефалиназу» следует отнести к классу дипептидил-карбоксипептидаз, то есть экзопептидаз, а не эндопептидаз. Показано расщепление холецистокинина—8 «энкефалиназой» из стриатума крыс и наличие этого фермента в плазме крови и цереброспинальной жидкости. Доказано, что сочетанное введение бестати-на и тюрфаана на 50% повышает уровень Met-энкефалина в стриатуме крыс уже через 1 ч, что свидетельствует об участии как аминокпептидаз, так и металлзависимых эндопептидаз в метаболизме энкефалинов. В докладе *A. Kenny* и соавт. (Великобритания) «Структура, распределение и функции эндопептидазы—24.П» представлены данные, убедительно доказывающие, что эндопептидаза—24.П, ранее называемая «энкефалиназой», не дипептидил-карбоксипептидаза, а цинксодержащая, тиолзависимая эндопептидаза. Так, фермент гидролизует энкефалины с удлиненной по С-концу цепью: Leu-энкефалин-Arg<sup>6</sup>, Met-энкефалин-Arg<sup>6</sup>, Met-энкефалин-Arg<sup>6</sup>-Phe<sup>7</sup> не менее эффективно, чем Leu- и Met-энкефалин (судя по  $K_{cat}/K_m$ , и во всех случаях расщепляет связь Glu<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup>. Фермент из коркового слоя почек крыс расщепляет ряд эндогенных пептидов: лучшей группой субстратов оказались тахикинины, луч-

шим субстратом—деамидированное вещество P, расщепление которого происходит на два порядка эффективнее, чем деградация ЛГ (судя по  $K_{cat}/K_m$ ). Получение моноклональных антител к эндонептидазе—24.П из коры почек позволило авторам с помощью иммуоаффинной хроматографии выделить в индивидуальном виде этот фермент из разных органов, в том числе из ткани мозга, где он локализован преимущественно в стрiatуме и спинном мозгу. Фермент из разных органов отличается по степени гликозилирования. В докладе P. Burbach и соавт. (Нидерланды) «Протеолитическое расщепление нейропептидов до активных фрагментов» развивается концепция о том, что гормоны гипофиза являются предшественниками олигопептидов, обладающих поведенческими эффектами, но лишенных гормональной активности. Обобщены результаты исследований по процессингу синтаксическими мембранами головного мозга крыс олигопептидов—фрагментов аргинин-вазопрессина (AVP), аргинин-вазоцина (AVT), окситоцина (OXT),  $\beta$ -эндорфина, обладающих или более выраженной, или независимой от пептида-предшественника активностью. Авторы выявили участие мембраносвязанной аминокептидазы в генерации олигопептидов, обладающих поведенческим эффектом, из всех 3 нонapeптидов—AVP, AVT, OXT. Самый короткий из образующихся фрагментов—[pGlu<sup>4</sup>, Cyt<sup>6</sup>]-AVP, -AVT, -OXT, что авторы объясняют образованием пироглутамильного остатка, защищающего гексапептид от дальнейшей деградации аминокептидазой. Эти гексапептиды [pGlu<sup>4</sup>, Cyt<sup>6</sup>] (1—9) в 1000 раз более эффективно влияют на реакцию активного избегания, чем AVP (1—9). В отличие от AVP, AVT, OXT протеолиз  $\beta$ -эндорфина до  $\gamma$ -эндорфина ингибируется эндонептидазой, и только после образования  $\gamma$ -эндорфина под действием карбоксипептидазы образуется  $\alpha$ -эндорфин. С помощью синтетического пентапептида Ac-Val<sup>15</sup>-Thr-Leu-Phe-Lys<sup>19</sup>-NHCH<sub>3</sub>, имитирующего последовательность вокруг расщепляемой в  $\beta$ -эндорфине связи Leu<sup>17</sup>-Phe<sup>18</sup>, авторам удалось частично очистить « $\gamma$ -эндорфингенерирующую эндонептидазу» и охарактеризовать ее как тиазолзависимую растворимую металлопротеиназу с величиной  $M_r$  200 кД и рН-оптимумом 8,5. Активные олигопептиды образуются также из АКТГ (1—39),  $\alpha$ -MSH и des-acetyl- $\alpha$ -MSH. Авторы показали, что природа олигопептидов, образующихся из АКТГ (1—39) при инкубации с синтаксическими мембранами, зависит от рН среды. Тестирование в качестве предшественников активных олигопептидов АКТГ (1—16)-NH<sub>2</sub>, des-acetyl- $\alpha$ -MSH и  $\alpha$ -MSH показало, что их деградация осуществляется аминокептидазой, поэтому  $\alpha$ -MSH устойчив к расщеплению.

Доклад L. Graf (Венгрия) «Протеиназы и биосинтез, высвобождение и метаболизм нейропептидов» был посвящен обзору стратегических и методологических подходов, применяемых для изучения биосинтеза и метаболизма нейропептидов и критериев, которым должна удовлетворять протеиназа для зачисления ее в класс ферментов, осуществляющих процессинг. Приведены данные о выделении из секреторных гранул передней доли гипофиза свиньи сериновой  $\beta$ -липопротеинрасщепляющей протеиназы, активной при рН 8,5. Ингибирование этой протеиназы трипептидом Boc-D-Phe-Pro-Arg тормозит вызванное высвобождение АКТГ и  $\beta$ -эндорфина из культуры клеток передней доли гипофиза крысы, но не влияет на превращение  $\beta$ -липопротеина в  $\beta$ -эндорфин; в этой связи автор постулирует участие данной трипсиноподобной протеиназы в высвобождении гормона. L. Graf получил данные, ставящие под сомнение гипотезу Knight и Klee о том, что связывание Met-энкефалина рецептором способствует расщеплению пептида мембраносвязанной аминокептидазой: обнаружено, что скорость деградации Met-энкефалина, связанного с рецептором, значительно ниже, чем скорость деградации свободного Met-энкефалина и скорость его диссоциации от рецептора. Данные, приведенные в докладе A. Ronaj и соавт. (Венгрия) «Эффект каптоприла на пресинаптическое ингибирующее действие Met-энкефалина—Arg<sup>6</sup>-Phe<sup>7</sup> на изолированных органах», свидетельствуют о том, что ингибирующий эффект этого пентапептида на нервную передачу связан с трансформацией его в Met-энкефалин под влиянием ангиотензинпревращающего фермента. В докладе А. А. Галояна и соавт. (СССР) «О трех эндонептидазах головного мозга» представлены материалы по выделению и характеристике трех, активных

при кислых значениях рН, протениазах. С помощью биоаффинной хроматографии на пепстатин- и конканавалин А-сфарозе из гипоталамуса и коры больших полушарий головного мозга быка и человека получены в индивидуальном виде катепсин D, высокомолекулярная аспартильная протениаза с  $M_r$  90 кД и катепсин В; изучен спектр множественных форм этих ферментов, их физико-химические свойства: субстратная специфичность относительно белков и низкомолекулярных субстратов нафтиламидного и метилкумариламидного ряда, чувствительность к ингибиторам разных классов протениаз, в том числе пептидил-диазометанового ряда и E-64 и др. Получение высокоочищенных препаратов внутриклеточных протениаз из головного мозга представляет особый интерес для дальнейшего изучения их роли в метаболизме биологически активных пептидов и нейроспецифических белков.

По решению конгресса следующее VI Европейское собрание по нейрохимии состоится в г. Праге с 1—6 сентября 1986 года. Президентом Европейского нейрохимического общества избран проф. С. Тучек (Чехословакия).

ГАЛОЯН А. А.,

АЗАРЯН А. В.



## РЕЦЕНЗИИ

*ПРОМЫСЛОВ М. Ш. «Обмен веществ в мозге и его регуляция при черепно-мозговой травме», Изд-во «Медицина», 1984.*

В монографии проф. Промыслова М. Ш. впервые обобщен и объединен единой задачей накопленный им материал по биохимии мозга при черепно-мозговой травме. Автор стремится к выяснению ведущего звена в цепи нарушенных процессов обмена в мозгу при черепно-мозговой травме, роли функционального состояния ЦНС на течение этих процессов и возможных путей их направленной регуляции.

Рецензируемая книга является новой в литературе как по содержанию фактического материала по биохимии мозга при черепно-мозговой травме и его трактовке, так и по выводам, имеющим принципиальное значение для понимания механизма нарушенных процессов обмена в мозгу при этом заболевании и проблемы в целом.

Монография посвящена одной из актуальных проблем современной патохимии—нарушениям биохимических процессов мозга, лежащих в основе патогенеза черепно-мозговой травмы. В ней изложены результаты исследования сопряженности процессов дыхания и окислительного фосфорилирования, содержания макроэргических фосфорных соединений, активности  $\gamma$ -амилазы, MAO, обмена ряда специфических субстратов мозга—N-ацетил-1-аспаргиновой кислоты, цистатионина и гомокарбионина в ткани мозга при черепно-мозговой травме. Показано, что при этом заболевании степень нарушения энергетического обмена мозга играет ведущую роль в течении и исходе патологического процесса. Эти нарушения, как установлено с помощью электронной микроскопии, связаны с изменением структуры митохондрий. Рассматривается значение нарушенных биохимических процессов мозга в патогенезе черепно-мозговой травмы и их нормализация в терапии этого заболевания. Установлено влияние функционального состояния ЦНС травмированных животных на течение изученных процессов в мозгу. Показано, что нарушенный обмен веществ мозга при черепно-мозговой травме можно регулировать изменением функционального состояния ЦНС и восстановить его до нормального уровня, что сопровождается регенерацией митохондрий и восстановлением единства между метаболизмом, структурой и функцией мозга.

На основании приведенных результатов экспериментальных исследований и клинических наблюдений обсуждается вопрос о возможности направленного воздействия на обменные процессы мозга при черепно-мозговой травме и роли этого воздействия на течение патологического процесса в целом. В связи с этим настоящая монография имеет значение не только для теории вопроса, но и для практической медицины, поскольку она открывает пути вмешательства в течение патологического процесса.

Книга относится к числу научных трудов, которые ставят перед исследователем новые важные вопросы дальнейших исследований проблемы функциональной нейробиологии в норме и патологии нервной системы.

### ЗАМЕЧЕННЫЕ ОПЕЧАТКИ

Стр.	Строка	Напечатано	Следует читать
161	9 сверху	(16--18)	(16-17)
161	15 снизу	(1,18)	(1,17)
218	12 снизу	(p=0)	(P=0)
220	8 снизу	$\begin{array}{c} \text{---C---} \\    \\ \text{CHBr} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{---C---} \\    \\ \text{CHBr} \end{array}$
223	таблица, 3 сверху	$\begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_5(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})\text{P}(\text{O})\text{SCH}_2\equiv \\ \text{CCH}_2\text{Cl} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_5(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})\text{P}(\text{O})\text{SCH}_2\text{C}\equiv \\ \text{CCH}_2\text{Cl} \end{array}$
	5 сверху	$\begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_5(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})\text{P}(\text{O})\text{SCH}_2\equiv \\ \text{CCH}_2\text{SO}_2\text{H}_5 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_5(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})\text{P}(\text{O})\text{SCH}_2\text{C}\equiv \\ \text{CCH}_2\text{SO}_2\text{H}_5 \end{array}$

## ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

1. В журнале публикуются статьи, содержащие ранее не опубликованные результаты экспериментальных исследований по биохимии нервной системы, обзоры по важнейшим вопросам современной нейрохимии, рецензии на новые издания и актуальная научная хроника. Объем рукописи (включая резюме, список литературы и иллюстрации) не должен превышать 15 с., напечатанных на машинке через 2 интервала. Объем обзоров не более 20 с., кратких сообщений, рецензий и хроники 4 с., а писем в редакцию—2 с. Рукописи статьи должны 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 подразделы—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 расшивки. 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.

## СО Д Е Р Ж А Н И Е

<i>Генгин М. Т., Мелешко В. И., Рева А. Д.</i> Региональное, клеточное распределение, субклеточная и суборганонидная локализация аминокотрипептидазы нервной ткани кошек	117
<i>Остапенко И. А.</i> Свойства 5'-нуклеотидазы сетчатки при ее наследственной деградации у крыс	126
<i>Горошинская И. А., Федоренко Г. М., Ходакова А. А.</i> Исследование активности МАО и ультраструктуры головного мозга крыс при холодомом воздействии	134
<i>Айвазашвили И. М., Иорбанишвили Г. С., Николашвили М. И.</i> Влияние на память животных изменения функционального состояния моноаминергических систем мозга при действии дисульфирама и L-ДОФА	141
<i>Кравцова В. В., Кравцов А. В., Ярошенко Н. А., Арямова Ж. М.</i> Экстракция белков и фосфолипидов поверхностно-активными веществами из препаратов нейромембран	148
<i>Попова Г. М., Юркина Н. А., Промыслов М. Ш.</i> UDP-сахара в опухолях головного мозга человека	157
<i>Никитин В. П., Самойлов М. О., Шерстнев В. В., Майоров В. Н.</i> Динамика связывания $Ca^{2+}$ в идентифицированных нейронах виноградной улитки	163
<i>Ростомян М. А., Абрамян К. С.</i> Выявление диморфизма хромофинных клеток надпочечников гистохимической реакцией на аденилатциклазу	172

### Краткие сообщения

<i>Каранова М. В., Кузнецов В. И., Тонких А. К.</i> Выделение рецептора ГАМК из мозга крыс аффинной хроматографией с использованием феназепема	177
<i>Кузнецов В. И., Тонких А. К., Каранова М. В., Ким О. Н., Таканаев А. А., Садыков А. С.</i> Апамин-конкурентный ингибитор связывания $^3H$ -ГАМК с рецептором ГАМК	181
<i>Головина Т. Н., Маликов У. М., Рубинская Н. Л.</i> Белки и РНК в клетках супраоптического ядра и дорзального ядра шва головного мозга сусликов, непадавших в зимнюю спячку в октябре-марте	185
<i>Фураев В. В., Суворов С. А.</i> О локализации кальмодулина в обонятельной выстилке	190
<i>Замуруев О. Н.</i> Содержание фосфолипидов и малонилдиальдегида в коре больших полушарий при ишемии мозга крыс	193

### Обзоры

<i>Луценко В. К., Карганов М. Ю.</i> Биохимическая асимметрия мозга	197
<i>Розенгарт В. И., Шерстобитов О. Е.</i> Чувствительность холинэстераз нервной ткани млекопитающих и членистоногих к ингибиторам	214

### Хроника

<i>Галоян А. А., Азарян А. В.</i> V собрание европейского общества нейрохимиков (август, 1984 г., Будапешт, Венгрия)	227
--	-----

### Рецензии

<i>Панченко Л. Ф., Промыслов М. Ш.</i> Обмен веществ в мозге и его регуляция при черепно-мозговой травме	231
--	-----

## CONTENTS

<i>Gengin M. T., Meleshko V. I., Reva A. D.</i> Regional, cellular, subcellular and suborganoidal distribution of aminotripeptidase in cat nervous tissue . . .	117
<i>Ostapenko I. A.</i> Properties of 5'-nucleotidase in the normal and dystrophic rat retina . . . . .	126
<i>Goroshinskaya I. A., Fedorenko G. M., Khodakova A. A.</i> Rat brain monoamine oxidase activity and brain ultrastructures under exposure to cold . . . . .	134
<i>Aivazashvili I. M., Iordanishvili G. S., Nikolaishvili M. I.</i> Memory and functional activity of brain monoaminergic systems under the effect of disulphiram and L-DOPA . . . . .	141
<i>Kravtsova V. V., Kravtsov A. V., Yaroshenko N. A., Aryamova Zh. M.</i> Protein and phospholipid extraction from neuromembranes by surfactants . . . . .	148
<i>Popova G. M., Yurkina N. A., Promyslov M. Sh.</i> UDP-sugars in human brain tumours . . . . .	157
<i>Nikitin V. P., Samoilov M. O., Sherstnev V. V., Majorov V. N.</i> Dynamics of $Ca^{2+}$ binding in the neurons of garden snail . . . . .	163
<i>Rostomian M. A., Abramian K. S.</i> Histochemical reaction for adenylate cyclase reveals chromaffin cells dimorphism . . . . .	172
<b>Short communications</b>	
<i>Karanova M. V., Kuznetsov V. I., Tonkykh A. K.</i> Isolation of rat brain GABA receptor by affinity chromatography on Phenazepam-Sepharose . . . . .	177
<i>Kuznetsov V. I., Tonkykh A. K., Karanova M. V., Kim O. N., Takanaev A. A., Sadykhov A. S.</i> Apamin—a competitive inhibitor of $^3H$ -GABA-binding with receptor . . . . .	181
<i>Golovina T. N., Malikov U. M., Rubinskaya N. L.</i> Proteins and RNA in <i>nn. supra-opticus et raphe dorsalis</i> cells of ground squirrels not hibernating during October-March . . . . .	185
<i>Furaev V. V., Suvorov S. A.</i> Calmodulin localization in the olfactory epithelium	190
<i>Zamurujev O. N.</i> Brain cortical phospholipids and malonyldialdehyde during incomplete ischemia in rats . . . . .	193
<b>Reviews</b>	
<i>Lutsenko V. K., Karganov M. Yu.</i> Biochemical asymmetry of brain . . . . .	197
<i>Rozengart V. I., Sherstobitov O. E.</i> Sensitivity of the mammalian and insects nervous tissue cholinesterases to inhibitors . . . . .	214
<b>Chronicles</b>	
<i>Galoyan A. A., Azaryan A. V.</i> Vth Meeting of the European Society for Neurochemistry (Budapest, Hungary, 1984) . . . . .	227
<b>Comments</b>	
<i>Panchenko I. F., Promyslov M. Sh.</i> „Metabolism in brain and its regulation in cranial trauma“ . . . . .	231