

том 4. №3. 1985

ISSN 0203-493X

НЕЙРОХИМИЯ

ՆԵՅՐՈՔԻՄԻԱ



АКАДЕМИЯ НАУК СССР
ԱԿԱԴԵՄԻԱ ՆԱՒԿ ԱՐՄՅԱՆՏԻՔԻ ՍՏՐ

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

НЕЙРОХИМИЯ ՆԵՅՐՈՔԻՄԻԱ

ТОМ 4, ВЫП. 3
Июль—сентябрь

Журнал основан в 1982 году
Выходит 4 раза в год

ИЗДАТЕЛЬСТВО АН АРМЯНСКОЙ ССР
ЕРЕВАН 1985

Редакционная коллегия

А. А. ГАЛОЯН—главный редактор

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

Сдано в набор 24.06. 1985 г. Подписано к печати 10.09 1985 г. ВФ 03845
Бумага № 1, 70×108¹/₁₆. Высокая печать. Печ. лист. 7,13+2 вкл. Усл. печ. лист. 9,98.

Учет-изд. 8,39. Тираж. 665. Заказ 714. Издат. 6457.

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, хромоаффинных 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 OPA 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—I руб. 30 коп.



А. В. Палладин (1885—1972).

К 100-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ
АКАДЕМИКА А. В. ПАЛЛАДИНА

Академик А. В. Палладин—выдающийся советский биохимик, основатель Института биохимии Академии наук Украинской ССР, носящего теперь его имя, и первого в СССР периодического биохимического издания «Украинский биохимический журнал», создатель ряда новых научных направлений, в том числе функциональной нейрохимии, и одной из наиболее крупных в нашей стране научных школ—украинской биохимической школы, видный организатор и популяризатор науки, прекрасный педагог и воспитатель научных кадров, известный государственный и общественный деятель, активный участник борьбы за мир.

А. В. Палладин родился 10 сентября 1885 г. в Москве, в семье Владимира Ивановича Палладина—выдающегося физиолога и биохимика растений, профессора Харьковского, а затем Варшавского и Петербургского университетов, будущего академика Российской Академии наук, автора основополагающих исследований, на которых впоследствии сформировались современные представления о химизме дыхания растений. Роль Палладина-отца, ученого с мировым именем, оказалась определяющей для Александра Владимировича как при выборе его пути в науке, так и в дальнейшем, при формировании его научного мировоззрения.

В 1903 г., после окончания Ларинской гимназии в Петербурге, А. В. Палладин поступил на естественное отделение физико-математического факультета Петербургского университета, который закончил в 1909 г. Обладая склонностями к научному поиску, он в студенческие годы проявил незаурядные способности экспериментатора, а затем и ученого-новатора, способного определить новое научное направление, пути его становления, предсказать его будущее. Первые две научные работы, выполненные А. В. Палладиным-студентом под руководством выдающихся физиологов И. П. Павлова и Н. Е. Введенского, были посвящены физиологии нервной системы и получили высокую оценку научной общественности. Одна из них была удостоена в 1908 г. Золотой медали Петербургского университета. Получив хорошую теоретическую подготовку по физиологии животных, освоив методы поста-

новки физиологических экспериментов в лабораториях всемирно известных ученых, А. В. Палладин тем не менее избрал для своей будущей научной деятельности не физиологию животных, а одну из зарождавшихся в то время перспективных её отраслей—физиологическую химию, названную позже биологической химией. Становлению и развитию именно этой науки А. В. Палладин посвятил более 60 лет жизни. Однако, став биохимиком, Александр Владимирович никогда не порывал с физиологией. Все его работы и исследования его учеников были направлены на изучение биохимических основ физиологических функций организма животных и человека, на их основе впоследствии сформировалось перспективное научное направление—функциональная биохимия и её важнейшая составная часть—функциональная нейробиохимия.

В течение семи лет после окончания университета талантливый молодой исследователь А. В. Палладин, работавший несколько лет научным сотрудником в Бюро зоотехнии (1914—1916 гг.) в Петербурге, одновременно вёл педагогическую работу в Женском педагогическом институте (1909—1916 гг.) и на Высших женских сельскохозяйственных курсах (1914—1916 гг.). В течение 1909—1913 гг. он несколько раз был командирован в Германию для усовершенствования в области физиологической химии и физиологии в лабораториях Гейдельберга, Тюбингена и Гиссена. Результаты научных исследований, выполненных А. В. Палладиным в 1913—1916 гг. в Петербурге, были обобщены в его монографии «Исследования над образованием и выделением креатина у животных» (1916 г.), за которую в 1917 г. ему была присуждена ученая степень магистра физиологии и сравнительной анатомии. В этой оригинальной работе впервые были расшифрованы пути образования и превращений креатина в организме животных и показана его важная функциональная роль. Книга явилась крупным вкладом в науку, она на многие десятилетия определила пути развития исследований не только по биохимии креатина и креатинина, а в дальнейшем и биохимии креатинфосфорной кислоты, но и по биохимии мышечной деятельности, биохимии физической культуры и спорта.

Весьма плодотворным в жизни А. В. Палладина был пятнадцатилетний период работы в Харькове (1916—1931 гг.). В эти годы, наряду с многоплановой научной и научно-организаторской деятельностью, Александр Владимирович выполнял также большую педагогическую и общественную работу. В 1916 г. он был избран профессором кафедры физиологии Ново-Александровского института сельского хозяйства и лесоводства, находившегося в то время в Харькове, а в 1917—1921 гг. читал курс лекций по биохимии в Харьковском университете. В 1921 г. его избрали профессором и заведующим кафедрой физиологической химии Харьковского медицинского института, где он организовал, помимо учебной, также научно-исследовательскую кафедру биохимии, на которой развернул интенсивную работу по биохимии авитаминозов и изучению обмена веществ в нервной ткани и

мышцах, по подготовке научных кадров. На основе этой кафедры в 1925 г. по инициативе А. В. Палладина был создан Украинский биохимический институт Народного Комиссариата просвещения Украинской ССР (с 1931 г.—Институт биохимии Академии наук УССР, с 1972 г.—Институт биохимии им. А. В. Палладина Академии наук УССР). В 1926 г. Александру Владимировичу присуждают ученую степень доктора биологических наук и избирают членом-корреспондентом Академии наук УССР, председателем Харьковского медицинского общества—одного из старейших в нашей стране, а в 1930 г.—членом Президиума Академии наук Украинской ССР. В Харькове А. В. Палладин были основаны в 1926 г. первый в СССР биохимический журнал—«Наукові записки українського біохімічного інституту» (в настоящее время—«Украинский биохимический журнал»), бесшестименным ответственным редактором которого он был до 1972 г., а в 1928 г.—Украинское физиологическое общество. В 1929 г. А. В. Палладин был избран действительным членом Академии наук Украинской ССР. В Харькове, который был тогда столицей Украинской ССР, Александр Владимирович принимал деятельное участие в работе Народного Комиссариата здравоохранения и Главного управления по науке Народного Комиссариата просвещения республики, активно занимался популяризацией науки и педагогической работой.

Особенностью деятельности А. В. Палладина как ученого являлось плодотворное сочетание научно-исследовательской работы с педагогической. Последнюю он проводил в течение 45 лет, начиная с 1909 г., сначала в Петербурге, затем в Харькове и Киеве. На основе курса лекций по биохимии, читавшегося в Харьковском медицинском институте, Александр Владимирович написал первый советский учебник по биохимии, который вышел в свет в 1924 г., где, кроме традиционного в те годы описания в учебниках главным образом химического состава тканей и структуры тканевых компонентов (статическая биохимия), впервые было уделено большое внимание изложению закономерностей биохимических превращений веществ в организме (динамическая биохимия) и их функциональной роли. Уже в те годы в этом учебнике отчетливо просматривались пути развития биологической химии от статической через динамическую к функциональной. В течение трех десятилетий по нему познавали основы биохимии многие тысячи молодых специалистов в нашей стране и за рубежом. Учебник систематически совершенствовался и дополнялся автором и выдержал 25 изданий на девяти языках народов СССР и стран социализма.

А. В. Палладин по праву признан основателем одного из наиболее важных и перспективных биохимических направлений—функциональной биохимии и её составной части—функциональной нейрохимии. Конечной целью этого направления исследований, получившего плодотворное развитие в нашей стране и за рубежом, является познание молекулярных механизмов биохимических процессов, составляющих

основу физиологических функций организма, функций нервной системы в частности, а также поиск путей целевого воздействия на эти функции путем регуляции интенсивности или направленности процессов внутриклеточного обмена веществ.

А. В. Палладину принадлежит пальма первенства в разработке в СССР следующих актуальных проблем функциональной биохимии: биохимии нервной системы, биохимии мышечной деятельности, в том числе биохимии физической культуры и спорта, биохимии питания, включая биохимию витаминов и авитаминозных состояний.

Систематические исследования по биохимии креатина, выполненные А. В. Палладиным в Петербурге, в дальнейшем дополнились изучением биохимии креатинфосфорной кислоты и приобрели отчетливо выраженную функциональную направленность. Они способствовали формированию и плодотворному развитию нового направления функциональной биохимии—биохимии мышечной деятельности. Результаты разработки этого научного направления, в частности вопросов биохимии мышечного сокращения (процессов обмена веществ при обычной и интенсивной работе, утомлении, отдыхе и тренировке мышц), биохимии физической культуры и спорта, биохимии ряда мышечных патологий, включая патобиохимию сердечной мышцы, представляют большой интерес не только для познания молекулярных механизмов мышечного сокращения, но и для медицинской практики.

Проблема биохимии питания и примыкающие к ней проблемные вопросы биохимии витаминов, авитаминозных состояний и голодания интенсивно разрабатывались А. В. Палладиным и его сотрудниками главным образом в тяжелые годы разрухи, вызванной Первой мировой и гражданской войнами. Это были вопросы химического состава пищевых продуктов, определения их пищевой ценности, поиска дополнительных источников питания, исследования содержания витаминов в пищевых продуктах и их роли в профилактике и лечении гипо- и авитаминозных состояний организма, влияния различных пищевых продуктов на процессы обмена веществ и др. Перечисленные исследования, кроме их большой теоретической значимости для познания узловых вопросов питания человека и кормления сельскохозяйственных животных, преследовали также определенные практические цели в решении насущных проблем питания, профилактики и лечения патологий, возникающих вследствие недостатка или неполноценности пищевых продуктов (алиментарная дистрофия, гипо- и авитаминозные состояния и др.). Исследования А. В. Палладина в области витаминов и их роли в процессах внутриклеточного обмена веществ были отмечены в 1929 г. премией им. В. И. Ленина, которая присуждалась с 1926 по 1932 гг. за научные работы, имеющие наибольшее практическое значение (всего было тридцать лауреатов премии им. В. И. Ленина).

К разработке проблемы витаминов Александр Владимирович возвратился в годы Великой Отечественной войны. На этот раз его вни-

мание было сосредоточено на антигеморрагическом витамине К. В очень сжатые сроки в условиях военного времени Александр Владимирович организовал и выполнил синтез, промышленное производство и широкое внедрение в лечебную практику госпиталей и клиник сначала метил-нафтохинона, а затем и его водорастворимого аналога, названных им соответственно витамином К₃ и викасолом. Оба препарата, кроме кровоостанавливающего действия, способствуют заживлению ран и язв, лечению обморожений, ожогов, пролежней. Значение этих препаратов для спасения жизни раненых и сокращения сроков их выздоровления трудно переоценить. Викасол широко используется в клинической практике и в настоящее время.

Развитие в нашей стране исследований по биохимии нервной системы, начатых А. В. Палладиным в 1922 г., позволило в дальнейшем накопить огромный фактический материал и установить важные закономерности биохимической топографии нервной системы, её фило- и онтогенеза, выявить особенности обмена веществ при различных функциональных, экстремальных и патологических состояниях организма, а также при воздействии на организм различных факторов среды и фармакологических средств. Эти исследования, как правило, преследовали цель выявить связь между структурной организацией или метаболизмом исследуемого компонента и функцией органа или его определенной морфо-функциональной структуры. Такой подход к решению проблемных вопросов нейрохимии обеспечивал возможность широкого использования полученных результатов в клинической медицине. Многие из изучавшихся вопросов уже переросли в крупные проблемы современной медицинской биохимии.

Творческие усилия А. В. Палладина и его сотрудников в последние десятилетия жизни были сосредоточены преимущественно на разработке актуальных проблем функциональной нейрохимии: обмена белков, нуклеиновых кислот, углеводов, медиаторов и других биологически важных веществ при различных функциональных и патологических состояниях организма, а также познания молекулярных механизмов транспорта ионов через клеточные мембраны. Результаты таких исследований, выполнявшихся в разное время на органном, региональном, клеточном, субклеточном и молекулярном уровнях, являются большим вкладом в нейрохимию, в расшифровку биохимических основ функций нервной системы, в формирование подходов к расшифровке молекулярных механизмов таких специфических функций мозга как память и психическая деятельность человека. Многолетние исследования по белкам мозга обобщены в монографии А. В. Палладина, Я. В. Белика и Н. М. Поляковой «Белки головного мозга и их обмен» (1972 г.), которая переведена на английский язык («Protein metabolism of the brain», 1977).

В рамках перечисленных выше проблем функциональной биохимии, решению которых А. В. Палладин посвятил более 60 лет своей жизни, ряд разрабатывавшихся вопросов имел в перспективе большое

практическое значение. Среди них такие, как биохимия сна и психозов, свертывания крови и гипотермических состояний, роста и регенерации тканей, авитаминозов и голодания, в частности биохимия алиментарной дистрофии, биохимия кормления сельскохозяйственных животных и ацидозов.

А. В. Палладин—автор около 400 научных трудов (монографий, обзорных и экспериментальных статей, учебников и учебных пособий, научно-популярных книг и статей) и более 200 опубликованных речей и докладов разного содержания.

Александр Владимирович всегда уделял много внимания формированию у исследователей диалектико-материалистической методологии научного поиска и разработке новых, а также усовершенствованию существовавших методов исследования физико-химических основ физиологических функций организма. Он первым в нашей стране ещё в 20-е годы проводил ежегодно в Харькове своеобразные биохимические школы, носившие название биохимических практикумов, а также курсы повышения квалификации на рабочих местах в Украинском биохимическом институте. На этих практикумах и курсах, пользовавшихся большой популярностью, повышали свою биохимическую квалификацию сотни специалистов из десятков городов нашей страны (Астрахани, Баку, Воронежа, Еревана, Иркутска, Казани, Краснодара, Махачкалы, Москвы, Омска, Ростова-на-Дону, Тбилиси и др.).

Всесомый вклад в разработку актуальных проблем функциональной биохимии внесен и другими лабораториями Института биохимии АН УССР, которым он руководил в течение 45 лет. Многие завершённые в Институте исследования удостоены Государственных премий СССР и Украинской ССР, обобщены в десятках монографических работ и тематических сборниках научных трудов, изданных на русском, английском, польском, японском языках.

Созданная А. В. Палладиным украинская биохимическая школа одна из наиболее крупных в нашей стране научных школ. Много внимания он уделял развитию биохимии и воспитанию научных кадров в союзных республиках и странах социализма. Среди его учеников— академики и члены-корреспонденты Академии наук СССР, Академий наук союзных республик и ВАСХНИЛ, руководящие работники Академий наук, директора научно-исследовательских институтов и ректоры высших учебных заведений, руководители кафедр и биохимических лабораторий в десятках городов СССР, а также в Народной Республике Болгарии, Венгерской Народной Республике, Польской Народной Республике, Социалистической Республике Румынии и Чехословацкой Социалистической Республике.

А. В. Палладин в течение 45 лет был бессменным председателем Украинского биохимического общества, именовавшегося ранее физиологическим, а затем Обществом физиологов, биохимиков и фармакологов. С 1964 по 1969 гг. он был президентом, а с 1969 по 1972 гг.— почетным президентом Всесоюзного биохимического общества.

В течение 32 лет А. В. Палладин работал в Президиуме Академии наук Украинской ССР, будучи членом Президиума (1930—1934 гг.) и непременным секретарем Президиума (1934—1939 гг.), первым вице-президентом (1939—1946 гг.) и президентом (1946—1962 гг.) Академии наук Украинской ССР. Большая научно-организационная работа, выполнявшаяся в эти годы Александром Владимировичем, способствовала созданию ряда академических институтов по новым перспективным научным направлениям, подготовке высококвалифицированных научных кадров, мобилизации усилий многотысячного коллектива Академии наук УССР на решение наиболее актуальных научных проблем и на выполнение народнохозяйственных планов республики и всей страны.

Научная, научно-организационная и общественная деятельность А. В. Палладина была высоко оценена в нашей стране и за рубежом. Он неоднократно избирался депутатом городских советов народных депутатов Харькова и Киева, членом Всеукраинского Центрального Исполнительного Комитета (ВУЦИК), депутатом Верховных Советов СССР и Украинской ССР четырех созывов, делегатом XIX—XXII съездов КПСС и XVI—XXII съездов КП Украины, на которых избирался членом ЦК КП Украины, удостоен высокого звания Героя Социалистического Труда (1955 г.) и лауреата премии им. В. И. Ленина (1929 г.), награжден пятью орденами Ленина, орденом Октябрьской революции, двумя орденами Трудового Красного Знамени, орденом Красной Звезды и медалями. А. В. Палладин—академик АН СССР и АН УССР, действительный член АМН СССР и АН Белорусской ССР, заслуженный деятель науки УССР. Международным признанием заслуг А. В. Палладина в развитии биохимической науки является избрание его действительным членом Польской Академии наук, почетным академиком Болгарской, Венгерской и Румынской Академий наук, членом Международного нейробиологического общества, Химического общества Франции, редколлегии *"Journal of Neurochemistry"*, и *"The International Journal of Neuroscience"*, а также награждение его орденом «Кирилл и Мефодий» I степени за выдающиеся заслуги перед болгарской наукой и Золотой медалью «*Provincia di Milano*» за заслуги в развитии мировой нейробиологии.

А. В. Палладин—активный борец за мир, сотрудничество и дружбу между народами. В 1945 г., когда ещё продолжалась Вторая мировая война, Александр Владимирович, будучи членом делегации Украинской ССР на учредительной конференции ООН в Сан-Франциско, принимал активное участие в выработке устава этой международной организации. В послевоенный период он был членом советских делегаций на Всемирных конгрессах борцов за мир в Праге (1949 г.) и Варшаве (1950 г.), делегатом двух Всесоюзных конференций сторонников мира в Москве; главою советских делегаций с миссией дружбы и укрепления культурных связей с Австрией, Болгарией и Голлан-

дией. В 1959 г. А. В. Палладин был награжден серебряной медалью Всемирного Совета Мира за выдающийся вклад в дело укрепления мира и дружбы между народами. А. В. Палладин с 1926 г. и до последних дней своей жизни принимал активное участие в работе многих международных научных форумов: физиологических и биохимических конгрессов, нейрохимических съездов, конференций по мирному использованию атомной энергии и др. На всех этих международных встречах ученых, во всех международных органах Александр Владимирович выступал с докладами, всегда достойно представлял страну Советов, её миролюбивую внешнюю политику, её науку.

Вся многолетняя деятельность Александра Владимировича как ученого и организатора науки, педагога и общественного деятеля свидетельствует об удивительной его способности объединять массы людей в дееспособные коллективы и направлять их усилия на решение актуальных научных проблем или крупных практических задач. Советским нейрохимикам эта черта характера Александра Владимировича известна по тем Всесоюзным научным конференциям и координационным совещаниям, которые он как председатель Научного совета по проблемам биохимии нервной системы регулярно проводил в течение последних двадцати лет жизни в Киеве, Ереване, Тбилиси, Тарту, Ленинграде, и которые объединили всех нейрохимиков страны в дружный многонациональный творческий коллектив.

РЕДКОЛЛЕГИЯ



УДК 612.8.017.1

ИЗУЧЕНИЕ ЭНДОГЕННЫХ БЕЛКОВЫХ ЛИГАНДОВ
МОЗГОСПЕЦИФИЧЕСКИХ БЕЛКОВ ГРУППЫ S-100

ПОЛЕТАЕВ А. Б., ГРУДЕНЬ М. А.

Институт нормальной физиологии им. П. К. Анохина АМН СССР, Москва

Обнаружены и частично идентифицированы около 20 белков нервной ткани, способных специфически взаимодействовать с иммобилизованными препаратами фракции мозгоспецифических белков группы S-100. Взаимодействие имеет выраженный Ca^{2+} -зависимый характер. Среди белковых лигандов S-100 идентифицированы тубулин, Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза, щелочная фосфатаза, бутирилхолинэстераза, МАО, карбоксильная протенназа, кислая глюкоксидаза, β -галактозидаза. Среди лигандов S-100 найден ряд неидентифицированных гликопротеннов и ДНК-связывающих белков. Обнаружение и функциональная идентификация указанных лигандов позволяют по-новому оценить роль белков группы S-100 в регуляции метаболических процессов, характерных для нервной ткани.

В настоящее время большое внимание уделяют выделению и изучению мозгоспецифических белков (МСБ), непосредственно участвующих в молекулярном обеспечении основных нейрофизиологических механизмов [1—3]. Особое внимание исследователей привлекают МСБ группы S-100, имеющие отношение к механизмам обучения и памяти [4], общего эмоционального состояния [5], регуляции страха [6] и агрессивного поведения [7], связанные с патогенезом ряда нервно-психических заболеваний [8, 9]. В то же время конкретные молекулярные механизмы участия белков группы S-100 в регуляции функций мозга остаются неизученными.

Ранее предполагали, что одним из наиболее конструктивных подходов к пониманию их роли в механизмах специфических функций нервных клеток и мозга в целом является изучение тех конкретных молекулярных процессов и идентификация тех определенных видов молекул, во взаимодействии с которыми реализуется функциональная активность белков группы S-100 [10, 11]. В литературе имеются сообщения о модулирующем влиянии белка S-100 на активность РНК-полимеразы I [12] и фосфорилирование ряда белковых субстратов мозга [13]. Было установлено, что в физиологических условиях белки группы S-100 подвергаются Ca^{2+} -зависимому взаимодействию с достаточно широким кругом белков нервной ткани (среди них уда-

лось идентифицировать тубулины [10]), специфически сорбируют ряд неидентифицированных эндогенных олигопептидов, обладающих выраженной «поведенческой» активностью [6]. Эти данные углубили понимание функциональной значимости белков группы S-100 и подтвердили перспективность подобного функционального подхода к изучению их роли в обеспечении специфических функций нервных клеток.

Целью настоящего исследования являлась идентификация других (помимо тубулина) белковых лигандов белка S-100, присутствующих в экстрактах мозга.

Материалы и методы

Получение белков группы S-100 и их иммобилизация описаны ранее [14]. Для выделения белковых S-100-лигандов использовали 10 кг свежесзамороженного мозга бычков (гомогенизация в 0,01 М трис-HCl буфере pH 7,5; центрифугирование 60 мин при 18000g). Экстракты наносили на 100-мл колонку ДЕАЕ-сефарозы («Pharmacia», Швеция), уравновешенную тем же буфером. Белки, не сорбировавшиеся на ионообменнике, закисляли до pH 5,0 и наносили на 100-мл колонку КМ-сефарозы с тем же значением pH. После отмывки колонок от несвязавшегося материала кислые и щелочные белки элюировали с них 2 М NaCl, концентрировали ультрафильтрацией на фильтрах UM-10 («Amicon», США), диализовали против 0,1 М трис-HCl буфера pH 7,5 с 5 мМ CaCl₂ и использовали для выделения фракций кислых и щелочных гликопротеинов (специфически сорбирующихся на колонках конканавалтинА-сефарозы и элюирующихся 0,3 М α -метилгликозидом).

Полученные фракции кислых и щелочных белков и соответствующих гликопротеинов мозга пропускали через 50-мл преколонок с сефарозой 6 В, а затем через колонки S-100-сефарозы (10 мл геля, содержащего по 5 мг белка/мл). После отмывки колонок 0,5 М NaCl на 0,1 М трис-HCl буфере pH 7,5, специфически сорбированные белковые лиганды S-100 элюировали тем же буфером с 10 мМ ЭДТА-Na₂. Для предотвращения агрегации и протеолиза получаемых белков все использовавшиеся растворы содержали 0,01%-ный тритон X-100 и 0,5 мМ фенолметилсульфонилфторид. Все процедуры проводили при 2—4°.

Состав полученных лигандов S-100 анализировали электрофоретически в нативных условиях или в 0,1%-ном ДДС-Na и 8 М мочевины [15]. Гели после электрофореза окрашивали Кумасси G-250, алциановым синим или реактивом Шиффа [15, 16]. Величину M_r белков рассчитывали, используя калибровочную кривую, построенную по белковым стандартам («Pharmacia», Швеция).

Оценку содержания тубулина среди гликопротеинов, связывающихся с белком S-100, проводили путем вычисления разности в содержании суммарного белка фракции кислых гликопротеинов до и после пропускания 1 мг лигандов через 0,5-мл колонку иммобилизованных антитубулиновых антител (иммобилизация на CNBr-сефарозе), уравновешенную 0,01 М трис-HCl, pH 7,0. Тубулин получали по методу Подетаева и Мещеряковой [10]. Иммунизацию кроликов и выделение антитубулиновых антител из фракции γ -глобулинов проводили, как описано ранее [14].

Сродство к ДНК белковых лигандов S-100 определяли, используя ДНК-сефарозный сорбент [17] при элюции специфически связывающихся белков 2,0 М NaCl.

Качественное выявление АТРазной активности проводили после электрофоретического разделения лигандов S-100 в нативных условиях на нефиксированных гелях [18]. Идентификацию типа АТРазы, связывающейся с белком S-100, осуществляли, используя методы для выявления соответственно Na⁺, K⁺-АТРазы и H⁺-АТРазы [19, 20].

Протеолитическую активность определяли по методу Anson [21].

Активность щелочной и кислой фосфатаз оценивали по расщеплению п-нитро-фенилфосфата соответственно при pH 10,0 и 5,0 [22]. Определение ацетил- и бутирхолинэстеразной активности проводили по методу Kohnovsky и Roots [23], кислой α -глюкооксидазы—по методу Johnsson и соавт. [24]. Выявление активности β -галактозидазы проводили с использованием в качестве субстрата 4-метилумбеллиферил-L-D-галактопиранозид [25]. Активность MAO определяли по Glenner и соавт. [26], тирозингидроксилазную активность—по Nagatsa и соавт. [27], каталазную и пероксидазную активности—с использованием о-данилизидина, 3,3-диамино-бензидина и 5-аминосалициловой кислоты [28].

Результаты и обсуждение

Ранее было установлено, что все эндогенные белковые лиганды МСБ S-100 для связывания с последними требуют наличия в среде Ca^{2+} . Сформированные молекулярные ассоциаты распадаются в присутствии ЭДТА или ЭГТА, тогда как вклад ионных или гидрофобных взаимодействий незначителен [10, 11]. Эти данные явились основополагающими при выборе условий сорбции-десорбции на колонках S-100-сефарозы и получили дополнительное подтверждение в проведенных экспериментах. Представление о том, насколько разные по



Рис. 1. Белковые лиганды мозгоспецифических белков группы S-100.

своим характеристикам белковые молекулы способны связываться с иммобилизованными препаратами белка S-100, дает рис. 1. Отметим, что ни с самим матриксом, ни с другими иммобилизованными на сефарозе белками (белки сыворотки кролика) белковые лиганды белка S-100 подобных комплексов не формировали.

Какой же физический смысл имеет термин « Ca^{2+} -зависимое взаимодействие» применительно к разнообразным лигандам белка S-100? Известно, что в зависимости от концентрации Ca^{2+} в среде молекулы белка S-100 способны весьма значительно менять свою пространственную структуру; что проявляется, в частности, в изменении их спектрально-оптических характеристик [29]. По некоторым

данным, молекулы белков S-100 содержат до 8 центров связывания Ca^{2+} [29]. Можно предположить, что Ca^{2+} -зависимое взаимодействие белка S-100 с различными белковыми лигандами сводится к его способности иметь большое число Ca^{2+} -обусловливаемых стабильных конформационных состояний (конформеров), причем в разных из них белки S-100 оказываются стерически комплементарны акцепторным участкам молекул разных лигандов. Ионы кальция, по-видимому, выступают в роли своеобразного аллостерического регулятора, обуславливающего способность молекул S-100 специфически взаимодействовать с теми или иными лигандами (рис. 2). Кроме того, следует учитывать и данные о молекулярной гетерогенности белков группы S-100 [11], что расширяет круг белковых молекул в нервной ткани, с которыми они могут взаимодействовать.

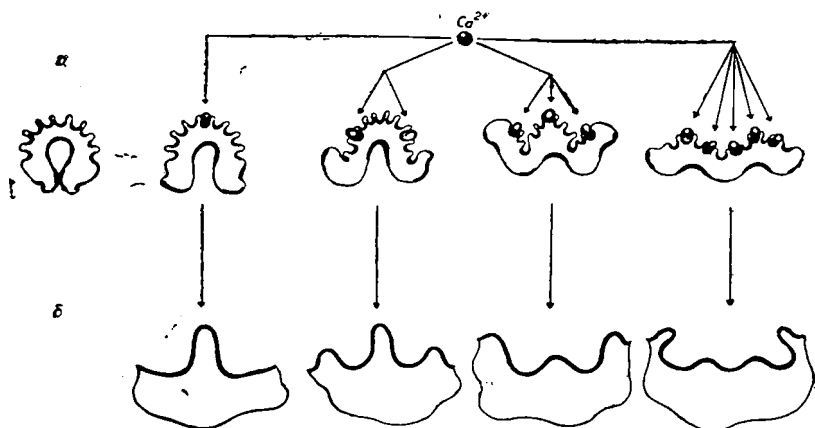


Рис. 2. Возможные механизмы, обуславливающие Ca^{2+} -зависимую комплементарность белка S-100 нервной ткани к его лигандам. а— Ca^{2+} -модифицируемые конформационные состояния белка S-100, б—акцепторные участки белковых лигандов мозгоспецифических белков группы S-100

С МСБ группы S-100 специфически связываются кислые белки с величиной M_r 300, 280, 260, 170, 100, 75, 50, 45, 30, 17 и 10 кД и щелочные, имеющие M_r 350, 300, 280, 220, 120, 70, 45 и 30 кД. Большая часть белковых лигандов белка S-100 представлена конканавалин-позитивными гликопротеинами мозга. Интересно отметить, что гликопротеины печени, выделенные по аналогичной схеме, практически не сорбируются на иммобилизованных препаратах белка S-100. Возможно, это свидетельствует об органичной (тканевой) специфичности гликопротеиновых лигандов белка S-100. Такое предположение согласуется с ранее полученными данными о присутствии в ткани мозга, но не печени, группы белков, способных к Ca^{2+} -зависимому взаимодействию с белком S-100 [11].

Данные электрофоретического анализа позволили выявить среди кислых гликопротеиновых лигандов белка S-100 3 главных и 4 минорных компонента с M_r 100, 75, 72 (тубулин) и 300, 170, 45, 30 кД соответственно. Среди щелочных гликопротеинов, связывающихся с белком S-100, было обнаружено 3 основных (120, 45 и 30 кД) и 2 минорных (280, 70 кД) компонента. Обработка выделенных гликопротеинов раствором 2-β-меркаптоэтанола не приводила к заметным изменениям их электрофоретического спектра, что свидетельствует о незначительном вкладе дисульфидных связей в образование четвертичной структуры изучаемых молекул.

Методом иммуносорбции с использованием иммобилизованных антитубулиновых антител было установлено, что около 20% суммарного белка кислых гликопротеиновых лигандов белка S-100 приходится на долю тубулина. В этой фракции были обнаружены также ферментативные активности, связанные с метаболизмом растворимых гликопротеинов, а именно β-галактозидазная и глюкооксидазная активности.

Идентификацию некоторых других компонентов фракции связывающихся с белком S-100 гликопротеинов проводили, исходя из следующих соображений: в предварительных экспериментах было установлено, что белки группы S-100 весьма существенно влияют на общий уровень окислительно-восстановительных процессов в клетках НС моллюсков (прижизненная спектрофотометрия—данные В. П. Никитина). С другой стороны, имеются сообщения о связи белка S-100 с механизмами трансмембранного переноса ряда ионов и аминокислот [4]. Это давало основание полагать, что среди молекул, взаимодействующих с белком S-100, могут присутствовать те или иные виды АТРаз. Оказалось, что среди медленно мигрирующих (электрофорез в нативных условиях; $R_f = 0,2$) компонентов кислых гликопротеинов была обнаружена фракция, обладающая АТРазной активностью. Детальный анализ позволил установить, что эта фракция может быть отнесена к группе Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаз. Таким образом, предполагаемая связь белков S-100 с регуляцией энергетического метаболизма и энергезависимым транспортом ионов в нервных клетках получила конкретное обоснование на молекулярном уровне. Щелочные гликопротеиновые лиганды белка S-100 не обладали АТРазной активностью, но среди них обнаруживалась значительная активность «щелочной фосфатазы», что позволяет думать о наличии среди них ферментов, связанных с фосфорным обменом.

Основанием для попыток идентификации еще одной группы молекул, взаимодействующих с белком S-100, послужили косвенные данные о существовании функционально-метаболических взаимодействий между белками группы S-100 и рядом известных [30] и неидентифицированных «поведенчески активных» олигопептидов [6], а также гипотетические предположения о прямом или опосредованном участии белка S-100 в механизмах биосинтеза ряда нейропептидов [31]. Это

позволило нам предпринять попытки выявления ферментов, обладающих протеолитической активностью среди лигандов белка S-100. Во фракции кислых гликопротеинов было показано наличие протеолитической активности с оптимумами pH в кислой и нейтральной областях (pH 1,8 и 7,0) и нечувствительной к действию ингибитора трипсино- и химотрипсиноподобных протеаз—фенилметилсульфонилфторида. Другие фракции лигандов белка S-100, как и сам белок S-100, протеолитической активности не проявляли. О специфичности связывания обнаруженной протеолитической активности с иммобилизованными белками группы S-100 свидетельствует отсутствие ее взаимодействия с иммобилизованными белками сыворотки крови кролика. Естественно, что предположение о связи кислой и нейтральной протеназ, ассоциирующихся с белком S-100, с биосинтезом тех или иных нейропептидов является предварительным и нуждается в специальных исследованиях.

Имеющиеся данные о влиянии белка S-100 на обмен ряда нейромедиаторов, в частности АХ, ГАМК, катехол- и индоламинов [32], явились основанием для поисков среди белковых лигандов белка S-100 ферментов обмена соответствующих нейромедиаторов. Среди гликопротеиновых лигандов была обнаружена бутирилхолинэстеразная активность (но не ацетилхолинэстеразная). Если учесть, что бутирилхолинэстераза является преимущественно главным ферментом, а также способность глии поглощать АХ, то можно допустить опосредованное влияние белка S-100 на катаболизм этого медиатора посредством регуляции активности бутирилхолинэстеразы. Имеющиеся в литературе данные об изменениях в обмене норадреналина и серотонина в мозгу животных, получавших инъекции белка S-100 [32], а также наши результаты о присутствии среди белковых лигандов S-100 белка, обладающего активностью МАО, также свидетельствуют о возможной связи белка S-100 с обменом многих нейромедиаторов.

Ранее была обнаружена способность белка S-100 влиять на активность генетического аппарата нервных клеток, в частности, за счет модуляции этими белками активности РНК-полимеразы I и уровня фосфорилированности ряда белков хроматина [12, 13]. Полученные данные о присутствии среди кислых белковых лигандов белка S-100 идентифицированных ДНК-связывающихся белков (элюируются с ДНК 2 М NaCl; составляют 10—15% от общего пула кислых лигандов белка S-100), являются дополнительной информацией для понимания природы связей белков S-100 с регуляцией активности генома нервных клеток.

Отметим, что при направленном поиске среди белковых лигандов МСБ группы S-100 активности каталазы, пероксидазы, Na^+ , K^+ -АТФазы, H^+ -АТФазы, «кислой фосфатазы», АХЭ, тирозингидроксилазы указанных ферментов обнаружено не было.

Природа части лигандов белков группы S-100 (особенно щелочных гликопротеинов) остается неустановленной и требует дальнейших исследований. Вероятно, для этого следует исходить из данных о

связи белков группы S-100 с регуляцией фосфорилирования ряда ядерных и цитоплазматических белков нервной ткани [13], которое, возможно, реализуется посредством Ca^{2+} -зависимого взаимодействия этих МСБ с определенными видами протениназ и фосфотенинфосфатаз. Отдельные данные позволяют предполагать связь белка S-100 с клеточноспецифической (глиальной) регуляцией транскрипции и трансляции [33]. В этой связи представляются оправданными работы по поиску и выделению белков-регуляторов соответствующих процессов, способных акцептировать молекулы белка S-100. Наконец, много неясного остается в молекулярных механизмах участия белка S-100 в регуляции синтеза и распада нейромедиаторов. Возможно, имеется значительно больше ферментов, способных взаимодействовать с белками группы S-100 и связанными с медиаторным обменом, чем это было выявлено в данной работе.

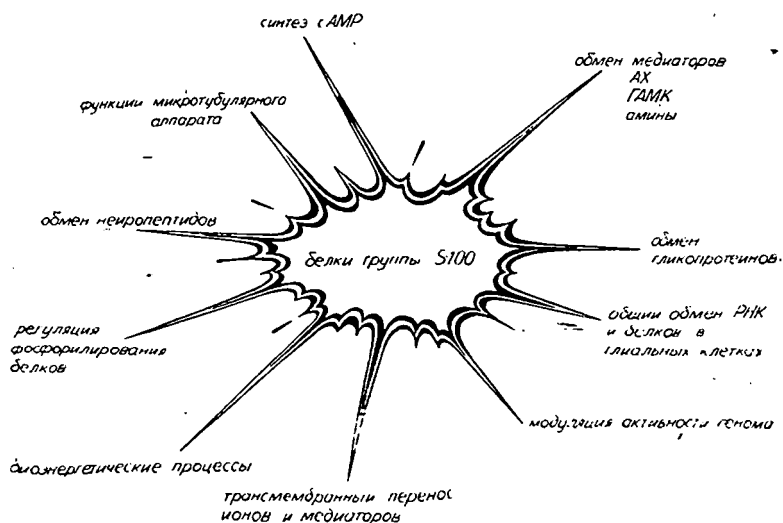


Рис. 3. Предполагаемые функционально-метаболические сферы влияния мозгоспецифических белков группы S-100

На основании литературных и собственных экспериментальных данных нам представляется возможным высказать ряд обобщенных и поддающихся экспериментальной проверке соображений, касающихся роли МСБ группы S-100 в регуляции метаболизма клеток нервной ткани. Вероятно, они, как и близкий к ним по физико-химическим свойствам другой Ca^{2+} -связывающий белок — кальмодулин (органо- и тканеспецифичный в отличие от белка S-100), являются своеобразными макромолекулярными модуляторами, способными прямо или косвенно влиять практически на все ведущие метаболические процессы в нейронах и глиальных клетках (рис. 3). Влияние белка S-100,

возможно, опосредуется по типу аллостерической регуляции активности многих мембранных, цитоплазматических и ядерных ферментов и других регуляторных белков. Способность белка S-100 взаимодействовать с акцепторными участками молекул весьма различных лигандов обусловлена его конформационным состоянием, которое, в свою очередь, зависит от локальной концентрации Ca^{2+} в том или ином компартменте клетки (рис. 2). Можно допустить, кроме того, что молекулы белков группы S-100 имеют несколько разных функциональных центров (подобно молекулам иммуноглобулинов), каждый из которых способен связываться с определенными лигандами. Молекулярная гетерогенность этих МСБ существенно увеличивает число возможных Ca^{2+} -обуславливаемых конформеров и расширяет их регуляторные возможности.

Интересной особенностью белков группы S-100 является их способность экспортироваться в небольших количествах из глии в нейроны [33], где они выполняют соответствующие регуляторные функции. Это дает основание рассматривать МСБ группы S-100 не только в качестве регуляторов множества внутриклеточных процессов, но и как своеобразные межклеточные макромолекулярные мессенджеры, обеспечивающие функциональное единство клеточных компонентов нейроно-глиальных комплексов.

Имеющиеся экспериментальные данные и гипотетические соображения, высказанные на их основе, имеют, по существу, качественный характер и нуждаются в большой работе по количественной детализации и уточнению, однако постановка соответствующих вопросов представляется весьма полезной для развития некоторых аспектов молекулярной нейробиологии.

ENDOGENOUS PROTEIN LIGANDS OF BRAIN-SPECIFIC PROTEIN OF S-100 GROUP

POLETAYEV A. B., GRUDEN M. A.

P. K. Anichin Institute of Normal Physiology, USSR Academy of Medical Sciences, Moscow

About 20 nervous tissue proteins specifically interacting with the immobilized preparation of S-100 protein major fraction have been detected and partially identified. The interaction is Ca^{2+} -dependent. Among ligands of S-100 tubulin, Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase, alkaline phosphatase, butyrylcholinesterase, MAO, carboxyl protease, acid glucose oxidase, β -galactosidase have been identified. Among non-identified ligands are some glycoproteins and DNA-coupling proteins. Data obtained point to the importance of S-100 proteins in the regulation of nervous tissue metabolism.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Bock E. J. Neurochem., v. 30, № 1, p. 7—14, 1978.
2. Долгов О. Н., Поletaев А. Б., Шерстнев В. В. Успехи физиол. наук, т. 11, № 3, с. 47—65, 1980.
3. Moore B. W.—In: Proteins of the nervous system, p. 1—13, N. Y., Raven Press, 1973.
4. Hyden H.—In: Biological Psychiatry Today, p. 177—188, Amsterdam, Elsevier, 1979.
5. Долгов О. Н.—В сб.: IX Всесоюзн. конф. по биохимии нервной системы, с. 277—278, Ереван, 1983.
6. Шерстнев В. В., Кочетков Н. В., Беляев С. В., Лысова Н. П., Долгов О. Н. Поletaев А. Б. Нейрохимия, т. 2, № 3, с. 319—322, 1983.
7. Рылов А. Л.—В сб.: IX Всесоюзн. конф. по биохимии нервной системы, с. 313, Ереван, 1983.
8. Jankovic B. D., Jakulic S., Horvat J. J. Biol. Psychiatry, v. 17, № 6, p. 687—698, 1982.
9. Поletaев А. Б., Селифанова О. П., Бова Н. Я. Иммунология, т. 4, № 2, с. 75—76, 1984.
10. Поletaев А. Б., Мецзякова О. Д. Биохимия, т. 47, № 11, с. 1835—1838, 1982.
11. Поletaев А. Б., Беляев С. В., Лысова Н. П. Биохимия, т. 47, № 8, с. 1349—1353, 1982.
12. Michetti F., Renzis G., Donato R., Miani N. Brain Res., v. 105, № 2, p. 372—375, 1976.
13. Тюленев В. И., Капранов А. А., Белик Я. В.—В сб.: IX Всесоюзн. конф. по биохимии нервной системы, с. 25—26, Ереван, 1983.
14. Беляев С. В., Куприяненко Т. И., Лысова Н. П., Поletaев А. Б. Биохимия, т. 46, № 12, с. 2193—2201, 1981.
15. Остерман Л. А. Исследование биологических макромолекул, М., Наука, 1982.
16. Гааль Э., Медвеши Г., Верекеи Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул, М., Мир, 1982.
17. Зеров Ю. П., Аверьянов А. В., Козлов К. А., Чеснокова Л. С. Биохимия, т. 48, № 2, с. 292—296, 1983.
18. Пирс Э. Гистохимия, М., Иностранная литература, 1962.
19. Nakao T., Nakao M., Fujita M. J. Biochem., v. 73, № 3, p. 609—616, 1973.
20. Sandt A., Woichech A., Ernster A.—In: Intervertebral reactions in electrons and iron transfer in mitochondrions, p. 197—202, Amsterdam, Elsevier, 1981.
21. Anson M. L. J. Gen. Physiol., v. 22, p. 79—81, 1932.
22. Beissey O. A. Biol. Chem., v. 164, № 1, p. 321—329, 1946.
23. Karnovsky M. J., Roots L. J. Histochem. Cytochem., v. 12, p. 219—221, 1964.
24. Johnsson R. B., Libby R. M., Nakamura R. M. J. Immunassay, v. 1, p. 27—37, 1980.
25. Knox W. E. Enzyme patterns in fetal, adult and neoplastic rat tissues. Basel, S. Karger Publs., 1972.
26. Glenner G. G., Burtner H. J., Brown G. W. J. Histochem. Cytochem., v. 5, p. 591—600, 1957.
27. Nagatsu T., Levitt M., Udenfriend S. Anal. Biochem., v. 2, p. 122—125, 1964.
28. Kaiss E. A., Mostratos A. J. Immunol. Meth., v. 58, p. 127—132, 1983.
29. Старостина М. В., Свиридов С. М. Молекуляр. биол., т. 12, № 2, с. 372—376, 1978.
30. Шерстнев В. В. Вестн. АМН СССР, № 2, с. 47—52, 1982.
31. Вартамян Г. А., Гальдинов Г. В., Репин В. С. Физиол. человека, т. 1, № 6, с. 1011—1020, 1975.
32. Маслова Н. В., Шевченко Н. В., Бабыкина Н. Д., Хоменко В. В., Шерстнев В. В., Поletaев А. Б., Долгов О. Н.—В сб.: IX Всесоюзн. конф. по биохимии нервной системы, с. 296—297, Ереван, 1983.
33. Поletaев А. Б., Мияки Н., Микетти Ф., Донато Р. Биохимия, т. 48, № 11, с. 1820—1824, 1983.

Поступила 28. V 84.



УДК 612.8.015.612.014.3

БЕЛКОВЫЙ СПЕКТР ОДИНОЧНОГО НЕЙРОНА В КОНТРОЛИРУЕМОМ ФУНКЦИОНАЛЬНОМ СОСТОЯНИИ

КОГАН А. Б., КАМИНСКИЙ И. И., ГУСАТИНСКИЙ В. И.

НИИ Нейрокибернетики Ростовского государственного университета им. М. А. Суслова

Методом микроэлектрофореза исследовали белковый спектр одиночного механорецепторного нейрона растяжения речного рака в состояниях адекватного возбуждения растяжением и торможения, вызываемого ГАМК. Показано, что число пиков на денситограмме белкового спектра заторможенного нейрона достоверно уменьшалось. Наиболее значительные изменения локализованы в области высокомолекулярных белков. Высказано предположение об относительной активации процессов «физиологического» протеолиза высокомолекулярных белков, сопровождающего длительно поддерживаемое состояние торможения в отличие от состояния возбуждения нейрона.

Проблеме взаимосвязи специфической функции нейрона с белковым метаболизмом в последние годы уделяли возрастающее внимание [1—4]. Её актуальность определялась не только теоретическим аспектом, но и практическим—возможностью управления функциональным состоянием клетки, в частности с помощью интермедиагов белкового метаболизма посредством регуляции уровней протеолиза и синтеза [5, 6]. Особое значение это направление работ приобрело в свете новых фактов о физиологической активности продуктов белкового протеолиза, способных влиять на процессы возбуждения и торможения нейронов [7—9]. Однако, несмотря на интенсивное изучение проблемы до настоящего времени остается невыясненным, каким образом изменяются протеолиз, синтез и транспорт внутринейрональных белков при различных функциональных состояниях нейрона и сопровождаются ли эти процессы сдвигами его белкового спектра.

Целью настоящей работы было микроэлектрофоретическое исследование белкового спектра медленноадаптирующегося механорецепторного нейрона растяжения речного рака (МНР) при его адекватном возбуждении дозированным растяжением или торможением ГАМК.

Из 2- или 3-х сегментов брюшка рака *Astacus lepodactylus* изолировали два симметричных МНР. Их приводили в состояние возбуждения, соответствующего частоте генерации импульсов 5 имп/сек, относимых присасывающимся микроэлектродом. В кювету, где находилась одна из клеток, с помощью проточной системы вводили ГАМК. Её конечная концентрация в экспериментальной камере составляла 0,25 мМ. Процесс торможения контролировали по величине мембранного потенциала внутриклеточно введенным микроэлектродом. Продолжительность аннигиляции ГАМК составляла 10 мин, после чего оба анализируемых нейрона выделяли на холоду, солиобилизовали в микрокапиллярах над ПЛАГ при 55° в течение 2 ч в растворе следующего состава: 20 мМ трис-сульфатный буфер pH 8,4, 1%-ный ДДС-Na, 1%-ный меркаптоэтанол, 10%-ная сахароза, бромфеноловый синий [10]. Верхний электродный буфер, содержащий 50 мМ трис-глицина, pH 8,4 и 0,1%-ный ДДС-Na, соединяли с катодом и полученную смесь белков в капиллярах диаметром 250 мкм подвергали электрофоретическому разделению при стабилизированном напряжении 50 В в течение 30 мин; гель окрашивали Кумасси CBBR-250 [11]. Оптическую плотность окраски полученного белкового спектра измеряли на сканирующем микроденситометре МЦФУ-2 и регистрировали самописцем «Эндим».

В работе были использованы технические приёмы, позволившие повысить воспроизводимость результатов и снизить потери исследуемого вещества: а) формирование градиента ПЛАГ осуществляли для всей серии капилляров одновременно в одних и тех же условиях [12] с последующим подбором пар гелей, совпадающих по длине; б) была исключена операция гомогенизации нейрона и связанные с ней весовые потери; в) после перенесения нейрона под мениск солиобилизующего раствора капилляр центрифугировали при $g=73$, что предотвращало прилипание нейрона к боковой стенке капилляра при последующих манипуляциях. Совокупность использованных способов позволила уменьшить критический размер нейронов, пригодных для анализа данным методом с 300–400 мкм [13] до 50–70 мкм.

Каждую пару денситограмм белковых спектров возбужденного и заторможенного нейронов подвергали количественной обработке по следующей схеме: а) подсчитывали общее количество пиков на денситограммах контрольного и подопытного нейронов и их разность; б) проводили сегментацию каждой денситограммы на участки, отличавшиеся резким, «возмущающим» изменением хода кривой [14]; в) подсчитывали число пиков в каждом сегменте денситограммы контроля и опыта и разности между ними; г) измеряли площади денситограмм и их отдельных сегментов, рассчитывали отношения площади каждого из сегментов к общей площади денситограммы, после чего определяли разности величин соответствующих отношений в денситограмме контрольного и подопытного нейронов. Достоверности различий проанализированных показателей рассчитывали с помощью непараметрического критерия Вилкоксона для сопряженных пар.

Результаты и обсуждение

Пара денситограмм белковых спектров заторможенного и возбужденного нейронов представлена на рисунке. Он иллюстрирует также границы 4-х сегментов денситограмм, количество пиков в каждом из них и разности между количеством пиков в опыте и в контроле. Результаты статистической обработки количества пиков во всех исследованных парах нейронов представлены в табл. 1. Из приведенных данных следует, что в денситограммах белковых спектров нейронов, находив-

шихся в состоянии торможения, число пиков достоверно уменьшалось по сравнению с контролем. Для выяснения локализации происшедших в белковом спектре изменений подсчитывали количество пиков в каждом сегменте денситограмм контроля и опыта. Результаты подсчёта и разности количества пиков в соответствующих сегментах показывают, что достоверное уменьшение числа пиков происходило в 3-м и 4-ом сег-

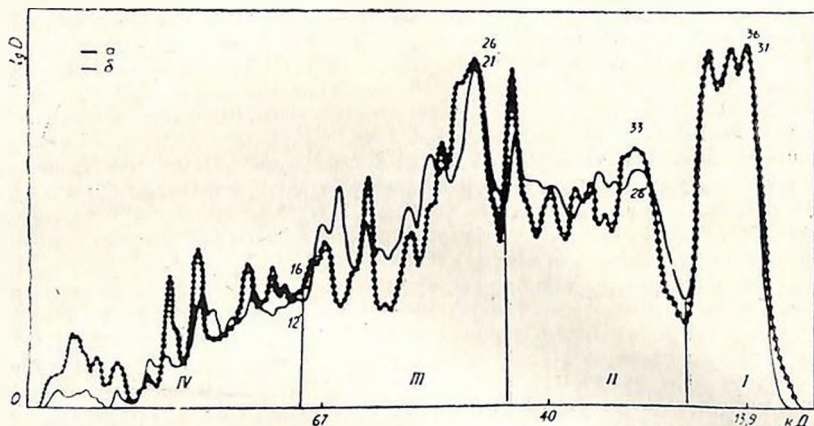


Рис. Денситограммы белковых спектров пары симметричных нейронов. а—контроль, частота импульсации 5 Гц; б—опыт, торможение импульсной активности ГАМК $2,5 \times 10^{-4}$ М в течение 10 мин. По оси абсцисс—величина M_r белков в кД; белки-маркеры: лизоцим куриного яйца—13,9 кД, пероксидаза хрена—40 кД, бычий сывороточный альбумин—67 кД; I, II, III, IV—номера сегментов денситограмм, цифрами на кривых указаны номера пиков. По оси ординат—lg от величины оптической плотности (lgD)

ментах денситограмм, где располагались субъединицы белковых молекул с величиной M_r свыше 40 и 65 кД соответственно.

Изменение числа пиков в указанных сегментах денситограмм сопровождалось изменением их площадей. Расчёт отношений площадей каждого из сегментов к площади всей денситограммы в контроле и опыте, сравнение разностей этих отношений во всех парах изученных нейронов не выявили значимых отклонений, но позволили установить, что минимальный разброс исследуемых величин имел место во 2-х сегментах денситограмм. Поэтому последующие сопоставления площадей отдельных сегментов в парах проводили сравнительно с площадью 2-го сегмента. Результаты расчёта отношений площадей 4-х сегментов к площади 2-го стабильного сегмента и последующая оценка разности между относительными площадями контрольных и опытных сегментов денситограмм в каждой паре представлены в табл. 2. Из этих данных следует, что площадь 4-го сегмента денситограммы белкового спектра нейронов в состоянии торможения достоверно умень-

шалась сравнительно с аналогичным сегментом в контроле. Кроме того, проявлялась тенденция к увеличению площади, занимаемой 3-м сегментом денситограммы в том же функциональном состоянии.

Таблица 1

Количество пиков денситограмм белковых спектров в парах симметричных нейронов

№ пары К — контроль О — опыт	Количество пи- ков денситограм- мы	Δ	Количество пиков в 1-м сегменте денситограммы	Δ	Количество пиков в 2-м сегменте денситограммы	Δ	Количество пиков в 3-м сегменте денситограммы	Δ	Количество пиков в 4-м сегменте денситограммы	Δ
1 К	23	1	3	0	2	-1	12	0	6	2
1 К	22		3		3		12		4	
2 К	27	4	3	0	3	0	12	3	9	1
2 К	23		3		3		9		8	
3 К	39	4	3	0	5	1	15	0	16	3
3 К	35		3		4		15		13	
4 К	37	5	3	0	7	1	9	3	18	1
4 К	32		3		6		6		17	
5 К	36	5	3	0	7	0	10	1	16	4
5 К	31		3		7		9		12	
6 К	32	2	3	0	4	-3	9	1	16	4
6 К	30		3		7		8		12	
7 К	33	2	3	0	4	-1	13	1	13	2
7 К	31		3		5		12		11	
8 К	46	13	6	2	11	4	15	5	14	2
8 К	33		4		7		10		12	
9 К	33	2	3	0	10	0	9	0	11	2
9 К	31		3		10		9		9	
10 К	32	1	3	0	6	-1	9	0	14	2
10 К	31		3		7		9		12	
11 К	23	2	3	0	9	1	6	-1	11	2
11 К	27		3		8		7		9	
12 К	32	-1	3	0	11	0	6	-2	12	1
12 К	33		3		11		8		11	
13 К	30	1	3	0	8	0	3	-1	16	2
13 К	29		3		8		4		14	
14 К	30	3	3	0	9	1	6	0	12	2
14 К	27		3		8		6		10	
15 К	35	1	3	-2	8	0	6	-2	18	5
15 К	34		5		8		8		13	
16 К	42	17	3	0	9	7	14	3	16	8
16 К	25		3		3		11		8	
17 К	35	3	3	0	8	0	18	2	11	1
17 К	32		3		8		11		10	
		p<0,01			p>0,05			p>0,05		
								p<0,05		
					</					

можении [15], есть основания предполагать, что и при торможении периферического нейрона имеет место сходный процесс, сопровождаемый избирательной активацией протеолиза высокомолекулярных белков. При этом уровень активности соответствующих эндопептидаз может регулироваться внутриклеточными концентрациями Ca^{2+} [16].

Таблица 2

Величины относительных площадей 4-х сегментов денситограмм в парах симметричных нейронов и их разности

№	Отношение площади 4-го сегмента к площади 2-го сегмента денситограммы белкового спектра		Разность
	контрольный нейрон	опытный нейрон	
1	0,557	0,429	0,13
2	0,638	0,612	0,05
3	0,297	0,301	0
4	0,394	0,349	0,05
5	1,118	1,071	0,05
6	0,187	0,248	-0,06
7	0,222	0,154	0,07
8	0,116	0,031	0,08
9	2,221	1,702	0,52
10	2,067	1,618	0,45
11	1,986	1,731	0,26
12	2,153	1,855	0,3
13	2,358	1,757	0,6
14	1,617	2,341	-0,73
15	2,97	1,874	0,2
16	1,905	1,833	0,07
17	1,232	1,318	-0,09

$p < 0,05$

Фрагменты высокомолекулярных белков, соответствующих 4-му сегменту денситограммы, если бы они образовались в достаточном количестве, должны были бы увеличить площади пиков остальных сегментов денситограмм. Однако такая тенденция отмечена только в 3-м сегменте, но при этом число пиков оказалось меньшим, чем в соответствующем сегменте контрольной денситограммы. Этот факт может свидетельствовать о том, что величины M_r появившихся белковых фрагментов соответствуют межпиковым минимумам денситограммы данного сегмента, при заполнении которых возрастала площадь под кривой и не происходило формирования новых пиков.

В результате протеолиза высокомолекулярных белков возможно также появление низкомолекулярных пептидов, не выявляемых в условиях нашего эксперимента. Поскольку уменьшение площади денситограммы 4-го сегмента больше, чем возрастание площади 3-го, а в 1- и 2-м достоверные изменения не были выявлены, такое предположение обосновательно. Не исключено, что некоторые из новообразованных пептидов могли бы участвовать в процессах торможения нейрона. В этом случае должны потенцироваться эффекты ГАМК и

пептидов, возникших в результате её действия, что увеличивает продолжительность торможения, формируя «следовую» реакцию.

Авторы выражают признательность проф. М. Б. Штарку и сотрудникам руководимой им лаборатории Института автоматики и электрометрии СО АН СССР (Новосибирск) за помощь в освоении методики микроэлектрофореза белков.

PROTEIN SPECTRE OF A SINGLE NEURON IN A FUNCTIONALLY CONTROLLED CONDITION

KOGAN A. B., KAMINSKY I. I., GUSATINSKY V. N.

Research Institute of Neurocybernetics, Rostov State University

Protein spectrum of a single neuron either excited or inhibited by GABA has been investigated by microelectrophoresis technique. The number of peaks in the densitogram of protein spectrum of an inhibited neuron decreased reliably. Most significant changes in the densitogram were detected in the region of high M_r proteins. It was suggested that relative activation of processes of "physiological" proteolysis of high M_r proteins accompanies prolonged inhibition rather than excitation of a neuron.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ашмарин Н. П. Загадки и откровения биохимии памяти. Л., Изд-во ЛГУ, 1975.
2. Штарк М. Б. Иммунонейрофизиология, Л., Медицина, 1978.
3. Алексидзе Н. Г.—В сб.: Биохимия животных и человека, т. 4, с. 4—11, Киев, Наукова думка, 1980.
4. Ерошкин М. Ю. Успехи соврем. биол., т. 95, № 1, с. 65—83, 1983.
5. Паладин А. В., Белик Я. В., Полякова Н. М. Белки головного мозга и их обмен, Киев, Наукова думка, 1972.
6. Goldberg A. L., John A. C. *St. Annu Rev. Biochem.*, v. 45, p. 747—803, 1976.
7. *Proteases and Biological Control* (eds. Reich E., Rifkin D. B., Shaw K). Cold-Spring Harbor Laboratory, 1975.
8. Ашмарин Н. П., Ерошкин М. Ю., Ковалева Т. А., Рожанец В. В. Молекуляр. биология, т. 12, с. 963—973, 1978.
9. Acher R. Evolution of neuropeptides.—*Trends in Neurosci.*, v. 4, p. 225—229, 1981.
10. Osborne N. N., Rùchel P. J. *Chromatogr.*, v. 105, p. 197—200, 1975.
11. Vesterberg O. *Biochim. et Biophys. acta* v. 243, p. 345—348, 1971.
12. Dames W., Maurer H. R.—In: *Electrophoresis and isoelectric focusing in polyamide gel*. (eds. Allen R. C., Maurer H. R., W de Gryter, Berlin), p. 221—231, N. Y. 1974.
13. Froulati N., Gainer H.—In: *Peptides Neurophysiol.*, p. 259—294, N. Y.—London, 1977.
14. Браверман Э. М., Мучник Н. Б. Структурные методы обработки эмпирических данных, М., Наука, 1983.
15. Гусатинский В. Н., Кондратьева Л. А.—В сб.: Проблемы нейрокибернетики, с. 261, Изд-во Ростовского госуниверситета, 1983.
16. Рева А. Д., Березин В. А., Генгин М. Т.—В сб.: Биохимия животных и человека, т. 4, с. 57—63, Киев, Наукова думка, 1980.

Поступила 7. I 1985



УДК 612.815.1:577.354

ВОЛНООБРАЗНЫЙ ХАРАКТЕР КРИВЫХ СВЯЗЫВАНИЯ ^3H -ГАМК И ^3H -МУСЦИМОЛА С МЕМБРАНАМИ ИЗ МОЗГА КРЫС И МЫШЦ САРАНЧИ

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

Институт биофизики АН СССР, Пушкино-на-Оке

Кривые связывания ^3H -ГАМК и ^3H -мусцимола с препаратами мембран из мозга крыс и мышц саранчи, построенные с использованием достаточно большого диапазона концентраций лигандов, имеют волнообразный вид. Максимумы повторяются при изменении концентраций меченого лиганда примерно в 1,4 раза. Обсуждаются возможные причины волнообразной формы кривых связывания.

ГАМК — главный тормозной медиатор ЦНС позвоночных, животных [1], а также нервно-мышечной передачи членистоногих [2]. Имеется много работ по связыванию меченой ГАМК или ее меченого аналога — мусцимола с препаратами мембран, содержащих ГАМК-рецепторы [3], однако данные о количестве связывающих участков и их константах весьма разнообразны — сообщалось об одном [4, 5], двух [6, 7] или трех [8, 9] типах связывающих участков. На графиках, приведенных в статьях, обращает на себя внимание небольшое количество точек, по которым авторы строят кривые связывания, а также в некоторых случаях несколько произвольная экстраполяция точек под теоретические кривые, характерные для определенного типа связывания.

Целью данной работы было уточнение кривых связывания ^3H -ГАМК и ^3H -мусцимола с препаратами мембран, содержащих ГАМК-рецепторы.

Материалы и методы

Фракция грубых мембран (P_2) была получена гомогенизированием целого мозга крыс в 10 объемах холодной 0,32 М сахарозы. Гомогенат центрифугировали при 1000g 10 мин, затем супернатант — при 17000g 30 мин. Осадок подвергали замораживанию-оттаиванию и трижды стывали суспендированием в 20 объемах 50 мМ трис HCl буфера (pH 7,4) и центрифугированием при 17000g 30 мин. Отмывание мембран 0,05%-ным тритоном X-100, их солюбилизацию ДОХ-Na и осаждение солюбилизата сульфатом аммония проводили, как описано Asano, Ogasawara [10].

Фракции грубых, а также отмытых тритоном X-100 и солюбилизованных мембран могли сохраняться в жидком азоте 2—3 месяца.

Ножки саранчи размельчали в размельчителе тканей с 10-ью объемами 0,25 М сахарозы и процеживали через три слоя марли. Далее фракцию отмытых грубых мембран получали аналогично описанному выше способу для мембран мозга крыс.

Эксперименты по связыванию проводили, используя два метода: фильтрование на нитроцеллюлозных фильтрах «Супрог» (ЧССР) и центрифугирование.

В микропробирки объемом 200 мкл вносили 10 мкл различных концентраций 3H-ГАМК или 3H-мусцимола так, чтобы в конечном объеме 100 мкл содержались требуемые концентрации меченого лиганда; для определения уровня неспецифического связывания добавляли 10 мкм немеченых ГАМК или мусцимола в концентрации 10 или 1 мМ соответственно. Затем вносили 80 мкл суспензии грубых мембран в 50 мМ трис HCl буфера (pH 7,4) или раствора солюбилизованных мембран в этом же буфере с концентрацией белка 1 мг/мл. Смесь перемешивали и инкубировали в течение 30—60 мин. Установили, что в этих интервалах времени связывание существенно не меняется. После инкубирования 90 мкл смеси наносили на предварительно вымоченный в дистиллированной воде фильтр диаметром 24 мм и размером пор 0,4—0,8 мкм, помещенный на фильтровальную воронку. Смесь наносили так, чтобы она покрывала всю поверхность фильтра. Затем включали вакуум, смесь отсасывали, и фильтр промывали 3 мл холодной воды. Фильтры, которые помещали на воронку матевой стороной вверх, подбирали так, чтобы 3 мл воды, просасывались примерно за секунду. Все процедуры проводили при 0—4°. При таком способе фильтрования на фильтре остается около 80% белка грубых и около 50% белка солюбилизованных мембран. Высушенные фильтры помещали во флаконы с 3 мл стандартного толуольного сцинтиллятора и измеряли радиоактивность на счетчике «Intertechnique» (Франция).

Для центрифугирования использовали пробирки объемом 1,5 мл, в которые вносили 0,5 мл инкубационной смеси, содержащей 500 мкг белка. После 30 мин инкубирования проводили центрифугирование при 17000g в течение 30 мин. Осадок дважды промывали 1 мл холодного буфера. Пробирки заливали диоксановым сцинтиллятором и в них измеряли радиоактивность. В отдельных случаях осадки в пробирках солюбилизовали в 0,4 мл 10%-ного тритона X-100, переносили в счетные флаконы, добавляли 1 мл абсолютного этанола и 10 мл толуольного сцинтиллятора; что приводило к повышению радиоактивности в 1,3 раза. Это учитывали при измерении радиоактивности в диоксановом сцинтилляторе. Осаждение солюбилизованных мембран проводили, используя полиэтиленгликоль.

Белок определяли по методу Lowry и соавт. [11] Использовали 3H-мусцимол (15 Ки/ммоль, "Amersham", Англия), 3H-ГАМК (26 Ки/ммоль, "Изотоп"), мусцимол ("Serva", ФРГ), ГАМК ("Reanal", Венгрия), остальные реактивы марки "ос. ч".

Результаты и обсуждение

При построении кривых связывания 3H-мусцимола с грубыми мембранами мозга крыс с интервалом концентраций меченого лиганда, равной 1/10 порядка, оказалось, что на этих кривых имеются участки, в которых, несмотря на более высокую концентрацию меченого мусцимола в среде инкубации, количество связавшегося 3H-мусцимола меньше (рис. 1). Вклад в такие минимумы специфического связывания вносят как кривые общего связывания, так и связывания неспецифического, выявляемого в присутствии 0,1 мМ немеченого мусцимола. Для обеспечения достоверности существования минимумов в связывании для некоторых кривых точки взяты как среднее из 30 отдельных измерений.

Характерная кривая получается, если исследовать связывание другим методом, а именно, в присутствии одной концентрации меченого мусцимола и различных концентраций немеченого лиганда (рис. 2). Кривые, подобные приведенным на рис. 2, ранее получены нами и для связывания ^3H -ГАМК с фракцией грубых мембран мозга крыс [12]. На рис. 3 представлена кривая связывания ^3H -ГАМК с фракцией грубых мембран из мышц саранчи.

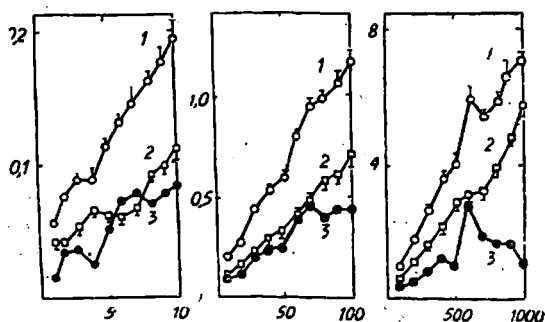


Рис. 1. Связывание ^3H -мусцимола с фракцией (P_2) грубых мембран мозга крыс: 1—общее связывание; 2—связывание в присутствии немеченого мусцимола в концентрации 0,1 мМ; 3—вычитенное специфическое связывание. По оси абсцисс—концентрация ^3H -мусцимола (нМ), по оси ординат—связанный ^3H -мусцимол (пмоль/мг белка). Каждая точка, как и на рис. 2—6, представляет среднее из 3—6 измерений с обозначенными стандартными отклонениями. Если стандартные отклонения не указаны, они находятся в пределах значков

Форма кривых не зависит от метода разделения связавшегося лиганда от свободного в инкубационной смеси, то есть фильтрования или центрифугирования.

С целью уточнения форм кривых мы получили кривые связывания ^3H -мусцимола с фракцией грубых мембран мозга крыс, используя интервалы между концентрациями меченого мусцимола, равные 1/100 порядка концентраций (рис. 4). На этих кривых выявляются чередующиеся максимумы и минимумы. При шкале концентраций ^3H -мусцимола, выраженной в логарифмах, видно, что положения максимумов повторяются через равные интервалы, а именно, для кривой общего связывания при изменении концентраций меченого мусцимола в среднем в 1,43 раза, а для связывания в присутствии 0,1 мМ немеченого мусцимола в 1,37 раза (эти цифры получены делением расстояния между двумя крайними максимумами на логарифмической шкале концентраций ^3H -мусцимола от 10 до 1000 нМ, на количество промежутков между максимумами). Аналогичные кривые с разрешением в 1/100 получены нами для концентраций ^3H -мусцимола от 10 нМ до 100 нМ (рисунок не приводится), а форма кривых на рис. 1 и 2 по-

звояет предполагать, что подобная волнообразность кривых будет распространяться, по крайней мере, на концентрации ^3H -мусцимола от 1 нМ до 10 мкМ и даже выше, если учесть, что максимумы выявляются даже в присутствии 100 мкМ немеченого мусцимола.

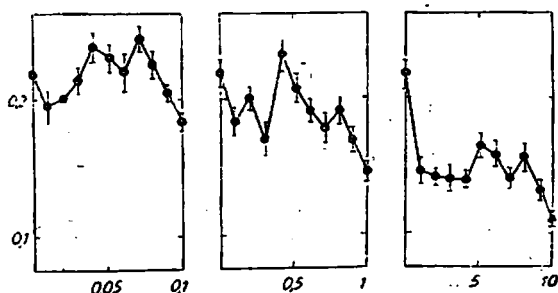


Рис. 2. Связывание ^3H -мусцимола в концентрации 10 нМ с фракцией (P_2) мозга крыс в присутствии различных концентраций немеченого мусцимола. По оси абсцисс—концентрация Н-мусцимола (мкМ), по оси ординат—связанный ^3H -мусцимол (пмоль/мг белка)

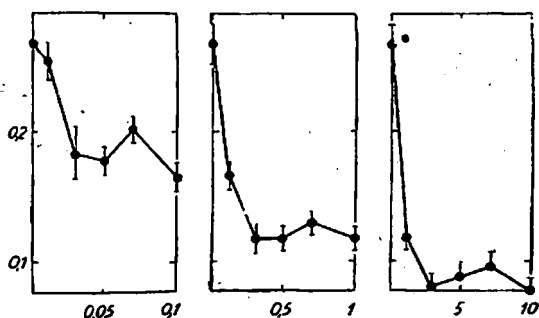


Рис. 3. Связывание ^3H -ГАМК в концентрации 10 нМ с фракцией (P_2) грубых мембран из мышц саранчи в присутствии различных концентраций ГАМК немеченой. По оси абсцисс—концентрация ГАМК (мкМ), по оси ординат—связанная ^3H -ГАМК (пмоль/мг белка)

Кривые связывания ^3H -мусцимола на рис. 2 и связывания ^3H -ГАМК на рис. 3 весьма похожи. Для уточнения формы кривых связывания ^3H -ГАМК получали кривые, используя разницу в концентрациях меченой ГАМК, равную 1/100 порядка. На рис. 5 приведен участок кривой связывания ^3H -ГАМК с мембранами мышц саранчи. На участке от 0,1 до 1,0 мкМ она напоминает кривую, изображенную на рис. 1. Далее начинает выявляться волнообразность, характерная для кривой, изображенной на рис. 4, с повторением максимумов при изменении концентрации ^3H -ГАМК примерно в 1,4 раза. Связывание ^3H -ГАМК с синаптическими мембранами мозга крыс характеризуется примерно такой же кривой.

Сравнение полученных нами кривых связывания ^3H -ГАМК и ^3H -мусцимола с фракциями мембран с кривыми, приводимыми в различных опубликованных работах [4, 8, 13], наводит на мысль, что наши данные не противоречат результатам этих работ, и, возможно, объясняют различия в количестве связывающих участков и их константах, приводимых разными авторами. То есть, в зависимости от концентрации лигандов можно получить самые разнообразные кривые связывания, встречающиеся в литературе.

Связывание ^3H -мусцимола с неотмытыми грубыми мембранами мозга почти не обнаруживает специфичности, выявляемой в присутствии 0,1 мМ немеченого мусцимола, но кривая связывания имеет описанную волнообразность. После отмывания мембран, в том числе и с использованием тритона X-100, специфическое связывание выявляется за счет раздвоения волнообразной кривой так, что волнообразность имеют как кривая общего, так и неспецифического связывания. Преинкубирование мембран при 60° в течение 20 мин приводит к исчезновению как специфического рецепторного связывания, так и волнообразности кривой.

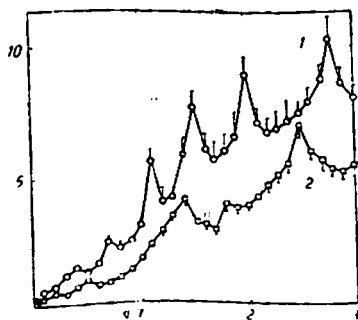
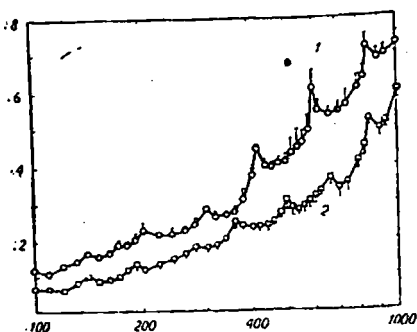


Рис. 4. Связывание ^3H -мусцимола с фракцией (P_2) грубых мембран мозга крыс: 1—общее связывание; 2—связывание в присутствии немеченого мусцимола в концентрации 0,1 мМ. По оси абсцисс— $\lg$ (^3H -мусцимола, нМ), по оси ординат—связанный ^3H -мусцимол (пмоль/мг белка)

Рис. 5. Связывание ^3H -ГАМК с фракцией грубых мембран из мышц саранчи: 1—общее связывание; 2—связывание в присутствии немеченой ГАМК в концентрации 1 мМ. По оси абсцисс—концентрация ^3H -ГАМК (мкМ), по оси ординат—связанная ^3H -ГАМК (пмоль/мг белка)

Кривые связывания ^3H -мусцимола и ^3H -ГАМК с препаратом солиubilизированных и обогащенных ГАМК-рецепторных участков имеют гиперболическую форму с $K_d = 16 \pm 4$ нМ для связывания ^3H -мусцимола (рис. 6, а) и с $K_d = 200 \pm 40$ нМ для связывания ^3H -ГАМК (рисунок не приводится). Эти кривые согласуются с приводимыми в литературе [14—16]. Расположение же точек на кривой связывания ^3H -мусцимола с солюбилизатором мембран (рис. 6, б) несколько напо-

минает кривую на рис. 2, что позволяет предположить, что волнообразность в некоторой мере сохраняется и при связывании с солюбилизованными мембранами.

Хотя эксперименты проводились с мембранами целого мозга крыс и мышц саранчи, то есть с объектами, в которых возможны различные популяции ГАМК-рецепторных участков, повторяющиеся максимумы при изменении концентрации меченого лиганда примерно в 1,4 раза (на кривых, обозначенных на рис. 2 и 3, где концентрация меченого лиганда постоянна, меняется отношение доли немеченого лиганда к меченому) могут указывать на некий единый функциональный механизм, вызывающий данную волнообразность. Тот факт, что волнообразность исчезает при инактивации ГАМК-рецепторного связывания нагреванием, может указывать на связь ее с нативной структурой мембран.

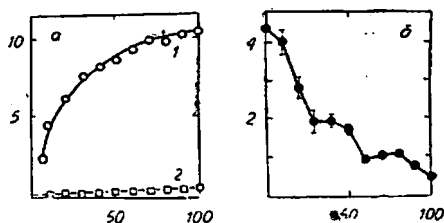


Рис. 6. Связывание ^3H -мусцимола с солюбилизованной и обогащенной фракцией (P_2) грубых мембран мозга крыс. *а*—в присутствии различных концентраций меченого мусцимола: 1—общее связывание; 2—неспецифическое, то есть в присутствии немеченого мусцимола в концентрации 0,1 мМ. По оси абсцисс—концентрация ^3H -мусцимола (нМ). *б*—в присутствии 10 нМ ^3H -мусцимола и различных концентраций немеченого мусцимола. По оси абсцисс—концентрация мусцимола (нМ), по оси ординат—связанный ^3H -мусцимол (пмоль/мг белка)

Волнообразность проявляется в присутствии почти тысячекратно избытка немеченого лиганда, причем, естественно, что разброс в его концентрациях во много раз превышает разницу между концентрациями меченого лиганда. Для объяснения этого можно высказать ряд предположений. Например, молекулы или молекулярные комплексы меченого и немеченого лигандов чем-то отличаются между собой, или существует некий специфический механизм рецепторного связывания, при котором лигандные комплексы при связывании с рецептором распадаются. Могут иметь место также и чисто радиационные эффекты β -излучения трития, энергии которого вполне достаточно для некоторой модификации как самих молекул лиганда, так и непосредственно соприкасающихся с ними других молекул, например, рецепторных. Неисключены и эффекты, связанные с обменом трития на водород между молекулами меченого лиганда и теми же рецепторными участками или водой.

Амплитуда волнообразности изменяется пропорционально концентрации меченого лиганда и при концентрации лиганда, равной 100 нМ.

имеет порядок 0,1 пмоль/мг белка. При солюбилизации мембран и обогащении солюбилизата ГАМК-рецепторными участками специфическое связывание ^3H -мусцимола при концентрации 100 нМ составляет около 10 пмоль/мг белка. Амплитуда же волнообразности остается порядка 0,1 пмоль/мг белка (рис. 6, б). На основании этого, с одной стороны, можно предположить, что волнообразность обусловлена каким-то неспецифическим фактором, от которого освобождаются в процессе обогащения ГАМК-рецепторными участками, а с другой стороны, нельзя исключить и то, что волнообразность отражает специфическое состояние ГАМК-рецепторного комплекса в солюбилизированной мембране, для которого характерна гиперболическая кривая связывания.

Проверка всех возможных объяснений волнообразности требует специальных экспериментов. Данная же работа ставит вопрос о правомочности интерпретаций кривых связывания с небогащенными ГАМК-рецепторными препаратами, которые приводятся в публикуемых работах, так как амплитуда показанной волнообразности соизмерима с величинами специфического ГАМК-рецепторного связывания для этих препаратов.

WAVE-FORM CURVES OF THE RAT BRAIN AND LOCUST MUSCLE MEMBRANE BINDING WITH ^3H -GABA AND ^3H -MUSCIMOL

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

Institute of Biological Physics, Acad. Sci. of the USSR, Poustchino

Rat brain and locust muscle membrane binding with ^3H -GABA and ^3H -muscimol has been studied in a large concentration range of ligands (1—1000 нМ) at one decimal interval. It was shown that the total and unspecific binding curves have a typical wavy form with convexity (or concavity) arising regularly with ligand concentration change by approx 1.4. Such waveform curves were observed both with rat brain membranes and plasma membranes of the locust muscle. Possible reasons of the wave-form curves are discussed.

ЛИТЕРАТУРА

1. Krnjevic K. *Physiol. Rev.*, v. 54, p. 418—540, 1974
2. Gerschenfeld H. M. *Physiol. Rev.*, v. 53, p. 1—119, 1973.
3. De Fendis F. V. *Neuroscience*, v. 5; p. 675—688, 1980.
4. Young A. B.—In: GABA in nervous system function (eds. E. Roberts, I. N. Chase, D. B. Tower), p. 305—317, N. Y., Raven Press, 1976.
5. Snydergrass S. R. *Nature*, v. 273, p. 332—391, 1978.
6. Enna S. J., Snyder S. H. *Mol. Pharmacol.*, v. 13, p. 442—453, 1977.
7. Beaumont K., Chilton W., Yananira H. I., Enna S. J. *Brain Res.*, v. 149, p. 153—162, 1978.

8. Winkler M. H., Nicklas W. J., Berl S. J. *Neurochem.*, v. 32, p. 79—84, 1979.
9. Johnston G. A. R., Allan R. D., Kennedy S. M. E., Twitchin B.—In: *GABA—Neurotransmitters* (eds. by Krogsgaard-Larsen P., Schell-Krüger J., Kofoed H.), p. 149—164, Munksgaard, Copenhagen, 1979.
10. Asano T., Ogasawara N. *Life Sci.*, v. 26, p. 1131—1137, 1980.
11. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J., *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265—275, 1951.
12. Кузнецов В. Н., Тонких А. К., Ким О. Н., Асламов Х. А. *Укр. биохим. журн.* т. 54, с. 428—431, 1982.
13. Meiners B. M., Kehoe P., Shaner D. M., Olsen R. W. *J. Neurochem.*, v. 32, p. 979—990, 1979.
14. Stephenson F. A., Watkins A. E., Olsen R. W. *Eur. J. Biochem.*, v. 123, p. 291—298, 1982.
15. Stgel E., Mamalaki C., Barnard E. A. *FEBS Lett.*, v. 147, № 1, p. 45—48, 1982.
16. Asano T., Ogasawara N. *Life Sci.*, v. 29, p. 193—200, 1981.

Поступила 20. III 1985



УДК 612.822.014.48:612.015.3

МЕТАБОЛИЗМ БИОГЕННЫХ АМИНОВ В СУБКЛЕТОЧНЫХ СТРУКТУРАХ ДВИГАТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ ДЛИТЕЛЬНОЙ ГИПОКИНЕЗИИ

ПАНУШЕВА Н. Н., ДОВЕДОВА Е. Л.

НИИ мозга ВНИЦ психического здоровья АМН СССР, Москва

Исследовали метаболизм биогенных аминов во фракциях синапсом (легких и тяжелых) и митохондрий, выделенных из сенсомоторной области коры больших полушарий и хвостатого ядра мозга крыс в течение длительной (до 90 суток) гипокинезии и в период реадaptации (через 30 суток после прекращения двигательного ограничения).

Обнаружены характерные для каждого срока эксперимента изменения содержания биогенных аминов—норадреналина, дофамина, серотонина и метаболита серотонина 5-оксииндолуксусной кислоты, а также активности MAO типов А и В. Показано, что 30-суточный период реадaptации после 90-суточной гипокинезии не приводит к полной нормализации исследуемых показателей метаболизма биогенных аминов.

Многочисленными исследованиями показано, что гипокинезия вызывает в организме животных и человека комплекс расстройств, выходящих далеко за пределы локомоторного аппарата и распространяющихся на все органы и системы [1—3]. Ограничение естественно-го объема мышечной деятельности в значительной степени сказывается и на функциональном состоянии НС, одним из показателей которого является уровень содержания в её структурах ряда биологически активных веществ, в частности биогенных аминов. Выполняя медиаторную и гормональную функции в ЦНС животных и человека, биогенные амины играют важную роль в регуляции многих процессов жизнедеятельности организма—циклов сна и бодрствования, мотивации, процессов обучения и памяти, а также в осуществлении и регуляции моторного поведения [4—6].

В настоящей работе изучали динамику метаболизма биогенных аминов в субклеточных фракциях, выделенных из сенсомоторной области коры больших полушарий и хвостатого ядра головного мозга крыс в различные сроки длительной гипокинезии, а также возможности нормализации исследуемых показателей при возвращении животных к нормальному двигательному режиму.

Материалы и методы

Опыты проводили на половозрелых крысах-самцах линии Вистар, массой 140—170 г. Всего в экспериментах использовали 280 животных (по 140 в контрольной и подопытных группах). Подопытных крыс содержали в течение 90 суток в индивидуальных клетках «пеналах», резко ограничивавших движения. Контрольную группу содержали в стандартных условиях вивария с однотипным пищевым и водным режимом. Исследования проводили на 30-, 60-, и 90-е сутки гипокинезии, а также через 30 суток после прекращения её действия.

Из сенсомоторной области коры больших полушарий и хвостатого ядра головного мозга крыс методом дифференциального центрифугирования [7] выделяли неосищенную митохондриальную фракцию, которую при последующем высокоскоростном центрифугировании в ступенчатом градиенте плотности сахарозы разделяли на 5 субклеточных фракций: *A* — миелин, *B* — обрывки синапсом, *C* — легкие синапсомы, *D* — тяжелые синапсомы и *E* — митохондрии [8].

Активность МАО типа *A* (субстрат — серотонин) и МАО типа *B* (субстрат — п-нитрофенилэтиламин) определяли спектрофотометрически при 250 [9] и 450 нм [10] соответственно, регистрируя образующиеся в присутствии семикарбазида продукты окислительного дезаминирования, используемых NH_2 -субстратов. В субфракциях суммарных синапсом *C, D* определяли содержание норадреналина (НА), дофамина (ДА), серотонина (5-ОТ) и 5-оксиндолуксусной кислоты (5-ОИУК) флуориметрическим методом [11]. Содержание белка (10—40 мг в пробе), а также состав инкубационной среды в контрольных и опытных пробах были одинаковы. Полученные результаты выражали в абсолютных величинах и в процентах изменения показателей по сравнению с нормой, принимаемой за 100%. Полученные результаты были статистически обработаны.

Результаты и обсуждение

В течение всего периода действия гипокинезии изменения активности МАО *A* и *B* имели одинаковую направленность (табл. 1). Первые 60 суток эксперимента характеризовались прогрессивным возрастанием активности обоих типов МАО в субклеточных фракциях сенсомоторной коры и хвостатого ядра. При этом активация МАО типа *A* была более выражена по сравнению с МАО типа *B*. В течение 3-го месяца гипокинезии активность процессов окислительного дезаминирования снижалась в субфракциях в различной степени по сравнению с её уровнем на 60-е сутки. В хвостатом ядре в течение этого срока происходила нормализация процесса за исключением субфракции *E*, где было обнаружено достоверное снижение активности МАО типа *B* по сравнению с контролем.

Сравнительный анализ изменений ферментативной активности в субклеточных фракциях сенсомоторной коры и хвостатого ядра показал, что в течение первых двух месяцев гипокинезии активация МАО типа *A* была несколько сильнее выражена в субклеточных структурах хвостатого ядра, тогда как более резкий спад активности фермента с 60-х по 90-е сутки эксперимента был отмечен в коре. Этот факт свидетельствует о большей уязвимости коры мозга в условиях гипокинезии по сравнению с хвостатым ядром.

Таблица 1

Активность МАО А ($E_{250}/\text{мг белка} \cdot 10^{-2}$) и МАО В ($E_{450}/\text{мг белка} \cdot 10^{-2}$) в субклеточных фракциях сенсомоторной коры больших полушарий и хвостатого ядра в различные сроки гипокинезии

Структуры головного мозга	Суб- фракции	Контроль	МАО А						Контроль	МАО Б					
			Гипокинезия (сут.)							Гипокинезия (сут.)					
			30		60		90			30		60		90	
			1	2	1	2	1	2		1	2	1	2	1	2
Сенсомо- торная область коры	С	46,9	60,8**	+30	79,2**	+69	29,8**	-36	53,9	60,0	+13	73,1**	+37	61,2	+15
	D	55,1	66,2	+20	88,2**	+60	36,7**	-33	60,1	64,9	+8	81,7**	+36	67,2	+12
	E	70,2	98,2**	+40	134,3**	+91	56,1	-20	70,2	79,3	+13	99,8**	+42	61,1	-13
Хвостатое ядро	С	59,6	71,0	+25	101,3**	+78	59,4	-0,3	59,0	66,8	+13	77,2**	+31	67,7	+17
	D	64,1	78,8**	+23	108,6**	+69	66,2	+3	64,9	73,2	+13	81,3**	+25	69,7	+7
	E	86,0	140,4**	+63	177,8**	+107	80,1	-7	78,2	90,7	+13	104,6*	+33	63,1*	-19

Примечание. Активность ферментов выражена в абсолютных величинах (1) и в % от контроля, принятого за 100% (2). * $p < 0,01$; ** $p < 0,05$

Ограничение двигательной активности сроком до 30 суток вызывало достоверное повышение содержания НА и ДА в синаптических сенсомоторной коры на 36 и 23% соответственно (рис. 1). В течение 2-го месяца эксперимента наблюдалась тенденция к нормализации содержания обоих катехоламинов. С 60-х по 90-е сутки гипокинезии происходила дальнейшая нормализация содержания НА, тогда как содержание ДА значительно увеличивалось и в конце экспериментального воздействия было на 71% выше нормы ($p < 0,01$).

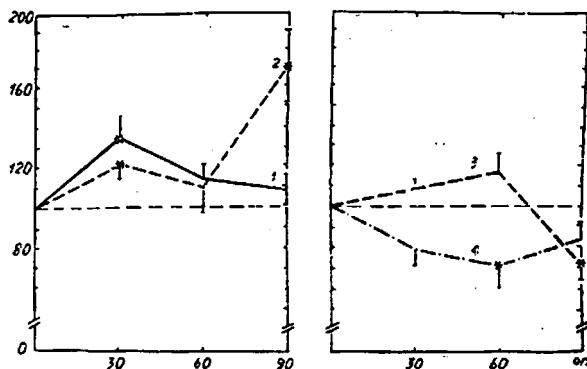


Рис. 1 Влияние гипокинезии на содержание биогенных аминов в синаптических сенсомоторной области коры. По оси абсцисс—продолжительность гипокинезии в сутках, по оси ординат—содержание в процентах от нормы, принятой за 100%. 1—НА, 2—ДА, 3—5-ОИУК, 4—5-ОТ

Первые 60 суток эксперимента характеризовались постепенным снижением содержания 5-ОТ в синаптических сенсомоторных областях, сопровождающимся повышением содержания его метаболита 5-ОИУК. В течение 3-го месяца гипокинезии была отмечена тенденция к нормализации уровня содержания 5-ОТ. Содержание 5-ОИУК в этот период достоверно снижалось и в конце периода гипокинезии было на 28% ниже нормы ($p < 0,01$). Подобная направленность изменений содержания биогенных аминов была обнаружена и в синаптических сенсомоторных областях хвостатого ядра (рис. 2). Так, наблюдаемое на 30-е сутки эксперимента повышение содержания в них НА и ДА сменялось в течение 2-го месяца гипокинезии тенденцией к его нормализации. Увеличение срока двигательной депривации до 90 суток вновь приводило к повышению содержания катехоламинов по сравнению с 60-ми сутками эксперимента. Количество НА на 90-е сутки гипокинезии практически нормализовалось, а содержание ДА было на 33% выше контроля ($p < 0,01$).

Состояние серотонинергической системы в хвостатом ядре на 30- и 60-е сутки гипокинезии практически полностью соответствовало таковому в сенсомоторной коре. В течение 3-го месяца ограничения подвижности наблюдалось возрастание как содержания 5-ОТ, так и

5-ОИУК, на 90-е сутки гипокинезии уровень содержания 5-ОТ был незначительно выше контрольного, тогда как концентрация 5-ОИУК повышалась на 56% по сравнению с нормой ($p < 0.01$).

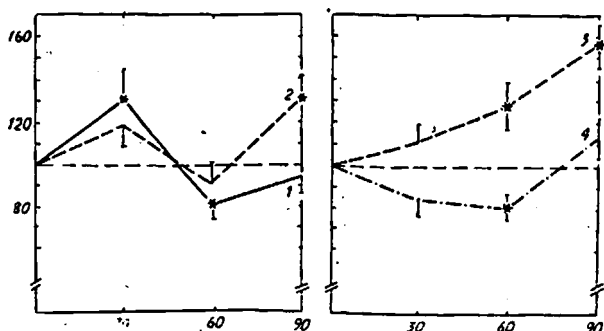


Рис. 2. Влияние гипокинезии на содержание биогенных аминов в синптосомах хвостатого ядра. Обозначения те же, что и на рис. 1

Изменения содержания биогенных аминов в течение всего периода гипокинезии находились в тесной связи с изменениями активности фермента, принимающего участие в процессах их катаболизма—МАО. Так, повышение содержания катехоламинов на 30-е сутки гипокинезии сопровождалось возрастанием активности МАО, что свидетельствует об интенсификации обмена НА и ДА в начальные сроки эксперимента. Следует отметить, что подобное увеличение содержания катехоламинов характерно для любого экстремального воздействия и отражает компенсаторно-восстановительные перестройки метаболизма нервных клеток в ответ на изменившиеся условия внешней среды [12].

Дальнейшая активация МАО обоих типов в течение 2-го месяца гипокинезии приводила к снижению содержания НА и ДА на 60-е сутки по сравнению с предыдущим сроком, что указывает на важную роль МАО в регуляции содержания биогенных аминов в нервной ткани при действии на организм экстремальных факторов. Нормализация концентрации катехоламинов на 60-е сутки гипокинезии свидетельствует об адаптации исследуемых структур мозга к этому сроку к ограничению двигательной активности.

Обращает на себя внимание тот факт, что на 60-е сутки эксперимента достоверно возростала и активность МАО типа Б. Основываясь на современных представлениях о множественности форм МАО [13, 14], можно предположить, что в экстремальных ситуациях в связи с необходимостью нормализации содержания катехоламинов МАО, в частности МАО типа Б, начинают окислять также и нетипичные субстраты, о чем имеются данные литературы [15].

Активность МАО типа А через 30 суток после возвращения животных к нормальному двигательному режиму была ещё понижена

по отношению к норме во всех исследованных субклеточных фракциях обоих образований мозга, что свидетельствует о торможении процессов окислительного дезаминирования биогенных аминов через 1 месяц после прекращения ограничения движений. В то же время изменения активности МАО типа Б имели противоположную направленность (табл. 2).

Таблица 2

Активность МАО А ($\Delta E_{250}/\text{мг белка} \cdot 10^{-2}$) и МАО Б ($\Delta E_{450}/\text{мг белка} \cdot 10^{-2}$) в субклеточных фракциях сенсомоторной коры и хвостатого ядра на 30-е сутки периода реадaptации

Структуры головного мозга	Субфракции	МАО А			МАО Б		
		контроль	реадаптация	% изменения по сравнению с контролем	контроль	реадаптация	% изменения по сравнению с контролем
Сенсомоторная область коры	С	46,9	37,8**	-19	53,9	63,8*	+24
	Д	55,1	49,6	-10	60,1	79,1**	+32
	Е	70,2	48,1**	-32	70,2	73,3	+4
Хвостатое ядро	С	59,6	48,2	-15	59,0	65,6	+11
	Д	64,1	50,5**	-21	64,9	86,2**	+33
	Е	86,0	60,1**	-30	78,2	81,4	+4

Примечание. * $p < 0,01$; ** $p < 0,005$

Через 30 суток после прекращения состояния воздействия гипокинезии содержание катехоламинов в синапсосах сенсомоторной коры было достоверно повышено по отношению к норме на 30% в случае НА и на 33% в случае ДА (рис. 3). Изменения этих показателей, однако, имели различную направленность в течение периода реадaptации—содержание НА в конце 90-суточной гипокинезии не отличавшееся от исходного, постепенно возрастало, тогда как количество ДА снижалось по сравнению с его количеством на 90-е сутки гипокинезии в сторону нормализации. Одномесичный период восстановления не приводил к заметным изменениям содержания 5-ОТ и продукта его распада 5-ОИУК в синапсосах сенсомоторной коры по сравнению с их количеством на 90-е сутки гипокинезии—оба показателя оставались ниже контрольного уровня.

В течение периода реадaptации была отмечена противоположная направленность изменений содержания НА и ДА и в синапсосах хвостатого ядра (рис. 4). Наблюдаемое в этот период повышение содержания 5-ОТ сопровождалось параллельным снижением количества 5-ОИУК в сторону его нормализации.

Возвращение животных к нормальному двигательному режиму после длительного ограничения движения в первое время является для них также стрессорным фактором [2]. Следовательно и в период восстановления подвижности животных возможны изменения со стороны метаболизма катехоламинов и активности МАО, участвующей в регуля-

ции их содержания. Но если в начальные сроки гипокинезии, когда регуляторные механизмы головного мозга были ещё в полной «рабочей готовности», активность МАО нарастала, что способствовало предотвращению негативных последствий стресс-реакции, вызванной ограничением подвижности, то в период после прекращения действия гипокинезии стресс-реакция формировалась на фоне существенного истощения адаптационных возможностей организма [2], что и обусловило специфику ответа клеток нервной ткани в течение данного периода.

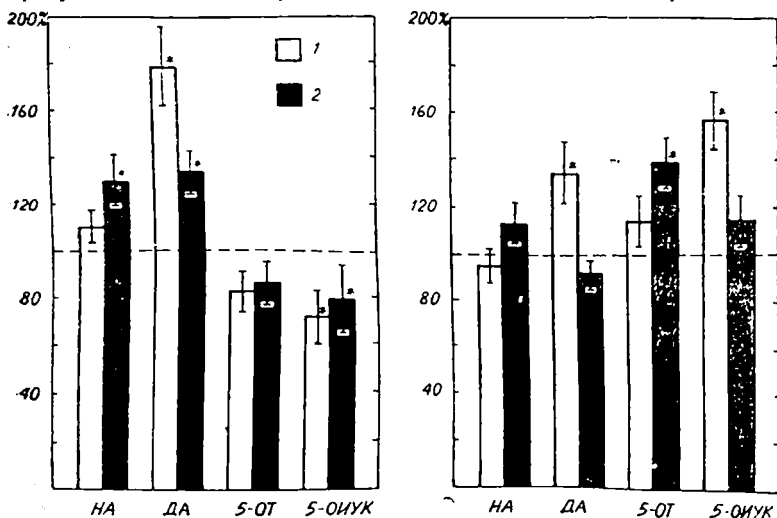


Рис. 3. Содержание биогенных аминов (в % от нормы, принятой за 100%) в синапсосах сенсомоторной области коры в период реадaptации. 1—90-суточная гипокинезия; 2—реадаптация (30-сутки после воздействия гипокинезии)

Рис. 4. Содержание биогенных аминов в синапсосах хвостатого ядра (в % от нормы, принятой за 100%) в период реадaptации. Обозначения те же, что и на рис. 3

Литературные и собственные данные убедительно свидетельствуют о том, что возвращение животных к обычному двигательному режиму приводит к постепенной ликвидации нарушения метаболических процессов, вызванных длительным ограничением подвижности. Однако период восстановления, равный одной трети времени действия гипокинезии, оказался недостаточным для полной нормализации метаболизма биогенных аминов в субклеточных структурах сенсомоторной области коры и хвостатого ядра головного мозга крыс.

Результаты настоящего исследования показали, что длительная (до 90 суток) гипокинезия приводит к существенным сдвигам содержания биогенных аминов и активности фермента их катаболизма

МАО во фракциях синапсом и митохондрий, выделенных из некоторых образований двигательной системы мозга крыс. Эти изменения имели характерные для каждого срока гипокинезии особенности и сохранялись в течение длительного времени после её прекращения.

METABOLISM OF BIOGENIC AMINES IN RAT BRAIN MOTOR SYSTEM SUBCELLULAR STRUCTURES UNDER THE PROLONGED HYPOKINESIA

PANOUSHIEVA N. N., DOVEDOVA E. L.

Brain Research Institute, Acad. Med. Sci., Moscow, USSR

The effect of prolonged hypokinesia (30, 60, 90 days) on the biogenic amine metabolism has been studied in the fractions of synaptosomes and mitochondria isolated from the rat brain sensorimotor cortex and n. caudatus. The specific changes for the each phase of the experiment have been demonstrated in the biogenic amine content (norepinephrine, dopamine, serotonin, 5-hydroxyindolacetic acid) and MAO activity. It has been shown that 30 days' period of readaptation after 90 days of hypokinesia is not enough for the normalization of the biogenic amine metabolism.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Коваленко Е. А., Попков В. А., Кондратьев Ю. Н., Маилян Э. С. Патол. физиология и эксперим. терапия, т. 14, с. 3—6, 1970.
2. Федоров И. В. Обмен веществ при гиподинамии, 252 с., М., Наука, 1982.
3. Kraus H., Raab W. Hypokinetic disease. Diseases produced by lack of exercise... Springfield, Illinois, 1961.
4. Будинцев А. Ю. Моноаминогические системы мозга, 192 с., М., Наука, 1976.
5. Baldessarini R. J. Ann. Rev. medicine, v. 23, p. 343—354, 1972.
6. Geyer M. A., Segal D. S., Mandell A. J. Physiol. Behav., v. 8, p. 653—658, 1972.
7. Бизольд Д.—В кн.: Биохимия и функция нервной системы. Материалы международного симпозиума, с. 115—122, Л., 1965.
8. De Robertis E., Pellegrino de Iraldi P. A., Rodrigues de Lores Arnais G. R., Salganicoff L. J. Neurochem., v. 9, p. 23—35, 1962.
9. Popov N., Rösler V., Thiemann C., Mathies H. Acta biol. et med. ger., v. 26, p. 239—245, 1971.
10. Горкин В. З., Вережкина А. В., Гриднева Л. Н.—В кн.: Современные методы в биохимии, т. 2, с. 155—157, М., Медицина, 1968.
11. Коган Б. М., Нечаев Н. В. Лаб. дело, т. 5, с. 301—303, 1979.
12. Тигранян Р. А., Костянцки Р. Нейрохимия, т. 1, с. 221—230, 1982.
13. Fowler C. J., Callingham B. A., Mantle T. J. Biochem. Pharmacol., v. 27, p. 97—101, 1978.
14. Garrick N. A., Murphy D. L. Biochem. Pharmacol., v. 31, p. 4061—4066, 1982.
15. Горошинская И. А., Броницкая Э. Г., Кричевская А. А., Карабухина Е. Г., Нейрохимия, т. 1, с. 282—287, 1982.

Поступила 7. I 1985



УДК 577.152:612.843:612.017.1

ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИТЕЛ К ГТР-СВЯЗЫВАЮЩИМ БЕЛКАМ
НАРУЖНЫХ СЕГМЕНТОВ ПАЛОЧЕК СЕТЧАТКИ

КАЛНИНА С. Н., ЭТИНГОВ Р. Н.

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

Антисыворотка к ГТР-связывающим белкам наружных сегментов палочек сетчатки (НСП) очищена методом иммуноаффинной хроматографии $\sim$ в 1000 раз (по белку). Полученные антитела тормозили ГТРазную активность НСП. Эти антитела, вырабатываемые у кроликов в течение года, относятся к М- и G-классам иммуноглобулинов.

ГТР-связывающие белки (G-белки) выполняют функцию посредников в процессе передачи сигналов с различных рецепторов на ферменты метаболизма циклических нуклеотидов. Применение иммунохимических методов анализа этих белков открывает широкие перспективы для изучения их структуры и функции.

Ранее нами были получены антитела (Ат) к G-белкам наружных сегментов палочек (НСП) сетчатки крупного рогатого скота [1]. Было показано, что эти Ат предотвращали активирующий эффект гуанил-5'-ил-нмидодифосфата (Gpp (NH)p) и NaF на 3',5'-сАМР фосфодиэстеразу (ФДЭ). Однако количество Ат для их эффективного действия было относительно велико ($\sim$ 300 мкг белка в пробе), что, очевидно, было связано с их относительно невысоким титром. В задачу настоящей работы входили очистка Ат методом иммуноаффинной хроматографии, проверка их влияния на активность ГТРазы, определение класса Ig, к которому принадлежит Ат.

Материалы и методы

Работа проведена на сетчатках крупного рогатого скота. Препараты НСП получали из тканей сетчаток, применяя ультрацентрифугирование в ступенчатом градиенте плотности сахарозы (0,85 и 1 М), приготовленной на 20 мМ трис-НСl буфере (рН 8,0), содержащем 2 мМ дитиотрейтола, 150 мМ NaCl и 2 мМ MgSO₄ (буфер А). Экстракцию G-белков осуществляли по методу Kühn [2]. Экстракт концентрировали под давлением азота при помощи прибора ФМО-1, применяя мембранные фильтры типа MBI-4.

Дальнейшую очистку G-белков проводили с помощью гель-фильтрации на колонке (1×95 см) с сефадексом G—150, уравновешенную смесью: буфер А+10%-ный глицерин (вес/объем). На колонку наносили 1,5—3 мг белка сконцентрированного экстракта, скорость элюции при 4° составляла 5 мл/ч, объем фракции равнялся 1,1 мл. Содержание белка во фракциях определяли по оптической плотности при 280 нм.

Активность ФДЭ и содержание P_i определяли, как описано ранее [1, 3, 4].

Для измерения активности GTPазы использовали [γ - ^{32}P] GTP (100 Кн/ммоль). Опыты проводили в двух вариантах: в одном случае реакционная смесь содержала 40 мМ трис-HCl (pH 8,0), 5 мМ $MgSO_4$, 2 мМ дитиотрейтола, 150 мМ NaCl (буфер Б), 10 мкМ GTP и 1×10^5 — 2×10^5 *смп* [γ - ^{32}P] GTP_i , а также систему регенерации АТР: 1 мМ АТР, 10 мМ креатинфосфата, 50 мкг креатинфосфокиназы [5]. В другом случае среда инкубации содержала буфер Б, 0,5 мкМ GTP и 1×10^5 — 2×10^5 *смп* [γ - ^{32}P] GTP [6]. Объем реакционной смеси в обоих вариантах составлял 100 мкл.

При определении активности GTPазы в каждую пробу добавляли 15 мкг НСП, обработанных предварительно алюминиокальциевыми квасцами по ранее описанному методу [1].

Пробы инкубировали 10—15 мин при 25° и останавливали реакцию 0,9 мл охлажденного активированного угля (концентрация угля 100 мг/мл 1 мМ HCl), затем выдерживали 10—15 мин на льду и центрифугировали 15 мин при 8000g. Аликвоту супернатанта отбирали в сцинтилляционный флакон и добавляли туда 10 мл воды. Подсчет радиоактивности вели в сцинтилляционном счетчике, используя эффект Черенкова. В некоторых случаях при определении активности GTPазы в пробы добавляли 0,1 мМ Gpp(NH)p, в присутствии которого наблюдалось заметное ингибирование фермента.

При изучении влияния Ат на активность GTPазы до начала реакции препарат фермента преникубировали с Ат 30 мин при комнатной температуре.

Разделение классов иммуноглобулинов (Ig) проводили, используя для осаждения белков из сыворотки $(NH_4)_2SO_4$ с последующими диализами [7] (схема).

Для выделения отдельных классов Ig применяли:

1. Метод поперечной хроматографии на ДЭАЭ-сефадексе А-50. На колонку (1,2×7 см), уравновешенную 0,0175 М фосфатным буфером (pH 6,6) наносили ~20 мг белка. Этим же буфером элюировали IgG, а затем 0,1 М фосфатным буфером (pH 6,6)—фракцию белков, в состав которой входили IgG и IgA.

2. Метод гель-фильтрации на сефадексе G-200 в двух вариантах [12, 13]: а) для очистки Ig класса М на колонку (0,9×101 см), уравновешенную 0,05 М трис-HCl (pH 8,0) буфером с 0,5 М NaCl, наносили 9 мг белка. Скорость ~5 мл/ч, объем собираемых фракций 1,2 мл; б) для очистки Ig классов G и A на ту же колонку, уравновешенную 0,1 М трис-HCl буфером (pH 8,0), содержащим 1 М NaCl, наносили 10 мг белка, скорость элюции 4 мл/ч, объем фракций 1,2 мл.

Для очистки Ат с помощью аффинной хроматографии BrCN-сефарозу-4В обрабатывали и присоединяли к ней антиген (экстракт G-белков) по методу Остермана [8] из расчета на 2,5 г лиофилизированной BrCN-сефарозы 30 мг белка экстракта. Избытки белка и блокирующего агента тщательно отмывали последовательно 0,1 М раствором $NaHCO_3$ (pH 8,3) с 0,5 М NaCl, водой 0,1 М фосфатным буфером (pH 7,8), снова водой, 0,1 М $NaHCO_3$ с 0,5 М NaCl, водой и 0,1 М фосфатным буфером (pH 7,8).

Приготовленный таким образом имunosорбент переводили в 0,01 М фосфатный буфер (pH 7,0) с 0,15 М NaCl, заполняли им колонку (1,1×5 см), через которую пропускали несколько раз антисыворотку. Колонку промывали 0,01 М фосфатным буфером (pH 7,0) с 0,3 М NaCl для удаления неспецифически сорбированных белков (контролировали по оптической плотности при 280 нм).

Ат элюировали последовательно с колонки 2,3 и 4,5 М $MgCl_2$ и немедленно диализовали против воды. После окончания диализа к Ат добавляли NaCl до

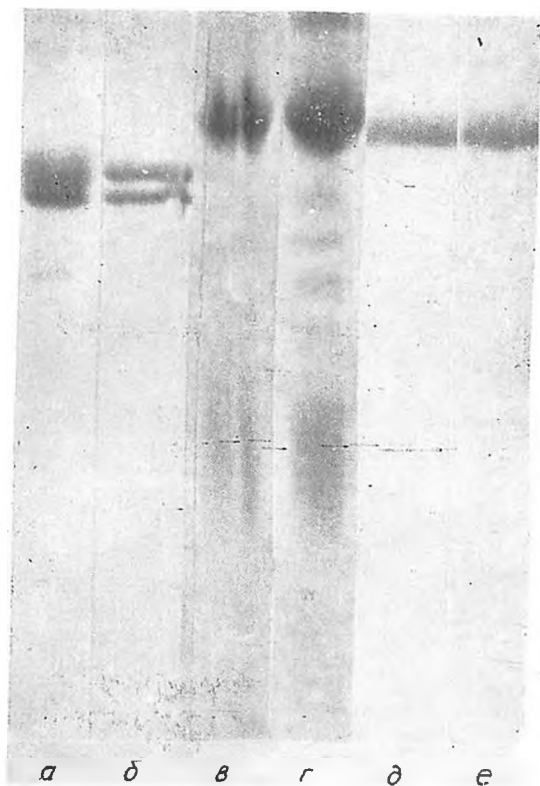


Рис. 2. Диск-электрофореграммы белков: а—экстракт G-белков, б—G-белок после очистки на сефадексе G-150 (№ фракций 29—48), в—IgG после ДЭАЭ-сефадекса А-50, г—IgM после сефадекса G-200, д—Ig после иммуноаффинной хроматографии, элюированные 2,3 М $MgCl_2$, е—Ig после иммуноаффинной хроматографии, элюированные 4,5 М $MgCl_2$; а, д—40 мкг белка в лунке, б—30 мкг, в, е—50 мкг, г—60 мкг

Фракции 29—48 были объединены и проанализированы методом электрофореза (рис. 2, б). Из этих данных следует, что примеси посторонних белков были весьма незначительны и G-белки были представлены двумя типичными полипептидами. Эти очищенные фракции были использованы для поддерживающих иммунизаций кроликов [1].

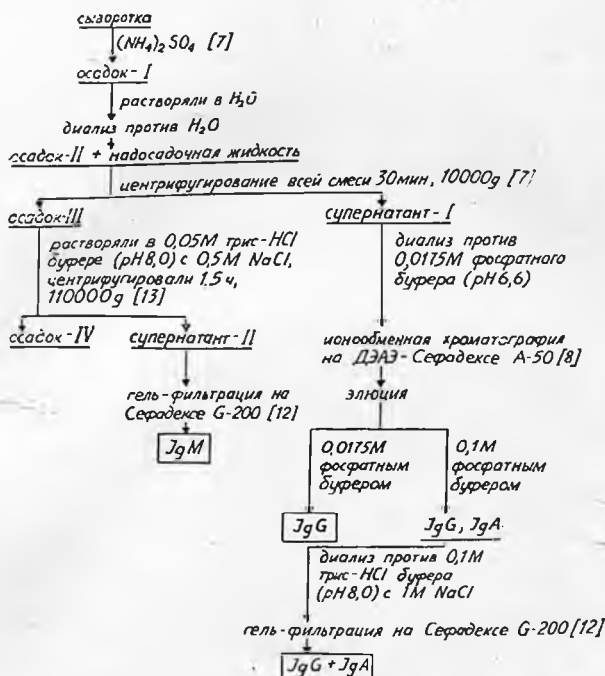


Рис. 3. Схема очистки различных классов Ig (в рамках обозначены конечные продукты)

В следующей серии экспериментов исследовали вопрос о классе Ig, к которому принадлежит Ат к G-белкам. Согласно вышеприведенной схеме, осадок-I промывали водой и диализовали белки [7]. В ходе диализа появлялся осадок-II, содержащий липопротенины и Ig класса M; в надосадочной жидкости оставались IgG и IgA. Конечным этапом очистки IgM служила гель-фильтрация их на сефадексе G-200 [12, 13]. Белки с колонки выходили двумя пиками: небольшим первым и преимущественно вторым пиком. Вначале элюировались липопротенины, затем Ig класса M. Как показали опыты по двойной радиальной иммунодиффузии, IgM, в отличие от фракции остаточных липопротенинов, реагировали с антигеном. Этот факт свидетельствует о том, что IgM не элюировались с липопротенинами, а отделялись от них.

Ig класса *G* выделяли методом ионообменной хроматографии с применением ДЭАЭ-сефадекса А-50. *IgG* (в 0,0175 М фосфатном буфере, рН 6,6) не адсорбировались на колонке и выходили в первых фракциях элюата. Однако известно, что *Ig* этого класса не вполне гомогенны по заряду из-за различия состава гипервариабельных областей [8]. Поэтому *IgG* могут элюироваться в широком диапазоне концентрации буфера вместе с *Ig* другого класса, в частности А [12]. В связи с этим проводили элюцию сорбировавшихся белков 0,1 М фосфатным буфером, элюируемые фракции содержали смешанные классы *Ig*—*G* и А [12], которые далее были подвергнуты дальнейшей очистке на сефадексе *G*-200 [12].

В результате всех этих процедур мы располагали фракциями *Ig* классов *M*, *G* и *G* + *A*.

Все выделенные классы *Ig* были проанализированы по их взаимодействию с антигеном. Установлено, что полосы преципитации образовывались со всеми этими классами, причем титр *IgG* и *IgM* был одинаков.

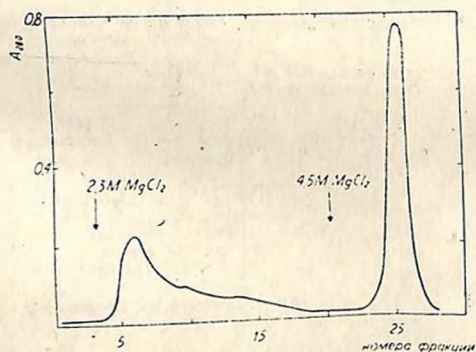


Рис. 4. Профиль элюции белков после иммуноаффинной хроматографии

Таким образом, Ат к *G*-белкам (после годовой иммунизации кроликов) относятся как к *Ig* класса *G*, так и *Ig* класса *M*.

Чем же объяснить тот факт, что в работе [1], *Ig* класса *G* почти не образовывали полосы преципитации с антигеном? Ранее мы использовали для получения *IgG* 0,05 М ацетатный буфер (рН 5,5); возможно, в этом буфере большая часть *IgG* сорбировалась на колонке по сравнению с 0,0175 М фосфатным буфером. Кроме того, в предыдущей работе срок иммунизации кроликов составил всего 6 месяцев, в настоящей—более года, что могло также отразиться на полученных результатах.

Из приведенных данных следует, что даже при иммунизации кроликов более года Ат к *G*-белкам образующиеся антитела принадлежат к различным классам *Ig*. Таким образом, при выделении одного класса *Ig* теряется часть Ат, относящихся к другому классу. Поэтому в сле-

дующей серии экспериментов Ат получали методом иммуноаффинной хроматографии. Из данных, приведенных на рис. 4, следует, что белок элюировался 2,3 и 4,5 М $MgCl_2$, причем большая часть белка элюировалась 4,5 М $MgCl_2$. При анализе этих фракций методом двойной радиальной иммунодиффузии было выяснено, что белок, элюируемый 4,5 М $MgCl_2$ четко образовывал полосу преципитации с антигеном; с белком, элюируемым 2,3 М $MgCl_2$, полоса преципитации была слабее.

Таблица 1

Влияние Ат к G-белкам на активность GTPазы фоторецепторных мембран сетчатки

Серия опытов	Источник фермента	Средина инкубации*	Добавляемые Ат**	Количество Ат. (мкг белка в пробе)	Активность GTPазы***
I	Фракция G-белков после сефадекса G-150 (№ 36-38, рис. 1)	1	Без добавок Ig-ДЭАЭ Ig-ДЭАЭ Ig'-ДЭАЭ	— 80 400 400	(пмоль GTP/мин/мл) 124 50 26 136
II	НСП	1	Без добавок Ig-ИАХа Ig-ИАХб Ig-ИАХа, б Ig-ИАХа, б	— 8 16 8 16	(пмоль GTP/мин/мг белка) 504 372 0 379 91
III	НСП	1	Без добавок Ig-ИАХб	— 8	225 105
IV	НСП	2	Без добавок Ig-ИАХа, б Ig-ИАХа, б ***-γ-глобулины γ-глобулины	— 15 30 15 30	70 44 41 67 75
V	НСП	2	Без добавок Ig-ИАХа, б	— 10	20 10
VI	НСП	2	Без добавок Ig-ИАХа, б	— 15	24 14
VII	НСП	2	Без добавок Ig-ИАХа, б	— 32	90 9

Примечание. *—среда 1 содержит систему регенерации АТР, концентрация GTP—10 мкМ; среда 2—концентрация GTP—0,5 мкМ, (см. «Материалы и методы»).

** Ig-ДЭАЭ—Ig иммунизированных кроликов после очистки на ДЭАЭ-сефадексе А-50; Ig'-ДЭАЭ—Ig неиммунизированных кроликов. Ig-ИАХ—Ig после очистки иммуноаффинной хроматографией: а—элюированные 2,3 М $MgCl_2$, б—4,5 М $MgCl_2$, а, б—суммарный элюат.

*** —коммерческий препарат фирмы «Serva» (ФРГ).

**** —в данных экспериментах определяли GTPазу в присутствии 0,1 мМ Gpp(NH)p.

Степень очистки Ат по белку при использовании метода иммуноаффинной хроматографии составила ~1000 раз (через колонку про-

пускали иммунную сыворотку, содержащую ~800 мг белка, во фракциях, элюируемых $MgCl_2$, количество белка составляло 0,8 мг белка). Следует отметить, что для преципитации Ат, элюируемых 4,5 М $MgCl_2$ с антигеном, необходимо было в 40 раз меньше белка, чем при использовании очищенных IgG и IgM .

Таблица 2

Влияние Ат к G-белкам на систему активации фосфолипазы из НСП Gpp(NH)p (5×10^{-5} М)

Серия опытов	Добавляемые ингредиенты	Количество Ат (мкг белка в пробе)	Активность фосфолипазы (нмоль сАМР/мин/мг белка)
I	Без добавок	—	20
	Ig*	340	22
	Ig'	300	28
	Gpp(NH)p	—	83
	Gpp(NH)p+Ig	340	30
	Gpp(NH)p+Ig'	300	94
II	Без добавок	—	9
	Ig-ИАХа**	20	12
	Ig-ИАХ6	5	12
	Ig-ИАХ6	10	13
	Gpp(NH)p	—	49
	Gpp(NH)p+Ig-ИАХа	20	13
	Gpp(NH)p+Ig-ИАХ6	5	39
	Gpp(NH)p+Ig-ИАХ6	10	19
III	Без добавок	—	20
	Ig-ИАХа	10	17
	Gpp(NH)p	—	90
	Gpp(NH)p+Ig-ИАХа	10	50
IV	Без добавок	—	39
	Ig-ИАХа, б	15	34
	Gpp(NH)p	—	100
	Gpp(NH)p+Ig-ИАХа, б	15	53

Примечание. *Ig—Ig иммунизированных кроликов. Ig'—Ig неиммунизированных кроликов; данные серии взяты из ранее опубликованной работы [1], в которой приведена схема получения Ig.

**—обозначения те же, что и в табл. 1.

Из данных по диск-электрофорезу (рис. 2) видно, что Ат, очищенные аффинной хроматографией, были практически гомогенны по сравнению с Ig (IgG , а также IgM), очищенными ИОХ и гель-фильтрацией.

При исследовании влияния Ат на активность ГТФазы (табл. 1) фоторецепторных мембран сетчатки показано, что Ат тормозили активность ГТФазы, причем Ат, очищенные методом иммуноаффинной хроматографии, были эффективны при использовании их в весьма малых концентрациях (5—30 мкг белка в пробе).

Эти же Ат обладали способностью предотвращать активирующий эффект Gpp(NH)p на ФДЭ (табл. 2).

Возможность получения достаточно чистых Ат к G-белкам фото-

рецепторных мембран в настоящее время открывает широкие перспективы для их использования в различных типах экспериментов. Так, можно выяснить вопрос об иммунологическом подобии этих G-белков и соответствующих белков других тканей, а также использовать эти Ат в электрофизиологических экспериментах.

CHARACTERISTICS OF ANTIBODIES AGAINST GTP-BINDING PROTEINS FROM RETINAL RODS OUTER SEGMENTS

KALININA S. N., ETINGOF R. N.

Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, USSR Academy of Sciences, Leningrad

Rabbit antiserum, raised against purified GTP-binding protein from retinal rods outer segments, obtained by the earlier developed scheme of immunization, was purified by the immunoaffinity method approx. 1000 times judged by protein content. These antibodies inhibited GTP-ase activity of photoreceptor membranes and belong to the M and G classes of immunoglobulines.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Калинина С. Н., Этингوف Р. Н. Биохимия, т. 49, № 4, с. 679—685, 1984.
2. Kühn H. Neurochemistry Internat., v. 1, p. 269—285, 1980.
3. Cheung W. Y. Biochim. et biophys. acta, v. 191, p. 303—315, 1969.
4. Думлер И. Л., Этингوف Р. Н. Биохимия, т. 38, № 2, с. 408—411, 1973.
5. Kosit G., Streray R. A., Klee W. A. J. Biol. Chem., v. 257, p. 14035—14040, 1982.
6. Shinozawa T., Bitensky M. W. Biochemistry, v. 20, p. 7068—7074, 1981.
7. Харбоу Н., Ингильд А.—В кн.: Руководство по количественному иммуноэлектрофорезу (под ред. Аксельсен Н., Крелль Й., Вееке Б.), с. 201—203, М., Мир, 1977.
8. Остерман Л. А.—В кн.: Исследование биологических макромолекул электрофорезом, иммуноэлектрофорезом и радионуклидными методами, с. 107—112, М., Наука, 1983.
9. Laemmli V. K. Nature, v. 227, p. 680—685, 1970.
10. Ouchterlony O. Acta path. scand., v. 32, p. 231—240, 1953.
11. Markwell M. A. K., Haas S. M., Bieler L. L., Tolbert N. E. Anal. Biochem., v. 87, p. 206—210, 1978.
12. Брок И.—В кн.: Иммунологические методы (под ред. Фримель Х. М.), с. 264—292, М., Мир, 1979.
13. Жатон Ж.—К., Брандт Д. Ч., Вассали П.—В кн.: Методы исследований в иммунологии (под ред. Лефковитс И., Перинс Б.), с. 58—82, М., Мир, 1981.

Поступила 19. VII 1984



УДК 577.352.4:6:2.829

АКТИВАЦИЯ КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ СИНАПТОСОМ
НЕКОТОРЫМИ ФОСФОПЕПТИДАМИ НЕРВНОЙ ТКАНИ

МИКЕЛАДЗЕ Д. Г., КАЧАРАВА Д. Г., ГВАЛИЯ Н. В.

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

Показано, что выделенные из гомогената ткани мозга подкисленными липорастворителями фосфопептиды увеличивают вход радиоактивного кальция в синаптосомы гораздо больше, чем это наблюдалось при деполяризации синаптосом вератрином и KCl, а также при инкубации синаптосом с ионофором А-23187. Действие фосфопептидов зависит от их концентрации и времени преинкубации с синаптосомами. Поглощение радиоактивного кальция, индуцируемое этими соединениями, ингибируется специфическим блокатором Ca^{2+} -каналов верапамилом. Эффекты фосфопептидов и деполяризующих агентов суммируются. Предполагается, что эти пептиды действуют на кальциевые каналы синаптосом.

Известно, что в регуляции многих нейрональных процессов ионам кальция принадлежит ведущая роль. Они осуществляют контроль над реакциями, связанными с синтезом и высвобождением нейромедиаторов [1], аксоплазматическим транспортом веществ [2], окислительным фосфорилированием и другими процессами [3].

Плазматическая мембрана клетки поддерживает градиент между внутриклеточной — микромолярной и внеклеточной — миллимолярной концентрациями кальция. Хотя в регуляции и обеспечении внутриклеточного пула кальция принимают участие такие структуры, как митохондрии, эндоплазматический ретикулум, кальцийсвязывающие белки (кальмодулин и другие), основная роль в этом процессе принадлежит плазматической мембране и локализованной в ней системе каналов кальция.

Из внеклеточного пространства вход кальция в клетку происходит по селективным кальциевым каналам, воротные механизмы которых могут сопрягаться либо с рецепторными белками нейромедиаторов, либо с потенциалчувствительными структурами мембран [4]. О структуре и механизме регуляции Ca^{2+} -каналов в настоящее время известно очень мало. Предполагается, что в активации этих каналов существенная роль принадлежит протеникиназным реакциям, которые регулируются системой циклических нуклеотидов [5].

Ранее нами из гомогената ткани мозга были выделены и идентифицированы фосфорилирующиеся *in vivo* пептиды, условно названные нами А, В, С [6], имеющие величину M_r в пределах 1 кД, обладающие низкой изоэлектрической точкой, содержащие кислые аминокислоты, глутамат и аспартат, а также серин. Они интенсивно фосфорилируются *in vivo*, и уровень их фосфорилирования зависит от функционального состояния ЦНС [7]. Учитывая, что фосфопептиды ткани мозга в наибольшем количестве представлены в миелине и плазматических мембранах, а также принимая во внимание их относительную гидрофобность [8], можно предположить, что они играют существенную роль в основных мембранных процессах клетки. С этой целью изучали действие этих пептидов на поглощение ^{45}Ca синапсосомами. Полученные данные свидетельствуют о том, что фосфопептиды могут регулировать активность Ca^{2+} -каналов синапсосом.

Материалы и методы

В опытах использовали взрослых крыс-самцов массой 200—250 г. Фосфопептиды А, В и С выделяли по ранее описанной методике [6]. Синапсосомы получали по Whittaker [9]. Очищенные синапсосомы, выделенные в градиенте сахарозы, осаждали центрифугированием и далее ресуспендировали в трис-Кребс-Рингер растворе (ТКР) из расчета 10 мг белка/1 мл раствора. Раствор ТКР содержал в мМ NaCl —145, KCl —5, CaCl_2 —1,2, MgCl_2 —1,3, $\text{N}_2\text{H}_4\text{O}_4$ —2,0, глюкозу—10,0, трис— HCl буфер, pH 7,4—10 (натриевый ТКР) [10].

Деполаризацию мембран вызывали изотоническим раствором ТКР, в котором концентрация NaCl была понижена до 95 мМ, а концентрация KCl повышена до 50 мМ (высококальневый ТКР). Оба раствора ТКР перед употреблением подвергали дегазации. Пренкубацию синапсосом в течение 20 мин при 30°C в присутствии и в отсутствие фосфопептидов проводили в натриевом ТКР, затем из синапсосомной суспензии отбирали пробы по 50 мкл, к одной добавляли 450 мкл высококальневого ТКР, а к другой—в таком же количестве натриевый ТКР. Оба раствора содержали 1,2 мМ ^{45}Ca (250 000 dpm). Поглощение ^{45}Ca останавливали после 10 с, добавляя к реакционной смеси 0,5 мл свободного от кальция натриевого ТКР, который дополнительно содержал 2 мМ ЭГТА. В дальнейшем суспензию фильтровали через 0,65 мкм фильтры марки «Millipore», которые трижды промывали охлажденным натриевым ТКР, высушивали и обрабатывали 1%-ным триптоном X-100 в 0,5 М HCl , радиоактивность измеряли в сцинтилляционной жидкости толуол-тригон (2:1) на счетчике SL-400 «Intertechnique» (Франция).

В пробы вносили вератрин в концентрации 75 мкМ в натриевом растворе ТКР. Концентрация инофора А-23187 в опытах составляла 100 нМ. Для блокирования Ca^{2+} -каналов синапсосом использовали верапамил в концентрации 25 мкМ в натриевом растворе ТКР.

Количество фосфопептидов определяли спектрофотометрически в проточной кювете спектрофотометра «Gilson» (Франция) при длине волны $\lambda = 220$ нм.

В работе использовали ЭГТА («Fluka», Швейцария), вератрин («Sigma», США), верапамил («Orion», Финляндия), инофор А-23187 («Sigma», США). Остальные реактивы отечественного производства квалификации ос. ч и х. ч.

Результаты и обсуждение

Как видно из таблицы, при действии деполаризующих агентов (K^+ и вератрина) на синапсосомные мембраны наблюдалось интен-

сивное поглощение ^{45}Ca синаптосомами, которое в течение 10 с составляло 3,84 и 3,36 нмоль $^{45}\text{Ca}^{2+}$ /мг белка соответственно. В присутствии ионофора А-23187 количество поглощенного кальция в том же интервале времени равнялось 2,9 нмоль/мг белка. В отсутствие деполяризующих агентов и ионофора А-23187 (нормальный ТКР) синаптосомы поглощали кальций лишь в следовых количествах. Выделенные нами ранее фосфопептиды А и С инициировали накопление ^{45}Ca синаптосомами. Фосфопептид В эффекта не оказывал. Препикубация синаптосом с фосфопептидами А и С в концентрации 20 мкМ вызывала увеличение поглощения радиоактивного кальция в несколько раз по сравнению с контрольными препаратами, содержащими нормальный натриевый раствор ТКР. Индуцируемое пептидами поглощение кальция ингибировалось специфическим блокатором Ca^{2+} -каналов—верапамилом.

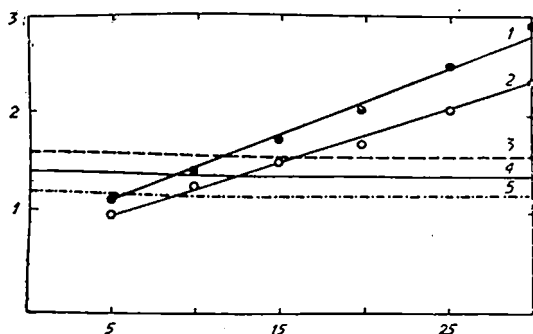


Рис. 1. Действие различных концентраций фосфопептидов А и С на поглощение ^{45}Ca синаптосомами. 1—фосфопептид А; 2—фосфопептид С; 3—KCl; 4—вератрин; 5—ионофор А-23187. По оси абсцисс—концентрация фосфопептидов в мкМ. По оси ординат— ^{45}Ca . 10dpm/мг белка/10 с

В другой серии опытов изучали влияние разных концентраций фосфопептидов А и С на поглощение ^{45}Ca . Как видно из рис. 1, при наличии в инкубационной среде 5 мкМ фосфопептида А и 10 мкМ фосфопептида С синаптосомы поглощали ^{45}Ca в таком же количестве, как и при действии 100 нМ ионофора А-23187. При увеличении концентрации фосфопептидов А и С соответственно до 10 и 15 мкМ синаптосомы поглощали столько же ^{45}Ca , сколько при вератриновой деполяризации, а увеличение концентрации фосфопептидов до 15 и 20 мкМ соответственно вызывало такое же поглощение ^{45}Ca , как при деполяризации синаптосомных мембран ионами калия. Дальнейшее увеличение концентрации фосфопептидов приводило к повышению входа ^{45}Ca в синаптосомы. Насыщение активации наблюдалось при увеличении концентрации фосфопептидов А и С в инкубационной среде до 30 мкМ.

Была также обнаружена зависимость активации Ca^{2+} -каналов от времени препикубации синаптосом с фосфопептидами А и С. На

рис. 2 показана зависимость поглощения ^{45}Ca синапсосомами от времени преникубации с фосфопептидом А. Увеличение времени преникубации синапсосом с пептидом от 5 до 20 мин вызывает повышение поглощения ^{45}Ca . Однако после 30 мин преникубации происходило уменьшение включения. Можно предположить, что увеличение времени преникубации синапсосом с фосфопептидом А до 30 мин вызывает в них определенные структурные изменения, вследствие чего понижается способность фосфопептида к активации кальцевых каналов.

Таблица
Поглощение ^{45}Ca синапсосомами при действии
деполяризующих агентов, ионофора Ca^{2+} -ка-
налов и фосфопептидов.

Условия опыта (n=4)	Поглощение $^{45}\text{Ca}^{2+}$ - нмоль/мг белка/10 с
K^{+}	$3,84 \pm 0,04$
вератрин	$3,36 \pm 0,07$
ионофор А-23187	$2,88 \pm 0,04$
фосфопептид А	$4,80 \pm 0,05$
фосфопептид С	$4,08 \pm 0,06$
фосфопептид А + верапамил	$0,24 \pm 0,05$

Примечание. n-количество опытов.

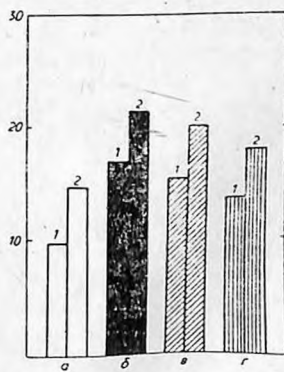
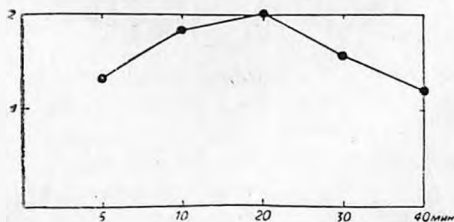


Рис. 2. Зависимость активации Ca^{2+} -каналов от времени преникубации синапсосом с фосфопептидом А. По оси ординат— ^{45}Ca . $10^3\text{dpm}/\text{мг}$ белка/10 с

Рис. 3. Действие фосфопептида А на поглощение ^{45}Ca синапсосомами в присутствии натриевого ТКР, деполяризующих агентов и ионофора А-23187. а—натриевый ТКР; б—высококальцевый ТКР; в—вератрин; г—ионофор А-23187; 1—контроль; 2—в присутствии 20 μM фосфопептида А. По оси ординат— ^{45}Ca . $10^2\text{dpm}/\text{мг}$ белка

Интересным является также тот факт, что при действии фосфопептидов на поглощение ^{45}Ca в присутствии деполяризующих агентов наблюдается синергизм (рис. 3). В присутствии фосфопептида А и

K^+ синаптосомы накапливали ^{45}Ca в количестве 5,2 нмоль/мг белка, что значительно выше количества поглощения кальция, индуцируемого этими агентами в отдельности (3,4 и 3,8 нмоль/мг белка соответственно). То же самое наблюдается в присутствии вератрина и фосфопептида А, а также ионофора кальциевых каналов—А-23187 и фосфопептида А. Интересен и тот факт, что эффект применения 20 мкМ фосфопептида А совместно с деполяризующими агентами и ионофором А-23187 выражается везде одинаково, то есть, если исключить эффекты KCl , вератрина и ионофора А-23187, эффект самого фосфопептида А во всех случаях равен 1,2 нмоль Ca^{2+} /мг белка.

Таким образом, вышеприведенные данные свидетельствуют о том, что выделенные ранее фосфопептиды [6] проявляют активность в отношении Ca^{2+} -каналов. Действие фосфопептидов зависит от их концентрации и времени инкубации с синаптосомами. Поглощение ^{45}Ca , индуцируемое этими соединениями, ингибируется специфическим блокатором кальциевых каналов—верапамилом, а их эффект является аддитивным по отношению к действию деполяризующих агентов.

В настоящее время предполагается, что белки Ca^{2+} -каналов могут быть сопряжены либо с рецепторами нейротрансмиттеров, либо с канальными белками потенциалчувствительных структур [4, 11]. Последние обуславливают K^+ -зависимую Ca^{2+} проводимость мембран и являются ответственными за быстрый, инактивирующийся в процессе деполяризации кальциевый ток [10]. Полученные в последнее время оригинальные данные Костюка и соавт. [5] свидетельствуют о том, что в структурных переходах потенциалзависимых Ca^{2+} -каналов важную роль играют протенинказные реакции, регулируемые циклическими нуклеотидами. Фосфорилирование канальных белков модулирует Ca^{2+} -канал и переводит его из пассивного состояния в активное [4].

Выделенные нами пептиды являются фосфорилированными по сериновым остаткам. Они хорошо растворимы как в водных, так и в органических растворителях [12] и содержатся в большом количестве в плазматических мембранах нервной клетки. Не исключено, что они, подобно некоторым синтетическим пептидам, проявляющим Ca^{2+} -ионофорные свойства [13], могут свободно транслоцироваться в мембранах и участвовать в структурной организации и модификации белковых ионных каналов.

ACTIVATION OF CALCIUM CHANNELS OF SYNAPTOSOMES BY SOME NERVE TISSUE PHOSPHOPEPTIDES

MIKELADZE D. G., KACHARAVA D. G., GVALIA N. B.

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

The influence of some nerve tissue phosphopeptides on the calcium ion uptake by rat brain synaptosomes has been studied. The phosphopeptides extracted by acidic liposolvents from rat brain tissue homo-

genate lead to a considerably higher rate of radioactive calcium incorporation into synaptosomes than veratrine and A-23187 ionophore. The effect of phosphopeptides depends upon their concentration and preincubation time. The uptake of radioactive calcium induced by these compounds is inhibited by specific calcium channel antagonist—verapamil. The effect of phosphopeptides is summated with the action of depolarizing agents. These peptides are supposed to act on calcium channel of synaptosomes.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Kelly R. B., Deutsch J. W., Carlson S. S., Wagner J. A. *Ann. Rev. Neurosci.* v. 2, p. 399—466, 1979.
2. Solfer D. J. *Neurochem.*, v. 24, p. 21—33, 1975.
3. Magilen G., Gordon A., Au A., Diamond I. J. *Neurochem.*, v. 36, p. 1861—1864, 1981.
4. Glossmann H., Ferry D. R., Lubbecke F., Mewes R., Hofmann F. *Trends Pharmacol. Sci.*, v. 3, p. 431—437, 1982.
5. Костюк П. Г., Дорощенко П. А., Мартынюк А. Е., Курский М. Д., Воробец З. Д. Докл. АН СССР, т. 271, с. 756—758, 1983.
6. Микеладзе Д. Г., Качаравა Д. Г. *Биохимия*, т. 47, с. 1125—1130, 1982.
7. Качаравა Д. Г., Микеладзе Д. Г., Чичуа А. И. *Сообщ. АН ГССР*, т. 103, с. 453—456, 1981.
8. Ledig M., Mandel P. *Biochimie*, v. 60, p. 25—24, 1978.
9. Whittaker V. P. *Handbook of Neurochem.* (ed. Lajtha A.), v. 2, p. 327—364. Plenum Press, N. Y.—L., 1969.
10. O'Leary M. E., Suszkiw J. B. J. *Neurochem.*, v. 4, p. 1192—1195, 1983.
11. Kostyuk P. G. *Biochim. et biophys. acta*, v. 650, p. 128—150, 1981.
12. Ledig M., Mandel P. *Biochimie*, v. 57, p. 1377—1384, 1975.
13. Spach G., Trudelle Y., Heltz F. *Biopolymers*, v. 22, p. 403—407, 1983.

Поступила 7. I 1985



УДК 612.8.015:616.988.2

ПРОДУКТЫ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И СОСТАВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ ЛИПИДОВ СИНАПТОСОМ ГОЛОВНОГО МОЗГА МЫШЕЙ «QUAKING» И МЫШЕЙ С ОСТРОЙ ВИРУСНОЙ ДЕМИЕЛИНИЗАЦИЕЙ

ГОРБУНОВ Н. В., АННАНЕПЕСОВ Х. Н.

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

Изучали содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и состав жирных кислот (ЖК) липидных экстрактов (ЛЭ) синапсом головного мозга мышей при энцефаломиелите, вызванном коронавирусом мышинного гепатита (ЭМГ) и мышей с генетически обусловленной демиелинизацией («Quaking»). Обнаружено накопление продуктов ПОЛ и уменьшение содержания докозагексаеновой ЖК в ЛЭ синапсом мышей при ЭМГ, а в ЛЭ синапсом мышей «Quaking» — увеличение содержания докозагексаеновой ЖК. Предполагается, что обнаруженные изменения связаны с особенностями патологических процессов в головном мозгу исследуемых животных.

Большое значение для понимания этиологии и патогенеза заболеваний НС человека, связанных с патологией миелина, имеет изучение подобных состояний у экспериментальных животных. К ним относятся вирусная демиелинизация, возникающая при остром энцефаломиелите, вызываемом JHM штаммом коронавирусов [1], и генетически обусловленная демиелинизация, развивающаяся у мышей «Quaking» [2]. По данным морфологических исследований, эти заболевания характеризуются избирательным распадом миелиновой оболочки нервных волокон, либо их недостаточной миелинизацией без выраженного повреждения аксонов [1—3].

Ранее уже сообщалось [4] об активации ПОЛ в синапсоматозах головного мозга при ЭМГ, что свидетельствовало о поражении плазматической мембраны нейронов, происходящем наряду с распадом миелина. В связи с этим целесообразно было провести сравнительное изучение активации процессов ПОЛ в головном мозгу мышей «Quaking» и мышей с острой вирусной демиелинизацией и определение возможной корреляции между накоплением продуктов ПОЛ в синапсоматозах головного мозга и составом жирных кислот фосфолипидов.

Материалы и методы

В эксперименте были использованы мыши линии С57В/67 («Quaking»), полученные из лаборатории патоморфологии нервной системы НИИ экспериментальной медицины АМН СССР. Вирусную демиелинизацию вызывали у 4—5-недельных и 4—5-месячных мышей линии С3Н интрацеребральной инокуляцией нейротропного JHM штамма коронавируса мышиного гепатита. Острая форма ЭМГ развивалась у животных на 7—10-й день.

Синапсосомы головного мозга мышей выделяли, как описано ранее [4]. Липидные экстракты получали по методу Folch и соавт. [5]. Липидный фосфор определяли методом Vaskovksy и соавт. [6]. Об активации ПОЛ судили по накоплению продуктов ПОЛ-диеновых конъюгатов, поглощающих в области 232 нм, и содержанию флуоресцирующих продуктов типа Шиффовых оснований [4]. Флуоресценцию конечных продуктов ПОЛ измеряли на спектрофлуориметре «Hitachi MPF 2A» (Япония). Состав жирных кислот определяли методом ГЖХ на хроматографе «PUE 104» (Англия) с пламенноионизационным детектором. Идентификацию жирных кислот проводили, используя стандартную смесь жирных кислот.

Результаты и обсуждение

Содержание продуктов ПОЛ при остром ЭМГ как в целом мозгу, так и в синапсосомах 4—5-недельных и 4—5-месячных животных значительно выше, чем у контрольных (табл. 1 и 2). Однако следует отметить, что в синапсосомах и головном мозгу 4—5-месячных мышей при этом заболевании оно колеблется в широком интервале, что может быть связано с возрастными особенностями индукции ЭМГ у взрослых мышей [1].

В синапсосомах 4-недельных мышей наблюдалось более высокое содержание флуоресцирующих продуктов ПОЛ, чем у 4—5-месячных мышей (табл. 2). По существующим данным [1], острая форма ЭМГ воспроизводится лучше на 3—4-недельных животных, чем на взрослых. Исходя из этого, можно предположить, что существует корреляция между степенью выраженности заболевания и активации ПОЛ как в целом головном мозгу, так и в синапсосомах.

Наблюдаемая активация ПОЛ при ЭМГ не нашла полного объяснения. Она может быть связана с возрастающей фагоцитарной активностью, которая отмечается для острого ЭМГ [1]. В этом случае выход гидролитических ферментов [1] и ферментов, обеспечивающих так называемый «окислительный взрыв»,—средство инактивации микроорганизмов [7]—в межклеточное пространство из фагоцитов мог привести к поражению плазматических мембран синапсосом.

Другим возможным источником гидролитических ферментов и фермента, опосредующего индукцию ПОЛ—NADPH-зависимой диоксигеназы липидов, могут быть лизосомы и мембраны эндоплазматического ретикулума, проникающие в межклеточное пространство при деструкции вирусами клеток олигодендроглии [1, 8]. В пользу этих предположений свидетельствует тот факт, что в составе фосфолипидов синапсосом при остром ЭМГ наблюдалось появление лизофосфатидилхолина, который отсутствовал в синапсосомах контрольных животных. Как

известно, появление моноацилглицерофосфатидов связано с активацией либо фосфолипазы A₂, либо NADPH-зависимой диоксигеназы липидов, индуцирующей перекисное окисление полиеновых кислот (β -ацилов) фосфолипидов [9].

В головном мозгу мышей «Quaking» нет достоверных отличий в содержании продуктов ПОЛ по сравнению со здоровыми мышами линии СЗН (табл. 1).

Таблица 1

Содержание продуктов перекисного окисления липидов в головном мозгу 4—5-месячных мышей линии СЗН при остром энцефаломелите мышинного гепатита и мышей «Quaking»

Группы животных	Липидный экстракт головного мозга	Флуоресценция Инф-овых оснований, отнесенная к 1 мкг липидного фосфора в 1 мл раствора	Оптическая плотность раствора (A ₂₃₂), отнесенная к 1 мкг липидного фосфора в 1 мл раствора
I	Контроль		
	1 (n=2)	2,0±0,5	(5,0±0,5)×10 ⁻³
	2 (n=2)	2,5±0,5	(4,0±0,5)×10 ⁻³
II	«Quaking» (n=3)	3,0±0,5	(5,0±0,5)×10 ⁻³
III	ЭМГ (n=1)		
	1	64,5±0,5	(16,0±0,5)×10 ⁻³
	2	5,7±0,5	(7,2±0,5)×10 ⁻³
	3	43,5±0,5	(17,6±0,5)×10 ⁻³
	4	4,2±0,5	(7,0±0,5)×10 ⁻³
	5	10,6±0,5	(8,8±0,5)×10 ⁻³
	6	13,5±0,5	(16,0±0,5)×10 ⁻³
	7	62,7±0,5	—

Примечание. В табл. 1—3 приведены величины $\bar{x} \pm \sigma_i$, где $\bar{x}$ —среднее значение определяемого в липидном экстракте параметра с дисперсией σ_i , i —количество параллельных определений параметра $\bar{x}$ в каждом липидном экстракте, равное 3 для всех приведенных в таблице величин; n —количество животных, использованных при получении липидного экстракта.

В липидном экстракте фракции синапсом мышей «Quaking» содержание продуктов ПОЛ выше контроля (табл. 2), что свидетельствует о нарушении метаболизма полиеновых кислот [10]. Возможным объяснением этого явления может быть индукция ПОЛ, вызванная, с одной стороны, непрерывным тремором, который у этих животных выражает наличие стресса [11], а с другой стороны—подверженностью ферментативному аутоокислению, обусловленному структурными изменениями мембран, связанными с нарушениями биосинтеза жирных кислот в клетках олигодендроглии [2]. В связи с этим на следующем этапе исследования было целесообразно изучить состав жирных кислот общих фосфолипидов синапсом головного мозга мышей линии СЗН с индуцированным острым ЭМГ мышей «Quaking» и контрольных взрослых мышей линии СЗН с целью выявления корреляции

между изменениями в составе жирных кислот в липидных экстрактах и содержанием в них продуктов ПОЛ (табл. 3 и 2), а также для выявления возможных биохимических отличий, связанных с различными этиологии и патогенеза рассматриваемых заболеваний.

Таблица 2

Содержание продуктов перекисного окисления липидов в синапсосах головного мозга мышей линии СЗН при остром энцефаломиелите мышинного гепатита и мышей «Quaking»

Группы животных	Липидный экстракт синапсосом	Флуоресценция Шиффовых оснований, отнесенная к 1 мкг липидного фосфора в 1 мл раствора	Оптическая плотность раствора (A_{232}), отнесенная к 1 мкг липидного фосфора в 1 мл раствора
I	Контроль (целый мозг) 1 серия* 2 серия	$1,10 \pm 0,05$ $2,2 \pm 0,5$	$(4,0 \pm 0,5) \times 10^{-3}$ $(6,5 \pm 0,5) \times 10^{-3}$
II	ЭМГ (4–5-недельные мыши, серое вещество) 1 серия*	$107,0 \pm 0,5$	$(38,5 \pm 0,5) \times 10^{-3}$
III	ЭМГ (4–5-месячные мыши, целый мозг) 1 серия* 2 серия 3 серия	$4,20 \pm 0,05$ $20,9 \pm 0,5$ $63,3 \pm 0,5$	$(9,0 \pm 0,5) \times 10^{-3}$ $(36,0 \pm 0,5) \times 10^{-3}$ $(45,5 \pm 0,5) \times 10^{-3}$
IV	«Quaking» (целый мозг) 1 серия*	$7,15 \pm 0,05$	$(7,5 \pm 0,5) \times 10^{-3}$

Примечание. В каждой серии измерений было использовано по 5–6 животных.
* Липидные экстракты, использованные для сравнительного анализа ЖК.

Результаты, приведенные в табл. 2, 3, свидетельствуют, что увеличению содержания продуктов ПОЛ в липидных экстрактах синапсосом мышей линии СЗН при ЭМГ соответствует достоверное уменьшение содержания докозагексасиновой кислоты ($C_{22:6\omega3}$). С этими данными согласуются представления о том, что индукция ПОЛ связана с распадом полиеновых кислот [12].

В липидном экстракте синапсосом мышей «Quaking» наблюдалось достоверное увеличение докозагексаеновой кислоты. Ранее отмечалось относительное увеличение арахидоновой ($C_{20:4\omega6}$) и докозагексасиновой кислот в разных классах фосфолипидов головного мозга мышей с недостаточной миелинизацией [13]. Однако авторы связывали эти изменения с уменьшением содержания в липидах мозга насыщенных жирных кислот, характерных для миелина. С другой стороны, показано [14], что в головном мозгу мышей «Quaking» нет нарушений в функционировании β -адренорецепторов, на которые существенным образом влияет состояние липидного бислоя [15].

Возможно, что увеличение содержания кислоты $C_{22:6\omega3}$ в фосфолипидах синапсом головного мозга мышей «Quaking» связано с необходимостью поддержания липидного матрикса в определенном физико-химическом состоянии, необходимом для функций мембраносвязанных комплексов, и в частности β -адренорецепторов, так как известно, что накопление продуктов ПОЛ в бислое ведет к его существенной модификации [12].

Таблица 3

Содержание основных жирных кислот (в % от суммы) в липидных экстрактах синапсом головного мозга мышей линии СЗН с острым ЭМГ и мышей «Quaking»

Жирная кислота	Контроль (взрослые мыши линии СЗН, целый мозг)	4–5-недельные мыши с острой формой ЭМГ (серое вещество головного мозга)	4–5-месячные мыши с острой формой ЭМГ (целый мозг)	Мыши «Quaking» (целый мозг)
	i=3	i=3	i=4	i=5
16:0	27,1±0,8	27,3±0,8	26,7±0,6	27,8±0,5
16:1	1,0±0,5	<0,5	1,4±0,4	1,0±0,2
18:0	21,3±0,4	22,0±1,4	19,8±0,4	18,9±0,4
18:1	20,4±0,8	20,6±0,5	19,3±0,5	17,6±0,3
18:2	0,9±0,2	1,6±0,8	0,7±0,2	0,7±0,1
20:1	1,3±0,2	1,5±0,4	1,6±0,3	0,6±0,1
22:4 ω 6	9,5±0,3	9,6±0,6	9,9±0,5	10,3±0,5
22:4 ω 6	2,6±0,2	2,4±0,2	3,0±0,1	2,3±0,3
22:5 ω 6	0,5±0,3	3,5±1,1	1,6±0,2	1,0±0,1
22:6 ω 3	15,4±0,4	11,5±0,3	16,0±0,3	19,8±0,7

На основе анализа полученных данных можно сделать заключение, что во-первых, в липидах синапсом головного мозга мышей «Quaking» при повышенном содержании продуктов ПОЛ наблюдается более высокое содержание докозагексаеновой кислоты, по-видимому, имеющее компенсаторное значение и, во-вторых, в случае ЭМГ на фоне высокого уровня ПОЛ в липидах синапсом мозга мышей отмечается уменьшение содержания докозагексаеновой кислоты. Этот факт мог привести к изменению физико-химических свойств мембран синапсом и оказать влияние на развитие данного заболевания.

Авторы благодарят Г. В. Коновалова и А. Н. Ерина за полезные советы и замечания, а также М. П. Прозоровскую за оказанную помощь в измерении флуоресценции продуктов ПОЛ.

A COMPARATIVE STUDY OF LIPID PEROXIDATION PRODUCTS AND PHOSPHOLIPID FATTY ACID COMPOSITION IN MICE BRAIN SYNAPTOSOMES UNDER ACUTE VIRAL DEMYELINIZATION AND GENETIC DISMYELINIZATION

GORBUNOV N. V., ANNANEPESOV H. N.

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

In mice with encephalomyelitis caused by JHM corona virus accumulation of lipid peroxidation products and decrease in the amount of
294

dokozahexaenic fatty acid has been detected in the lipid extract of brain synaptosomes. In mice with dysmyelination of congenital origin ("Quaking" strain) accumulation of lipid peroxidation products is accompanied by increase in the amount of dokozahexaenic acid. Differences described are supposed to be due to the peculiarities of the pathological processes in the brain of animals studied.

ЛИТЕРАТУРА

1. Коновалов Г. В., Добыкина А. М. Архив патологии, т. 43, вып. II, с. 92—96, 1981.
2. Sidman R. L., Dickle M. M., Appel S. H. Science, v. 144, p. 309—311, 1964.
3. Rogrt R. B., Ritche J. M.—In: Myelin, № 9, p. 353—383, L., Plenum Press, 1977.
4. Аннаненцов Х. Н., Горбунов Н. В., Тюрин В. А. Докл. АН СССР, т. 274, № 5, с. 1242—1244, 1984.
5. Folch J., Lees M., Stanley G. H. S. J. Biol. Chem., v. 226, p. 497—509, 1957.
6. Vaskovsky V. E., Kostetsky E., Vasendin J. J. J. Chromatography, v. 114, p. 129—142, 1975.
7. Ерин А. Н., Прищепов Е. Д., Перелыгин В. В., Воробьев А. А. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол., № 2, с. 3—9, 1983.
8. Griffiths G. W. J. Cell Science, v. 36, p. 361—389, 1979.
9. Ланкин В. З.—В сб.: Биохимия липидов и их роль в обмене веществ. М., Наука, 1981.
10. Tappel A. L. Federat. Proc, v. 32, № 8, p. 1870—1874, 1973.
11. Меерсон Ф. З., Каган В. Е., Прилико Л. Л., Рожницкая И. И., Гибер Л. М., Козлов Ю. П. Бюл. эксперим. биол. и мед., № 10, с. 404—406, 1979.
12. Каган В. Е., Архипенко Ю. В., Козлов Ю. П. Биохимия, т. 48, вып. I, с. 158—166, 1983.
13. Nussbaum J. L., Neskevic N., Mardell P. J. Neurochem., v. 18, p. 1529—1543, 1973.
14. Maurin Y., Saux Le F., Escmann N.—In: Neurological Mutations Affecting Myelination. INSERM Symposium, v. 14, p. 523—530, 1980.
15. Прилико Л. Л., Каган В. Е., Тюрин В. А., Горбунов Н. В., Богданова Е. Докл. АН СССР, т. 296, № 5, с. 1260—1263, 1983.

Поступила 30. V 1984



КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 612.015+577.153

ВЛИЯНИЕ АММИАКА НА НЕКОТОРЫЕ ФЕРМЕНТЫ ЦИКЛА
МОЧЕВИНЫ И ОРНИТИН-АМИНОТРАНСФЕРАЗУ
ГОЛОВНОГО МОЗГА

СВАМИ М., ПРАСАД М. С. К., САДАСИВУДУ Б.

Центр нейробиохимии, Отдел биохимии Османского медицинского
колледжа, Хайдарабад, Индия

Установлено, что образование мочевины в головном мозгу обусловлено наличием значительной аргиназной активности [1, 2]. Однако из ферментов цикла мочевины в головном мозгу обнаружены только аргининосукцинат-синтетаза, аргининосукциназа и аргиназа. В норме образующийся в головном мозгу аммиак утилизируется за счет образования глутаминна [3]. Тот факт, что аммиак, образующийся в головном мозгу, не утилизируется в форме мочевины, затрудняет понимание метаболической и функциональной роли ферментов цикла мочевины в данном органе. Обнаруженный нами ранее параллелизм между распределением аргиназной и орнитин-аминотрансферазной активностей свидетельствует о том, что функция этих ферментов состоит, по-видимому, в образовании глутамата через орнитин [4, 5]. Роль глутамата в головном мозгу хорошо известна. Хотя механизм отравления мозговой ткани аммиаком не совсем ясен, считают, что психические нарушения, наблюдаемые у больных с печеночной комой, вызваны повышением уровня аммиака в головном мозгу. При отравлении аммиаком в головном мозгу наблюдаются изменения ряда параметров системы глутамата [6, 7], нейротрансмиттеров [8—10] и таких мембраносвязанных ферментов, как Na^+ , K^+ -АТРаза [6], γ -глутамилтранспептидаза [10]. Влияние аммиака на ферменты цикла мочевины мало изучено. Настоящее исследование посвящено изучению активности аргининосукцинат-синтетазы, аргининосукциназы, аргиназы и орнитин-аминотрансферазы в различных отделах головного мозга крыс при остром и хроническом отравлении аммиаком, что, на наш взгляд, позволяет подойти к пониманию не только метаболической значимости этих ферментов, но и их возможной детоксицирующей роли.

В работе использованы α -кетоглутарат (α -КГ) и L-аргинин-гидрохлорид (Höpkins and Williams, Англия), 2-аминобензальдегид („Fluka“, Швейцария), L-орнитин-296

гидрохлорид, L-цитруллин, L-аспарат, аргининосукцинат. АТР, аргиназа, пзонитро-зопрогофенон („Sigma“, США). Остальные реактивы—аналитической чистоты.

В экспериментах использовали крыс линии Albino обеих полов массой 150—200 г. Животные имели свободный доступ к пище и воде. Оправление аммиаком проводили по методу Bessman, Paul [11], как описано Sadasivudu и соавт. [10]. Острое отравление аммиаком вызывали внутрибрюшинным введением ацетата аммония (0,8 ммоль/100 г массы), после чего через 30 мин животное забивали. Хроническое отравление аммиаком вызывали 6-кратным внутрибрюшинным введением ацетата аммония (0,6 ммоль/100 г массы) с 1-часовым интервалом. Крыс декапитировали через 30 мин после последней инъекции. Контрольным животным вводили ацетат натрия. После декапитации быстро извлекали головной мозг и разделяли его на отдельные области, как описано Sadasivudu, Lajtha [12].

Активность орнитин-аминотрансферазы определяли по методу Jenkins, Tsai [13], активность аргиназы—по методу Herzfeld, Raper [15], как описано Rao и соавт. [14], активность аргининосукцииназы и аргининосукцинат-синтетазы—по методу Levin [17], как описано Sadasivudu, Indira Rao [5].

Полученные данные (таблица) свидетельствуют о том, что в норме аргиназная и аргинин-аминотрансферазная активности наиболее высокие в мозжечке (исследованы ствол мозга, кора больших полушарий и мозжечок). Аргининосукцинат-синтетазная активность одинакова во всех 3-х областях головного мозга, орнитинамиотрансферазная активность одинакова в стволе и коре больших полушарий и вдвое выше в мозжечке. Аргининосукцииназная активность минимальна в коре полушарий. Ни острое, ни хроническое отравление аммиаком не сопровождается существенными изменениями аргиназной и аргининосукцинат-синтетазной активностей во всех 3-х исследованных областях, тогда как аргининосукцииназная активность значительно снижается в мозжечке как при остром, так и при хроническом отравлении аммиаком. Орнитин-аминотрансферазная активность существенно не меняется в стволе мозга ни при остром, ни при хроническом отравлении аммиаком, однако значительно возрастает в мозжечке при хроническом, а в коре больших полушарий—при остром отравлении аммиаком.

Ранее нами было показано, что содержание аммиака в головном мозгу увеличивается вдвое при остром и в 4 раза при хроническом отравлении аммиаком при введении последнего по схеме, описанной Sadasivudu и соавт. [10]. Никаких изменений в поведении крыс с острым отравлением не было зарегистрировано, тогда как животные с хроническим отравлением аммиаком становились сонливыми. Поскольку аммиак в головном мозгу утилизируется в форме глутамина, изменения аргининосукцинат-синтетазной, аргининосукцииназной и аргиназной активностей при отравлении аммиаком, по-видимому, опосредованы метаболическими сдвигами, индуцированными накоплением аммиака в головном мозгу. Увеличение орнитин-аминотрансферазной активности в коре больших полушарий при остром отравлении аммиаком способствует усиленному образованию глутамата, нейтрализующего аммиак с образованием глутамина. Было обнаружено, что орнитин-аминотрансферазная активность наиболее высока в синапсоммах и глии [18, 19], ее увеличение в коре больших полушарий

Таблица

Активность аргиназы, орнитин-аминотрансферазы, аргининосукциназы и аргининосукцинат-синтетазы в различных отделах головного мозга крыс в норме и при остром и хроническом отравлении аммиаком (средние данные 6 опытов)

Ферменты	Ствол мозга отравление аммиаком			Мозжечок отравление аммиаком			Кора больших полушарий отравление аммиаком		
	норма	острое	хроническое	норма	острое	хроническое	норма	острое	хроническое
Аргиназа*	27,66 ±3,80	28,3*** ±2,8	27,6*** ±4,4	33,1 ±4,9	35,1*** ±4,9	32,0*** ±2,6	16,2 ±3,3	16,77*** ±3,30	16,51 ±1,60
Орнитин- трансфераза**	16,2 ±4,7	17,56*** ±3,30	15,9*** ±4,3	24,0 ±4,3	24,9*** ±4,4	14,5 ±3,8 p<0,001	14,4 ±4,4	28,35 ±5,60 p<0,001	17,6 ±4,7
Аргининосукци- наза*	1,42 ±0,29	1,01*** ±0,28	0,98*** ±0,30	1,57 ±0,16	0,80 ±0,13 p<0,001	0,77 ±0,20 p<0,001	0,91 ±0,17	0,86 ±0,17	0,74 ±0,25
Аргининосукци- нат-синтетаза*	2,60 ±0,31	2,36*** ±0,35	2,20*** ±0,32	2,30 ±0,42	2,0 ±0,37	1,9 ±0,4	2,90 ±0,26	2,80*** ±0,32	2,6 ±0,3

Примечание. * Активность выражена в ммоль мочевины/влажной ткани/ч

** Активность выражена в ммоль Δ-пирулин-5-карбоксилата/влажной ткани/ч

*** Во всех случаях, где не указано p, отклонения статистически недостоверны

рий приводило к приросту продукции глутамата в глутаматергических нервных окончаниях и глутамина в глиальных клетках, так как известно, что глутамин-синтетаза локализована в глиальных клетках [20]. Однако механизмы, обеспечивающие повышение этой ферментативной активности при остром отравлении аммиаком, неизвестны. Повышенное образование в синапсосамах коры больших полушарий глутамата—фактора возбуждения—может компенсировать депрессорный эффект аммиака. Наблюдаемое при хроническом отравлении аммиаком значительное снижение орнитин-аминотрансферазной активности в мозжечке может привести к понижению продукции глутамата в глутаматергических нервных окончаниях, чем объясняется наличие мозжечковой симптоматики при повышенных уровнях аммиака, так как глутамат считают нейромедиатором для мозжечка [21]. Механизм понижения аргининосукцинатной активности в мозжечке при остром и хроническом отравлении аммиаком неясен, но её снижение может привести к накоплению в мозжечке токсичного аргининосукцината [22], что усугубит отравление аммиаком.

EFFECT OF AMMONIA ON SOME ENZYMES OF UREA CYCLE AND ORNITHINE AMINOTRANSFERASE IN BRAIN

M. SWAMY, M. S. K. PRASAD and B. SADASIVUDU

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

The activities of argininosuccinate synthetase, argininosuccinase, arginase and ornithine aminotransferase were studied in different regions of the brain in rats subjected to acute and chronic ammonia toxicity. No significant changes were observed in argininosuccinate synthetase and in arginase in acute and in chronic ammonia toxicity. The argininosuccinase activity was found to be decreased in cerebellum in both acute and chronic ammonia toxicity, thus resulting in probable accumulation of argininosuccinate, a known toxic substance to brain. In acute ammonia toxicity increase in the activity of ornithine aminotransferase in cerebral cortex was observed while a decrease in the activity of this enzyme was found in cerebellum in chronic ammonia toxicity. Ornithine aminotransferase was earlier found to be high in synaptosomes and in glial cells. The changes in the activity of this enzyme were discussed in relation to production of glutamate in glutamatergic nerve endings both in cerebellum and cerebral cortex.

ЛИТЕРАТУРА

1. Spron M. B., Dingman, Defalco, Davies R. K. J. Neurochem., v. 5, p. 62—67, 1959
2. Bunatian H. Ch., Davitian M. A. J. Neurochem, v. 13, p. 743—753, 1966.
3. Berl S., Takagaki G., Clarke D. D., Waelsch H. J. Biol. Chem., v. 237, p. 2562—2569, 1962.
4. Sadasivudu B., Indira H. R. J. Neurochem., v. 23, p. 267—269, 1974.

5. Sadasivudu B., Indira Rao T. J. *Neurochem.*, v. 27, p. 785—794, 1976.
6. Sadasivudu B., Indira Rao T., Radha Krishnamurthy C. *Neurochem. Res.*, v. 2, p. 639—655, 1977.
7. Sadasivudu B., Indira Rao T., Radha Krishnamurthy C. *Arch. Int. Physiol. et Biochem.*, v. 87, p. 871—885, 1979.
8. Schanker S., McCandles D. W., Brophy E., & Lewis, MS. *J. Clin. Invest.*, v. 46, p. 838—848, 1967.
9. Sadasivudu B., Radha Krishnamurthy C. *Arch. Int. Physiol. et Biochem.*, v. 86, p. 67—82, 1977.
10. Sadasivudu B., Radha Krishnamurthy C., Rao G. N., Swamy M. *J. Neurosci. Res.*, v. 9, p. 127—134, 1983.
11. Bessman S. P., Paul N.—In: *The Ureacycle* (eds. Griosolia S. et al), p. 83—89, Wiley & Sons, New York, 1976.
12. Sadasivudu B., Lajtha A. *J. Neurochem.*, v. 17, p. 1299—1311, 1970.
13. Jankins T., Tsai H.—In: *Methods in Enzymology* (eds. Colowicka S. P., Caplan N. O.) v. 18, Part A. p. 231, Acad. Press, New York, 1970.
14. Rao G. N., Swamy M., Siva Reddy P., Sadasivudu B. *IRCS Med. Sci.*, v. 9, p. 395—396, 1981.
15. Herzfeld A., Raper S. M. *Biochem. J.*, 153, p. 469—478, 1976.
16. Wybenga D. R., DiGiorgio, Pileggi V. *J. Clin. Chem.* v. 17, p. 891—895, 1971.
17. Levin B.—In: *Advances in clinical chemistry* (Bodensky O., Latner A. L., eds), v. 14. p. 66, Acad. Press, New York, 1971.
18. Wong P. T. H., McGeer E. G., McGeer P. L. *J. Neurochem.*, v. 36, p. 501—505 1981.
19. Swamy M., Shrivastav K. P., Prasad M. S. K., Sadasivudu B. (Communicated to *J. Neuro Sci. Res.*).
20. Norenberg M. D. *Arch. Neurol.*, v. 33, p. 265—269, 1976.
21. Blass J. P.—In: *Chemisum of the Brain* (Rodinghat R., Bachelard H. S.; Stahl W. L., eds) p. 248—264, Church-Chill Livingston, New York, 1981.
22. Allan J. P., Cusworth D. C., Dent C. E., Wilson V. K. *Lancet*, v. 1, p. 182—187, 1958.

Поступила 11. X 1984



УДК 577.125.33.612.82

ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ И ОБМЕНА ФОСФОЛИПИДОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОТЕКЕ МОЗГА

КАРАГЕЗЯН К. Г., *САМВЕЛЯН В. М., ОВСЕПЯН Л. М.,
МАМАДЖАНЫН Л. З., ЗАХАРЯН Э. К.

Институт биохимии АН АрмССР, *Институт кардиологии им. Л. А. Оганесяна, Ереван

Отек головного мозга относится к числу наиболее распространенных и крайне тяжелых осложнений в клинике самых разнообразных заболеваний [1, 2]. В основе происходящих при этом метаболических изменений лежит, в первую очередь, нарушение структуры и функции нейромембран.

Одним из факторов, вызывающих нарушение фосфолипидного состава мембран, является развитие в них процесса перекисного окисления ненасыщенных жирных кислот, приводящее к увеличению количества перекисей и образованию в мембранах так называемых пор, что обуславливает значительное изменение проницаемости. Образование перекисей липидов регулируется каталитическими системами. Небелковая система перекисного окисления (аскорбатзависимая) включает в себя ионы металлов переменной валентности и использует в качестве восстановителя аскорбиновую кислоту. Она не проявляет чувствительности к нагреванию и сульфгидрильным ядам и представлена во всех субклеточных образованиях. Другая, так называемая ферментная система является характерной для эндоплазматического ретикулума, использует в качестве донора электронов восстановленный NADP и инактивируется нагреванием и п-хлормеркурибензоатом [3].

Задачей данной работы было изучение закономерностей качественного и количественного изменения спектра фосфолипидов в митохондриальной и микросомной фракции при одновременном исследовании колебаний интенсивности процесса перекисного окисления липидов в изученных субфракциях в норме и при экспериментальном отеке мозга.

Опыты ставили на беспородных белых крысах обоего пола, содержавшихся в стандартных условиях. Отек головного мозга воспроизводили внутрибрюшинным

введением дистиллированной воды в количестве, соответствующем 22% массы животного [4].

Митохондриальную и микросомную фракции головного мозга выделяли дифференциальным центрифугированием [5].

Фракционирование индивидуальных фосфолипидов проводили методом одномерной хроматографии в тонком слое силикагеля (марки КСК) с использованием системы растворителей: хлороформ—метанол—аммиак 65:35:5. Фосфолипидные пятна идентифицировали с помощью соответствующих свидетелей. Минерализацию липидного фосфора осуществляли в среде серной и азотной кислот с последующим расчетом количества P_i в мкг на 1 мг сухой массы [6]. Содержание гидроперекисей липидов определяли с помощью цветной реакции с тиоцианатом аммония при максимуме поглощения 480 нм [7]. Об активности перекисного окисления судили по содержанию малонового диальдегида, образующего с тиобарбитуровой кислотой окрашивание, интенсивность которого регистрировали спектрофотометрически при длине волны 535 нм [8]. Количество перекисей пересчитывали на 1 мг белка данной фракции [9].

Как показали результаты проведенных исследований (табл. 1), экспериментальный отек мозга сопровождается накоплением гидроперекисей и увеличением количества вторичного продукта перекисирования липидов—малонового диальдегида в микросомной фракции как в аскорбат, так и в НАДРН-зависимой системах перекисного окисления. Первичный механизм зарождения свободных радикалов при отеке мозга остается проблематичным, хотя из литературных данных известно, что развитие патологических процессов в мозговой ткани характеризуется определенным стимулированием реакций радикалообразования [10]. Показано, что основное количество свободных радикалов образуется во фракции фосфолипидов, особенно при возбужденных состояниях [11].

Исследование перекисного окисления липидов в митохондриях интактных животных позволило обнаружить определенный стационарный уровень перекисей. По всей вероятности, последние отражают степень подверженности митохондриальных липидов воздействию молекулярного кислорода в условиях нормально протекающих метаболических процессов при возможном участии гемопротендов как катализаторов реакций перекисного окисления.

Как было отмечено выше, перекисное окисление липидов затрагивает фосфолипидные компоненты клетки. Исходя из этого, интересно было проследить за качественным и количественным содержанием фосфолипидов при экспериментальном отеке мозга. Результаты наших исследований (табл. 2) показали, что общее содержание фосфолипидов в микросомной фракции мозгового вещества равно 16,08 мкг P_i /мг сухой фракции, а в митохондриальной—12,99. Экспериментальный отек мозга сопровождается уменьшением количества фосфатидилхолинов, фосфатидилэтаноламинов, фосфатидилсеринов при параллельном увеличении уровня монофосфоинозитидов, лизолецитинов в микросомной фракции. Отмеченное нами уменьшение фосфатидилхолина согласуется с литературными данными, в которых показано резкое падение содержания в мозгу фосфатидилхолина в области максимально выраженного отека [12]. Изучение фосфолипидного состава митохондриальной

Таблица 1.

Содержание гидроперекисей и перекисей в митохондриальной и микросомной фракциях при экспериментальном отеке мозга

Условия опыта	Митохондриальная фракция				Микросомная фракция			
	контроль		отек		контроль		отек	
Тип переокисления	НФП	ФП	НФП	ФП	НФП	ФП	НФП	ФП
Гидроперекиси (E_{480} /мг белка)	$0,183 \pm 0,012$	$0,168 \pm 0,02$	$0,243 \pm 0,015$ $p < 0,001$	$0,200 \pm 0,018$ $p < 0,01$	$0,240 \pm 0,033$	$0,184 \pm 0,018$	$0,332 \pm 0,026$ $p < 0,001$	$0,386 \pm 0,014$ $p < 0,001$
Перекиси (нмоль малонового диальдегида/мг белка)	$10,35 \pm 1,02$	$6,55 \pm 0,83$	$18,23 \pm 1,12$ $p < 0,001$	$7,18 \pm 1,04$ $p < 0,5$	$12,28 \pm 1,35$	$7,33 \pm 1,08$	$22,28 \pm 1,53$ $p < 0,001$	$13,48 \pm 1,06$ $p < 0,001$

Примечание. НФП—неферментативное аскорбатзависимое переокисление; ФП—ферментативное зависимое переокисление. $n=10$.

фракции при экспериментальном отеке позволило обнаружить распад фосфатидилэтаноламинов, монофосфоннозитидфосфатидов, кардиолипинов и увеличение лизофосфатидилхолинов и фосфатидилсерпинов. Заслуживает внимания факт уменьшения кардиолипинов в митохондриальной фракции. Кардиолипины являются маркерными фосфолипидами митохондрий и играют важную роль в функционировании электронпереносящих систем, и если фосфатидилхолины и фосфатидилэтаноламины сравнительно легко вычлениаются из состава оксидо-

Таблица 2

Содержание фосфолипидов (в мкг Р_i/мг сухой фракции) в митохондриальной и микросомной фракциях головного мозга крыс в норме и при экспериментальном отеке (n=5)

Фракции фосфолипидов	Митохондриальная фракция		Микросомная фракция	
	контроль	отек	контроль	отек
Неидентифицированный фосфолипид	0,248±0,033	0,222±0,028 p>0,1	0,490±0,03	0,533±0,02 p>0,05
Лизофосфатидилхолины	0,637±0,021	0,992±0,033 p<0,001	0,832±0,012	2,09±0,1 p<0,001
Монофосфоннозитидфосфатиды	0,553±0,04	0,328±0,024 p<0,001	0,619±0,06	0,922±0,08 p<0,05
Сфингомиелины	1,09±0,068	1,20±0,053 p>0,5	2,98±0,07	2,84±0,077 p>0,1
Фосфатидилхолины	4,53±0,083	4,03±0,067 p<0,001	5,04±0,063	2,94±0,058 p<0,001
Фосфатидилсерпины	1,90±0,034	2,5±0,023 p<0,001	2,76±0,07	1,81±0,05 p<0,001
Фосфатидилэтаноламины	3,08±0,076	2,46±0,055 p<0,001	3,28±0,05	2,21±0,06 p<0,001
Кардиолипины	0,960±0,043	0,685±0,037 p<0,001	0,082±0,016	0,086±0,02 p>0,1
Суммарные фосфолипиды	12,99	12,21	16,08	13,42

редуктаз митохондрий, то кардиолипины, напротив, оказываются прочно связанными с ними и не удаляются под воздействием даже сильных органических растворителей [13, 14]. По нашим данным, при экспериментальном отеке мозга наблюдается увеличение лизофосфатидилхолинов в митохондриальной и микросомной фракциях мозга. В работах ряда авторов обнаружено, что свободные жирные кислоты и продукты их окисления, а также лизофосфолипиды способны повышать проницаемость митохондриальной мембраны для катионов. Показано, что увеличение лизоформ фосфолипидов приводит к повышению проницаемости мембраны для ионов кальция и первичные продукты перекисного окисления—гидроперекиси являются их переносчиками [15]. Увеличение количества лизоформ фосфатидов может быть связано, с одной стороны, с повышением активности фосфолипазы А₂, с другой—с активированием процесса перекисного окисления липидов.

LIPID PEROXIDATION AND METABOLISM OF PHOSPHOLIPIDS IN EXPERIMENTAL CEREBRAL EDEMA

KARAGEZYAN K. G., *SAMVELYAN W. M., OVSEPYAN L. M.,
MAMADZHANYAN L. Z., ZAKHARYAN E. K.

Institute of Biochemistry, Armenian SSR Academy of Sciences, *L. A. Oganessian
Institute of Cardiology, Yerevan

Phospholipid spectrum and lipid peroxidation in mitochondrial and microsomal fractions has been studied in rat brain tissue during experimental cerebral edema. It is certain, that the experimental cerebral edema is accompanied by decrease in phosphatidylcholines, phosphatidylserines, phosphatidylethanolamines in microsomal fractions. In mitochondrial fraction we've discovered decrease of phosphatidylethanolamines, and cardiolipins and increase of lisophosphatidylcholines and phosphatidylserins. At the same time accumulation of hydroperoxides and peroxides has been detected in both mitochondrial and microsomal fractions with experimental cerebral edema.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Квитницкий-Рыжов Ю. Н. Отек и набухание головного мозга (под ред. А. М. Гурвича), Киев, Здоровье, 1978.
2. Бакай Л., Ли Д. Отек мозга (под ред. Э. И. Канделя), М., Медицина, 1969.
3. Суслова Т. Б., Владимиров Ю. А.—В кн.: Биологические мембраны (под ред. П. В. Сергеева), с. 75—94, М., Медицина, 1973.
4. Самвелян В. М. Экспериментальная терапия отека головного мозга (под ред. Л. А. Матиняна), Ереван, Айастан, 1981.
5. Крепс Е. М., Красильникова В. И., Патрикаева М. В. Журн. эволюц. биохимии и физиологии, т. 4, с. 211—243, 1968.
6. Зубер В. Л.—В кн.: Методы биохимических исследований (под ред. М. Н. Прохоровой), с. 73—77, Л., ЛГУ, 1982.
7. Романова Л. А., Стальная И. Д.—В кн.: Современные методы в биохимии (под ред. В. Н. Ореховича), с. 64—66, М., Медицина, 1977.
8. Владимиров Н. А., Арчаков А. И.—В кн.: Перекисное окисление липидов в биологических мембранах (под ред. Г. М. Франка), с. 241—243, М., Наука, 1972.
9. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Tarr A. L., Randall R. J., J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
10. Blok M. C., Wlits K. W. A., Scherphof G. L. Biochim. et biophys. acta, v. 233, p. 61—75, 1971.
11. Вагин Ю. Е., Кондратов В. Е., Бурлакова Е. Б.—В кн.: Биоантиокислители (под ред. И. И. Иванова), с. 65—68, М., Наука, 1975.
12. Ishii S., Hainer R., Kelly W. A., Evans J. P. J. Neurosurg, v. 16, p. 152—166, 1960.
13. Awasthi J. C., Chuang T., Kecnan T., Grane T. L. Biochim. et biophys. acta v. 1, p. 226—230, 1971.
14. Berezhey R., Awasthi J. C., Graine T. L. Bioenergetic., v. 1, p. 457—462, 1970.
15. Архипенко Ю. В., Каган В. Е., Козлов Ю. П. Биохимия, т. 48, с. 433—441, 1983.

Поступила 6. IV 1985



УДК 612.015:547.953:616.005.4

МЕТАБОЛИЗМ ПОЛИФОСФОИНОЗИТИДОВ МОЗГА
ПРИ ЕГО ИШЕМИИ

ТЮЛЬКОВА Е. И., ПАВЛИНОВА Л. И.

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

Нарушение мозгового кровообращения вызывает ряд изменений метаболизма нервной ткани, выраженность которых зависит от степени и длительности ишемизации мозга. Перевязка общих сонных артерий, приводящая к неполной ишемии головного мозга, вызывает значительное снижение интенсивности обмена фосфолипидов больших полушарий, тогда как содержание их практически не меняется [1]. В отличие от общих фосфолипидов полифосфонозитиды (ПФИ), являясь минорным компонентом биологических мембран, характеризуются более высокой метаболической активностью [2]. Ишемия головного мозга у собак приводит к резкому снижению содержания ди- и трифосфонозитидов (ДФИ и ТФИ) в первые 3 мин после перевязки сонных артерий [3].

В данной работе исследовали содержание и интенсивность обмена фосфатных групп ПФИ больших полушарий головного мозга крыс в разные сроки неполной ишемии, вызванной перевязкой общих сонных артерий.

Были использованы белые крысы линии Вистар массой 200—220 г. Неполная ишемия головного мозга достигалась одномоментным наложением лигатур на общие сонные артерии. Для изучения интенсивности обмена ПФИ крысам внутривенно вводили радиоактивный ортофосфат натрия. Животных декапитировали через 10, 30, 60, 90, 120, 240 и 300 мин после наложения лигатур. Ложнооперированные крысы служили контролем. Большие полушария быстро извлекали, растирали в ступке со смесью хлороформа и метанола (1:9). ПФИ экстрагировали подкисленной смесью хлороформа и метанола по методике, описанной Киселевым [4]. Фосфонозитиды разделяли на фракции хроматографией на обработанной формальном бумаге. Пятна, соответствующие отдельным фракциям, вырезали и помещали в сцинтилляционный счетчик, где измеряли интенсивность излучения ^{32}P , в них же после минерализации определяли количество фосфата. Интенсивность обмена фосфатных групп рассчитывали по отношению величины УР ДФИ или ТФИ к величине УР фосфата.

Данные по изменению содержания ДФИ и ТФИ в различные сроки ишемии представлены в таблице. В первые 10 мин ишемии об-

Таблица

Содержание полифосфонозитидов в различные сроки ишемии (в мкг фосфат/г сырой массы ткани)

Вещество	Статистический показатель	Контроль	И ш е м и я (мин)							
			5	10	30	60	90	120	240	300
Трифосфонозитид	п	85	6	12	20	18	13	20		6
	$\bar{X} \pm S$	$33,9 \pm 0,07$	$39,2 \pm 1,0$	$43,3 \pm 1,9$	$36,4 \pm 1,3$	$32,8 \pm 1,2$	$25,8 \pm 1,3$	$25,2 \pm 1,3$		$28,7 \pm 3,1$
	% к контролю		115,6	127,7	107,4	96,8	76,1	74,3		84,7
	p		<0,01	<0,01	<0,1		<0,01	<0,01		>0,1
Дифосфонозитид	п	78	6	12	20	12	12	12	7	8
	$\bar{X} \pm S$	$22,3 \pm 0,5$	$25,5 \pm 1,6$	$27,0 \pm 1,1$	$22,9 \pm 0,7$	$20,5 \pm 0,8$	$20,6 \pm 0,8$	$17,7 \pm 0,7$	$19,8 \pm 1,1$	$20,1 \pm 1,7$
	% к контролю		114,3	121,1	102,7	91,9	92,4	79,4	88,8	90,1
	p		<0,1	<0,01		<0,1	<0,1	<0,01	<0,1	>0,1

наружено значительное увеличение содержания ДФИ от 22,3 до 27,0 мкг фосфата/г ткани, что превышает 21%. Содержание ТФИ возрастало от 35,4 до 43,3 мкг фосфата/г ткани, что соответствует повышению на 27,7%. В период 30-минутной ишемии содержание ПФИ достигало контрольного уровня, а дальнейшая ишемия (60—300 мин) приводила к стабильному снижению содержания ДФИ на 10—15% и ТФИ на 25%. Содержание фосфатидилинозитидов в исследованные сроки ишемии практически не отличалось от их содержания в ткани мозга ложнооперированных животных. Как показано на рисунке, во все изученные сроки ишемии интенсивность обмена ДФИ и ТФИ снижена на 15—30%.

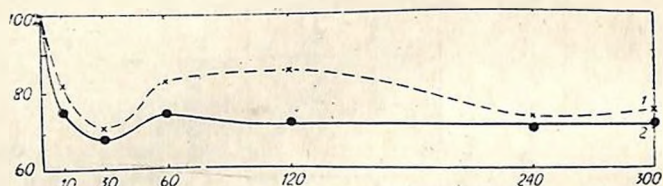


Рис. Изменения ОУР ди- и трифосфоинозитидов (в %) в различные сроки (мин) после перевязки общих сонных артерий. 1—дифосфоинозитиды, 2—трифосфоинозитиды

В течение первого часа ишемии происходит резкая перестройка метаболизма всех внутриклеточных процессов. Это касается как динамики мозгового кровоснабжения, так и химических реакций, протекающих в нервных клетках. Наблюдается резкое снижение содержания высокоэнергетических фосфатов при значительном накоплении продуктов гликолиза [5—8]. Обнаружено также резкое возрастание содержания сАМР в первые минуты ишемии головного мозга с последующим снижением [7]. Наряду с уменьшением интенсивности обмена в период 10-минутной ишемии установлено увеличение содержания ПФИ (таблица). В настоящее время обсуждается возможное участие ПФИ, связанных с фосфопротеинами, в синаптической передаче, регулируемой сАМР [9, 10]. С другой стороны, среди факторов, влияющих на уровень кровоснабжения мозга, определенную роль играют ионы кальция [11]. ПФИ, обладая анионными фосфатными группами, имеют высокое сродство к двухвалентным катионам [12], и возрастание их содержания может повышать количество связанного с мембранами кальция. Стабилизация функциональной и метаболической активности мозга в период 1—5 ч ишемии с установлением и поддержанием её на качественно новом уровне отражается в снижении метаболизма ПФИ, что свидетельствует о формировании каких-то устойчивых регуляторных механизмов.

METABOLISM OF BRAIN POLYPHOSPHOINOSITIDES IN ISCHEMIA

TULKOVA E. I., PAVLINOVA L. I.

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

Arteria carotis ligation-induced rat brain ischemia leads to the considerable increase in di- and triphosphoinositide content in big hemispheres during first 10 min. During next 20 min of ischemia the content of these phospholipids is back to the normal level and then decreases for 15–20% remaining at this level until 300 min of ischemia. At all time periods studied intensivity of polyphosphoinositide metabolism was considerably diminished.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Гастева С. В., Замуруев О. Н. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. XXXIV, № 11, с. 539–541, 1977.
2. Дворкин В. Я., Четвериков Д. А. Успехи соврем. биол., т. 70, № 3, с. 397–412, 1970.
3. Birnberger A. C., Eliasson S. G. Neurology, v. 20, № 4, p. 356–360, 1970.
4. Киселев Г. В. Биохимия, т. 43, № 7, с. 1328–1334, 1978.
5. Хаитова Е. М., Мартынов Н. В.—В кн.: Метаболизм острой гипоксии, с. 55–62, Горький, 1977.
6. Abel M. S., Mc Candless D. W. Neurochem. Res., v. 7, № 7, p. 789–797, 1982.
7. Lust W. D., Kobayash M., Mrsulja B. B., Wheaton A., Passonneau J. V.—In: Advances in experimental medicine and biology (Reivich M. et al. eds), v. 78, p. 287–298, Plenum Press, N. Y.—L, 1977.
8. Mabe H., Blomquist P., Siesjö B. K. J. Cerebral Blood Flow and Metabolism v. 3, № 1, p. 109–114, 1983.
9. Mitchell R. H. Trends in Biochem. Sci., v. 4, № 2, p. 282–285, 1979.
10. Wiegant V. M., Zwiers H., Gispen W. H. Pharmacol. and Ther., v. 12, № 3, p. 463–490, 1981.
11. Evans M. C., Linton R. A., Cameron I. J.—In: Cerebral Blood Flow and Metabolism (Ingvar D., Lassen N., eds), p. 358–389, Copenhagen, 1977.
12. Hendrickson H. S., Reinerisen J. L. Biochemistry, v. 8, № 12, p. 4855–4858, 1969.

Поступила 11. II 1985.



УДК 616.831—005.1—07:616.832.9—008.931:517.152.342

**АКТИВНОСТЬ γ -ГЛУТАМИЛТРАНСФЕРАЗЫ В
СПИННОМОЗГОВОЙ ЖИДКОСТИ БОЛЬНЫХ С ОСТРЫМИ
НАРУШЕНИЯМИ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ*****ЗИНЧЕНКО В. А., СЫТИНСКИЙ И. А.**

Институт физической культуры им. П. Ф. Лесгафта, Ленинград

*Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова

Установление характера мозгового инсульта в его острейшем периоде и при тяжелом состоянии больных связано с определенной трудностью, обусловленной схожестью в некоторых случаях клинической картины геморрагического и ишемического инсультов, атипичным течением процесса и отсутствием крови в СМЖ, когда очаг кровоизлияния не сразу связывается с ликворопроводящими путями. При инсультах повреждается ГЭБ и изменяются биохимические процессы в ЦНС, связанные с его функциональной деятельностью. Показателем нарушения может быть обнаружение в СМЖ активности γ -глутамилтрансферазы—ГГТФ (КФ. 2.3.2.2), которая является ключевым ферментом в мембранах нервных клеток и участвует в транспорте аминокислот через клеточные мембраны [1—3]. Исследования по определению активности ГГТФ в СМЖ в литературе не описаны за исключением нашего предварительного сообщения [4].

Было обследовано 144 больных с острыми нарушениями мозгового кровообращения в возрасте от 30 до 86 лет. У 96 лиц (66,6%) был зафиксирован ишемический инсульт, причем у 85% из них в каротидном бассейне, преимущественно в левой средней мозговой артерии. У 48 больных (33,4%) отмечался геморрагический инсульт. Клиническая картина определялась характером инсульта и локализацией процесса. Спинномозговую пункцию проводили всем больным: в первые трое суток от начала инсульта у 103, на 4-6—у 26, после 6 дней—у 15 человек. У 13 больных ликвор исследовался повторно. В 64 случаях клинико-лабораторные исследования сопоставлялись с патологоанатомическими данными. Контрольную группу составили 9 больных с начальными проявлениями церебрального атеросклероза без очаговой неврологической симптоматики и 11 детей в возрасте до 14 лет, поступивших в клинику с подозрением на острую нейронинфекцию, у которых при комплексном обследовании данных, указывающих на поражение ЦНС, выявлено не было.

Активность ГГТФ в СМЖ определяли по методу, основанному на расщеплении субстрата— γ -глутамил-п-нитроанилина и переносе γ -глутамилового остатка на ак-

центорный дипептид глицил-глицин, который одновременно служил буфером реакции [5]. После остановки ферментативной реакции 10%-ной CH_3COOH образующийся п-нитроанилин определяли при 410 мμ на спектрофотометре СФ-4А. Активность ГГТФ выражали в ммоль/с. л.

У больных с ишемическим инсультом, как правило, не отмечалось повышенного давления СМЖ, за исключением случаев, протекавших со значительным отеком мозга. У большинства больных СМЖ была прозрачной, у 8 человек в ней обнаруживалась примесь крови со свежими эритроцитами. В некоторых случаях отмечали небольшое повышение содержания белка.

У больных с геморрагическим инсультом часто отмечалось повышенное давление СМЖ, которая имела примесь крови. Почти у четверти больных в первые сутки после кровоизлияния в СМЖ крови не обнаруживали, так как очаг геморрагии не успевал связаться с ликворными путями. Таким образом, прозрачная СМЖ у больных в первые часы-сутки после инсульта не исключает его геморрагического характера.

Таблица

Активность γ-глутамилтрансферазы (ГГТФ) в СМЖ больных с острыми нарушениями мозгового кровообращения

Вид инсульта	Активность ГГТФ в СМЖ (ммоль/с. л.)		
	очень тяжелый	тяжелый	средней тяжести
Геморрагический	$0,152 \pm 0,01$ n=18	$0,087 \pm 0,005$ n=19	$0,04 \pm 0,001$ n=11
Ишемический	$0,026 \pm 0,001$ n=27	$0,017 \pm 0,005$ n=47	$0,01 \pm 0,005$ n=22

Примечание. n—количество наблюдений

У больных контрольной группы активность ГГТФ в ликворе либо не выявлялась, либо ее показатель не превышал 0,005 ммоль/с. л. В ликворе детей активность ГГТФ также не обнаруживалась, что соответствует литературным данным [6—8]. Среднестатистические показатели активности ГГТФ в СМЖ у больных с геморрагическим инсультом составили $0,11 \pm 0,22$ ммоль/с. л., а с ишемическим—в 5,5 раза меньше— $0,02 \pm 0,005$ ммоль/с. л. Максимальная активность отмечалась при геморрагическом инсульте в первые часы-сутки после начала заболевания, при ишемическом—на 2-3 сутки. Кроме того, показатели активности фермента зависели от тяжести инсульта (таблица). При очень тяжелом течении активность ГГТФ существенно возрастала. При резко выраженных общемозговых и локальных симптомах поражения ЦНС активность фермента была ниже. При благоприятном течении заболевания уровень ГГТФ в СМЖ отчетливо снижался, в то время как у больных с прогрессирующим течением и летальным исходом возрастал в 1,5-2 раза ($0,29 \pm 0,1$ ммоль/с. л.).

При сравнении результатов исследования СМЖ с данными патолого-анатомического вскрытия была установлена зависимость изменения активности ГГТФ от характера очаговых изменений в головном мозгу, размеров и удаленности от ликворопроводящих путей. В большинстве случаев ферментативная активность повышалась в первые часы-сутки вследствие структурных повреждений нервных образований, возникших вблизи желудочков мозга и субарахноидальных пространств. В 6 случаях глубинного расположения очагов повреждения активность фермента достигала среднестатистических показателей на 2-3 сутки. В 4 случаях смешанного инсульта величина активности ГГТФ в СМЖ занимала промежуточное место между таковыми показателями при ишемии и кровоизлиянии.

Механизм повышения активности ГГТФ в СМЖ у больных с острыми нарушениями мозгового кровообращения пока еще не ясен. В патогенезе этого заболевания существенную роль имеют структурные повреждения вещества мозга, сопровождающиеся нарушением гемо- и ликвородинамики. Сдвиг в активности ГГТФ в СМЖ, по-видимому, обусловлен не только выходом фермента из функционально поврежденных нервных клеток вследствие изменения их метаболизма, но и из нервных структур очага некроза вследствие нарушения мембранной проницаемости. Существенное значение имеет и нарушение функций ЭББ при инсультах.

Данные проведенных исследований позволяют рекомендовать определение активности ГГТФ в СМЖ как дополнительный тест для дифференциальной диагностики геморрагического и ишемического инсультов, а также для прогнозирования исхода заболевания.

ACTIVITY OF GAMMA-GLUTAMYLTRANSFERASE (GGTF) IN CEREBROSPINAL FLUID OF PATIENTS WITH ACUTE DISTURBANCES OF CEREBRAL BLOOD CIRCULATION

*ZINCHENKO V. A., SYTINSKY I. A.

P. F. Lesgaft Institute of Physical Education and S. M. Kirov Military Medical Academy*, Leningrad

The activity of GGTF (EC 2.3.2.2.), that is detected in cerebral tissue but usually not present or present only to a slight extent in cerebrospinal fluid (CSF) of adults and children, was measured in CSF of 144 patients with acute disturbances of cerebral blood circulation. GGTF activity in these patients appears to depend on the nature of the pathologic process (whether ischemic or hemorrhagic) and on the acuteness and severity of the disease. Thus, GGTF activity in CSF of patients with hemorrhagic insults was 6-fold higher compared to patients with ischemic insults. Deterioration during the course of insults till the fatal termination is followed by a marked augmentation of the GGTF activity

in CSF (300,0—400,0 units— μ mol p-nitroaniline/min). GGTF activity in CSF may serve as an additional test for the differential diagnosis between ischemic and hemorrhagic insults and for the prognosis.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Mrister A., Tate S. S.* *Ann. Rev. Bioch.*, v. 45, p. 559—604, 1976.
2. *Горленко В. А., Филипович Ю. Л.* *Успехи соврем. биол.* 86, с. 367—386, 1979.
3. *Логинов В. А., Чернов Н. Н., Березов Т. Т.* *Вопр. мед. химии*, т. 28, с. 2—10, 1982.
4. *Зинченко В. А., Батунир Л. С., Сомова Т. В., Сытинский Н. А.* *Лаб. дело*, т. 6, с. 51—52, 1983.
5. *Кулаганек В., Димов Д.* Клиническое значение определения активности гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТП). Био-Ла-Тест. Чехословакия, 1971.
6. *Ролле М. Н.* Применение пиридитола и пантогама при менингитах у детей. Автореф. канд. дисс. Л., 1980.
7. *Ролле М. Н., Сытинский Н. А., Флерова Н. И.*—В кн.: IV Всесоюзн. биохим. съезд. Тезисы научн. сообщений, с. 244, М., 1979.
8. *Ролле М. Н., Сытинский Н. А., Флерова Н. И.*—В кн.: Тезисы III Всесоюзн. симпозиума по мед. энзимологии, с. 124, Астрахань, 1979.

Поступила 11. IV 1985



ГОМОКАРНОЗИН: МЕТАБОЛИЗМ И ФУНКЦИИ

КРИЧЕВСКАЯ А. А., БОНДАРЕНКО Т. И., МАКЛЕЦОВА М. Г.

Кафедра биохимии Ростовского госуниверситета им. М. А. Суслова

В обзоре представлены литературные и собственные данные авторов о структуре, свойствах, метаболизме и биологической роли нейроспецифического пептида гомокарнозина. Показано, что гомокарнозин обладает некоторыми свойствами нейромедиатора и участвует в регуляции процессов торможения и возбуждения.

Аминокислотам с их широкой химической полифункциональностью принадлежит особая роль в ЦНС позвоночных животных. В настоящее время большинством исследователей признано, что глутаминовая и аспарагиновая кислоты, а также ГАМК и глицин, наряду с производными тирозина и триптофана—норадреналином, адреналином и серотонином, являются медиаторами нервной системы. В последние десятилетия установлено, что в организме присутствуют также специфические олигопептиды, большая часть которых образуется в структурах головного мозга и выполняет важнейшие регуляторные функции. В мозгу присутствует обширная группа специфических γ -глутамиловых дипептидов, ацетил-аспартил-глутамат. В организме животных обнаружены гистидинсодержащие дипептиды. Эта группа пептидов в мозгу представлена карнозином, ансерином, гомокарнозином, гомоансерином. Карнозин и ансерин присутствуют не только в мозгу, но в значительно больших количествах в скелетных мышцах млекопитающих и птиц, однако отсутствуют в сердечной мышце.

Особый интерес представляет специфический для мозга гомокарнозин. Функции его изучены еще недостаточно. Однако весь имеющийся в литературе материал свидетельствует о его важнейшем значении в формировании физиологических функций ЦНС.

Структура и свойства гомокарнозина

Гомокарнозин впервые был выделен из мозга быка в 1961 г. [1], и тогда же был осуществлен его химический синтез [2]. Позднее гомокарнозин из бычьего мозга получили в кристаллическом виде. Его физико-химические характеристики — t° плавления, $[\alpha]^{20}_D$, элементарный состав совпали с таковыми синтетического препарата [3].

В свойства гомокарнозина и его биологическую активность вносят вклад как имидазольное кольцо остатка гистидина, так и ГАМК. В молекуле гомокарнозина возможно образование внутримолекулярных водородных связей за счет NH_2 -группы остатка ГАМК, карбоксила остатка гистидина и атомов азота имидазольного цикла. Вероятно, благодаря этому образуется изогнутая структура молекулы, что позволяет предположить существование рецепторов, способных специфически связываться с гомокарнозином. Однако они не относятся к ГАМК-рецепторам или сходным с ними структурам. Установлено, что несмотря на структурное сходство гомокарнозина с ГАМК, его родство с ГАМК-рецепторами составляет только 2% по сравнению с ГАМК [4]. Можно предположить, что высокая биологическая активность гомокарнозина в большей степени определяется уникальными свойствами имидазольного цикла остатка гистидина, которые так выпукло выявляются в активных центрах ферментов [5]. В то же время возможно и кооперативное действие двух частей дипептидной молекулы гомокарнозина. Для гистамина, например, доказано, что взаимодействие с рецепторами осуществляется с участием концевой аминогруппы боковой цепи [6, 7].

Распределение гомокарнозина в отделах головного мозга

Гомокарнозин обнаружен в мозгу млекопитающих, птиц, амфибий; в мозгу рыб его нет [8, 9]. Содержание гомокарнозина в головном мозгу млекопитающих сильно варьирует: его количество в нмоль/г ткани составляет в мозгу кошек и собак до 5; в мозгу морских свинок—59, крыс—67, мышей—89, кроликов—179, обезьян—311. Наиболее высокое содержание гомокарнозина оказалось в мозгу человека, оно варьирует в разных структурах мозга от 240 до 1550 нмоль/г ткани [10].

Гомокарнозин неравномерно распределен в структурах мозга. В мозгу человека, по данным аутопсии, наибольшее его содержание в путамене, бледном шаре и коре затылочной области (900—1100 нмоль/г), меньше его содержание в мозолистом теле и хвостатом ядре [11], а в зубчатом ядре в 6 раз выше, чем в хвостатом [10]. В коре больших полушарий головного мозга, гиппокампе и полосатом теле мозга морских свинок содержание гомокарнозина в 4 раза выше, чем в мозжечке [12]. У крыс в филогенетически более старых отделах мозга содержание гомокарнозина в 5 раз выше, чем в больших полушариях [13, 14]. У кроликов в стволовой части мозга концентрация гомокарнозина выше, чем в больших полушариях [15].

По нашим данным, у взрослых кроликов в больших полушариях головного мозга содержится гомокарнозина (в нмоль/г) $266,2 \pm 9,9$, в среднем и промежуточном мозгу— $351,0 \pm 16,4$, в продолговатом мозгу— $253,9 \pm 14,9$ и в мозжечке— $353,8 \pm 24,1$.

Субстратами синтеза гомокарнозина в мозгу служат гистидин и ГАМК. Содержание гистидина в мозгу взрослых животных составляет 60—150 нмоль/г [12]. Основным источником этой аминокислоты в мозгу является гистидин крови, который используется в синтезе белков и некоторых специфических соединений. Гистидин входит в состав не только гомокарнозина, но и других гистидинсодержащих пептидов— карнозина, ансерина и гомоансерина [9]. Декарбоксилирование гистидина приводит к образованию гистамина [16].

В мозгу ГАМК содержится в количестве около 3 мкмоль/г. Основным ее источником в мозгу является реакция декарбоксилирования глутамата. Эта реакция, а также метаболизм и функции ГАМК в мозгу достаточно хорошо изучены [14, 18]. В то же время развивается представление о том, что пул ГАМК для синтеза гомокарнозина в мозгу черпается из реакций превращения путресцина [19]. Таким образом он может быть связан и с превращением аргинина. В мозгу имеется активная аргиназа, которая превращает аргинин в орнитин и мочевину. Орнитин превращается в путресцин с участием орнитиндекарбоксилазы, активность которой лимитирует этот процесс. Установлено, что в синапсах мозга меченый орнитин быстро превращается в ГАМК. Интенсивность образования ее из орнитина выше, чем из глутамата [20]. Наличие этого пути образования ГАМК, не связанного с декарбоксилированием глутамата, обнаружено также в сетчатке глаза, культуре клеток нейробластомы и глиомы и в печени [21—23]. Существует два пути синтеза ГАМК из путресцина (схема) [24]. Первый из них—окислительное дезаминирование путресцина до аминокбутиральдегида с последующим окислением в ГАМК. Второй путь включает стадию ацетилирования путресцина с участием CoAsAc и образованием ацетилпутресцина. Далее ацетилпутресцин превращается в ацетил-ГАМК, которая затем деацетилируется. После введения меченого ^{14}C -путресцина была обнаружена корреляция между убылью путресцина и образованием гомокарнозина в мозгу [20]. Образование ГАМК из путресцина в мозгу выпяливает и крыс наиболее активно протекает на ранних стадиях онтогенеза, когда начинается формирование синапсов [25]. Путресцин является существенным компонентом нервной ткани, так как с него начинается путь синтеза полиаминов.

Синтез гомокарнозина катализируется ферментом гомокарнозин-карнозинсинтетазой (КФ 6.3.2.11), которая впервые была выделена в 1973 году из мозга крыс [26]. Этот фермент содержится в цитоплазме и наибольшей активностью обладает при pH 7,4. Для проявления его активности требуется присутствие Mg^{2+} , АТР и NAD. АТР может быть заменена другими нуклеозидтрифосфатами. Замена NAD аналогами неэффективна, что предполагает его специфическую каталитическую роль. Количество синтезированного гомокарнозина и гидро-

лизованной АТР эквимолярно, тогда как в этой же реакции отношение образованного гомокарнозина и использованного NAD соответствует 1:6 [26]. Гомокарнозин-карнозинсинтетаза является ферментом, содержащим SH-группы, необходимые для проявления его активности [14]. Наиболее высокая активность фермента была обнаружена в пу-тамене, бледном ядре, черной субстанции, обонятельных луковицах и спинном мозгу.

До сих пор нет единого мнения о существовании отдельных специфических ферментов синтеза гомокарнозина и карнозина в мозгу. Многочисленные исследователи доказывают существование единой гомокарнозин-карнозинсинтетазы, которая катализирует синтез обоих дипептидов [10, 14]. Это подтверждается включением ^{14}C - β -аланина и ^{14}C -ГАМК в присутствии единого фермента и в карнозине, и в гомокарнозине. Высокое содержание гомокарнозина в мозгу по сравнению с карнозином объясняют тем, что K_m гомокарнозин-карнозинсинтетазы мозга для ГАМК и β -аланина равна 0,5 и 2,3 мМ, причем ГАМК является конкурентным ингибитором синтеза карнозина.

Распад гомокарнозина осуществляется гомокарнозиной (КФ 3.4.13.3). Этот фермент впервые был обнаружен в почках, изолирован и очищен Lennep и соавт. в 1977 г. [27]. Были обнаружены значительные различия между гомокарнозиной и карнозиной почек свиньи. Гомокарнозиная отличается более широкой специфичностью, хорошей растворимостью в воде, термолабильностью, а также чувствительностью к ионам металлов. Оба фермента имеют сходные значения оптимального pH 7,3—8,3 и изoeлектрической точки 5,6—5,8. Гомокарнозиная из почек представляет собой одну полипептидную цепь с M_r 57 кД. С помощью ингибиторного анализа было показано отсутствие SH-групп и серина в активном центре фермента. Фермент обнаружен также в матке, почках, печени и легких млекопитающих. В мозгу млекопитающих активность гомокарнозиной относительно низкая. В мозгу человека ее активность в среднем в 1000 раз выше, чем в мозгу крыс [10]. По нашим данным [28], активность гомокарнозиной в отделах мозга крыс составляет в больших полушариях $2,80 \pm 0,10$, в среднем и промежуточном мозгу $3,06 \pm 0,07$, в продолговатом мозгу $3,18 \pm 0,13$, в мозжечке $5,97 \pm 0,24$ нмоль/мг белка гомокарнозина, расщепившегося за 30 мин. Такое распределение активности гомокарнозиной по отделам мозга соответствует распределению субстрата этого фермента—гомокарнозина в соответствующих отделах мозга. Процесс гидролиза гомокарнозина идет более интенсивно, чем синтез, что указывает на высокую интенсивность метаболизма гомокарнозина в мозгу. В почках активность составляет соответственно $3,41 \pm 0,16$ нмоль гомокарнозина/мг белка/30 мин [28]. Показано, что активность гомокарнозиной связана с мембранными структурами [14]. Активность карнозиной наиболее высока в митохондриях мозга крыс, в то время как гомокарнозиная активность—в микросомах и синапсах.

Гомокарнозин является прежде всего нейроспецифическим пептидом. Однако в низкой концентрации—4—7 нмоль/г ткани он был выявлен также в печени кроликов, в моче и ликворе человека [8, 24, 30]. Гомокарнозин не обнаружен в сердце, легких, печени, кишечнике, почках, селезенке и мышцах других млекопитающих и плазме крови человека [29, 31]. Это же относится к распределению ферментов его метаболизма. Исключение составляют почки, в которых присутствует высокоактивная гомокарнозиназа, служащая для быстрого выведения гомокарнозина из организма. Гомокарнозин хорошо проникает через ГЭБ [32].

В ликворе неврологически здоровых взрослых людей гомокарнозин практически отсутствует. В ликворе детей гомокарнозин содержится, причем его количество уменьшается с возрастом. По данным Van Sande и соавт. [33] у 5-летних детей ликвор содержит $3,7 \pm 1,9$ в возрасте от 5 до 15 лет— $2,8 \pm 1,3$, от 15 до 64 лет— $0,9 \pm 0,6$ мкмоль гомокарнозина/л. Это было подтверждено и другими исследователями [34, 35]. В то же время описано наследственное заболевание—гомокарнозинозис, при котором в ликворе больных содержание гомокарнозина в 20—40 раз выше, чем в ликворе здоровых людей. Обследована норвежская семья, в которой у матери, дочери и двух сыновей содержание гомокарнозина составляло соответственно 74,9; 49,6; 56,5 и 57,2 мкмоль/л ликвора, тогда как у отца, другой дочери и двух сестер матери были только следы гомокарнозина [34, 36—39]. В головном мозгу больных содержание гомокарнозина было также повышено, активность же гомокарнозин-карнозинсинтетазы не отличалась от активности в мозгу неврологически здоровых людей. В то же время активность гомокарнозиныазы не обнаруживалась в мозгу больных гомокарнозинозисом. Вероятно, нарушение метаболизма гомокарнозина при гомокарнозинозисе связано с ингибированием его расщепления гомокарнозиназой [38].

Резко повышается содержание гомокарнозина в мозгу и ликворе больных фенилпироватной олигофренией [33, 34], изменяется количество гомокарнозина также у больных паркинсонизмом и хореей Гентингтона [35, 36, 40, 41]. Введение ингибиторов ГАМК-аминотрансферазы больным хореей Гентингтона значительно увеличивало содержание гомокарнозина и ГАМК в ликворе, а также улучшало состояние больных [42, 43].

Нами установлены [44] существенные изменения уровня содержания гомокарнозина в ликворе детей при гидроцефалии—содержание этого пептида у них оказалось увеличенным в 10—18 раз по сравнению с контролем. При эпилепсии различной этиологии количество гомокарнозина в ликворе в 5 раз превышало норму, тогда как в крови определялись лишь следы этого соединения. У больных же эпилепсией с низким содержанием гомокарнозина в ликворе была обнаружена

очень высокая концентрация его в крови. При олигофрениях неизвестной этнологии содержание гомокарнозина в ликворе было снижено или не обнаруживалось. В то же время у больных микроцефалией с эпилептическими припадками найдено высокое содержание гомокарнозина. При лейкодистрофии значительное количество гомокарнозина обнаружено в крови [45]. Вероятно, у детей с различными заболеваниями ЦНС происходит нарушение метаболизма гомокарнозина в ткани мозга, о чем свидетельствует резкое увеличение его содержания в ликворе.

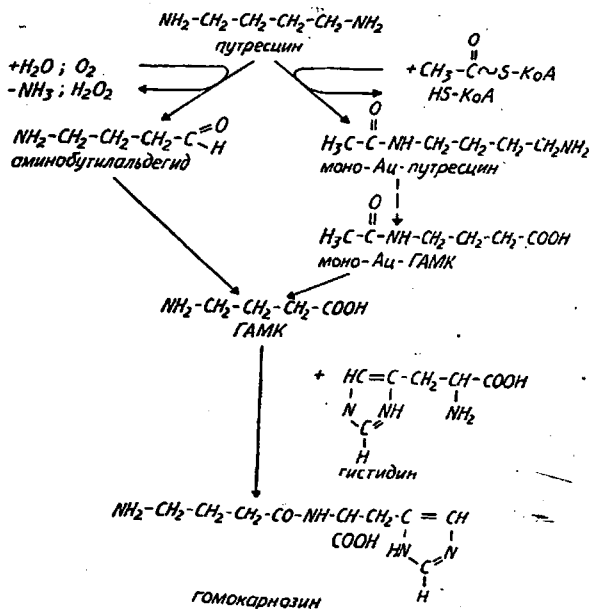


Рис. Схема синтеза ГАМК из путресцина и включение ее в состав гомокарнозина [24]

В 1-й месяц постнатальной жизни наблюдали постепенное повышение содержания гомокарнозина в развивающемся мозгу млекопитающих, что совпадало с последовательностью становления возбуждающих и тормозных процессов в ЦНС. У новорожденных кроликов было обнаружено самое низкое содержание гомокарнозина в мозгу — $63,2 \pm 1,9$ нм/г ткани, а уже в 1-е сутки постнатальной жизни его содержание увеличивалось на 48%. Значительное увеличение количества гомокарнозина наблюдали к 14-дневному возрасту, а также в период с 21-го по 30-й день жизни — на 74 и 93% соответственно. К 30-му дню концентрация гомокарнозина в мозгу составляла $155,4 \pm 5,4$ нмоль/г ткани, то есть увеличивалась на 146% по сравнению с новорожденными [46]. В мозгу незрелорождающихся млекопитающих формирование

синапсов происходит в основном в 1-й месяц постнатальной жизни. Прежде всего образуются возбуждающие синапсы, а тормозные появляются на более поздних стадиях развития [47]. Критическими в морфофункциональном созревании мозга кроликов являются 14- и 30-й дни жизни. К 14-му дню жизни в мозгу кроликов и крыс значительно возрастает количество синаптических пузырьков в терминалях и вблизи утолщений пресинаптической мембраны. Форма синаптических пузырьков трансформируется в типичную для взрослого организма. У грызунов к 14-му дню жизни происходит прозревание, и ультраструктура синапсов в коре больших полушарий становится сходной с таковой у половозрелых животных. Окончательного же развития структура синапсов достигает к 25—30-му дню жизни [48]. При этом содержание гомокарнозина достигает своего максимального значения только в мозгу взрослых кроликов [49]. Убедительным доказательством функциональной значимости гомокарнозина является одновременное повышение активности фермента его синтеза—гомокарнозин-карнозинсинтетазы [50]. В мозгу 30-дневных кроликов активность этого фермента возрастает в 12 раз по сравнению с 21-дневными, в 29 раз по сравнению с однодневными.

На метаболизм гомокарнозина в мозгу оказывает влияние изменение газовой среды в ходе индивидуального развития животных. Показано, что при действии 0,425 МПа O_2 в течение 60 мин имело место достоверное уменьшение на 45—85% содержания гомокарнозина в мозгу кроликов всех возрастных групп, за исключением новорожденных [46]. В основе снижения содержания гомокарнозина при действии гипербарической оксигенации (ГБО) лежит нарушение ферментативной регуляции его метаболизма, а именно ингибирование синтеза гомокарнозина [50]. Характер этих изменений зависит от возраста животных. Развитие судорожной активности мозга при ГБО у 21 и 30-ти дневных кроликов сопровождалось снижением содержания гомокарнозина в структурах мозга.

Установлена различная степень ранимости нейронов разных образований головного мозга и при его кислородном голодании [57], особенно опасна гипоксия плода и новорожденного. По данным Фанкони и соавт. [52], причиной смерти почти 50% новорожденных детей является гипоксия. У детей, оставшихся в живых, длительная гипоксия может вызвать тяжелые поражения головного мозга (мозговой детский паралич, болезнь Литля, олигофрению, эпилепсию и др.) [53, 54]. Глубокая гипоксия ребенка характеризуется резким угнетением функции коры больших полушарий со значительным снижением биоэлектрических потенциалов, нарушением процессов синтеза и распада нейромедиаторов. В пуповинной крови здоровых новорожденных детей и в венозной крови детей более старшего возраста (3 и 7 лет), а также в донорской крови взрослых людей гомокарнозин не обнаружен. Было установлено, что в крови новорожденных детей, родившихся в состоянии асфиксии, содержание гомокарнозина составляло

$32,7 \pm 9,0$ мкмоль/л крови. В пуповинной крови новорожденных детей, перенесших длительную внутриутробную гипоксию, но родившихся без асфиксии, содержание гомокарнозина оказалось выше в 3 раза, чем в группе новорожденных детей, родившихся в состоянии асфиксии, и составляло $100,5 \pm 13$ мкмоль/л крови. В крови детей, в первые 3—7 дней жизни перенесших как длительную внутриутробную гипоксию, так и родовую асфиксию, сохранялась повышенная концентрация гомокарнозина. В крови детей 2—5 лет, перенесших гипоксию, содержание гомокарнозина равнялось $104,7 \pm 27,2$ мкмоль/л крови. Причем у детей, имевших функциональные нарушения со стороны ЦНС, в крови содержалось наибольшее количество гомокарнозина. Таким образом, значительные изменения функционального состояния ЦНС сочетаются с высоким уровнем содержания гомокарнозина в крови. В то же время в ряде случаев повышенное содержание гомокарнозина было выявлено в крови детей, не проявивших на этапе обследования четких изменений в неврологическом статусе, что позволяет предположить вероятность появления у указанного контингента отклонений со стороны ЦНС в последующем. Исследование содержания гомокарнозина в крови детей, перенесших перинатальную гипоксию, можно использовать с целью прогнозирования функционального состояния ЦНС ребенка в отдаленный период после рождения. Полученные данные могут свидетельствовать о важной регуляторной роли гомокарнозина в развивающемся мозгу [55].

Экспериментальные условия, в которых животных подвергали действию гипоксической гипоксии (условно 9000 м над уровнем моря в течение 60 мин), соответствуют клиническому. При этом установлено повышение содержания гомокарнозина в крови крыс на 80%. Одновременно возрастало содержание гомокарнозина в среднем и промежуточном мозгу и мозжечке на 40% [56].

Возбуждение мозга при развитии судорог, вызванных гипероксией ($0,7$ МПа O_2), сопровождается снижением содержания гомокарнозина в различных отделах мозга крыс на 53—70% особенно в структурах среднего мозга [57]. В основе снижения содержания гомокарнозина при действии ГБО лежит нарушение ферментативной регуляции его метаболизма: происходит ингибирование синтеза гомокарнозина и активация распада, причем ведущая роль в снижении содержания гомокарнозина при ГБО принадлежит, по-видимому, активации гомокарнозидазы. Введение препаратов гомокарнозина предотвращало наступление судорог и способствовало повышению концентрации гомокарнозина в мозгу и крови крыс. Гомокарнозин в защитной дозе обладал антиоксидантными свойствами при реакциях перекисного окисления липидов *in vitro* в условиях нормоксии и при действии ГБО [58]. Таким образом, между функциональным состоянием организма и содержанием гомокарнозина существует взаимосвязь.

В настоящее время имеется несколько точек зрения о возможной физиологической роли гомокарнозина в ЦНС. Одна из них сводится к

предположению, что гомокарнозин является резервной формой ГАМК или гистидина [30]. С использованием меченого ^{14}C -гомокарнозина показано, что он может быть предшественником гистамина в мозгу [32]. Предполагают, что в везикулах синапсом гомокарнозин, расщепляясь, может поддерживать определенный уровень ГАМК [30, 34]. Основанием для этого послужила высокая активность гомокарнозинызы в синапсомной и микросомной фракциях ткани мозга [14], а также, по данным Сапо, совпадающее региональное распределение гомокарнозина и ГАМК [9]. Однако такая зависимость обнаружена не во всех структурах мозга. Было показано [10], что в путамене, черной субстанции и зубчатом ядре имеется одинаково высокое содержание гомокарнозина и ГАМК, а в пп. caudatus и accumbens при высокой концентрации ГАМК содержание гомокарнозина было низким. На отсутствие зависимости в распределении гомокарнозина и ГАМК в разных отделах мозга млекопитающих обращали внимание многие авторы [11—13, 18].

Корреляция между содержанием ГАМК и гомокарнозином может определяться не только активностью ферментов синтеза и распада гомокарнозина, но и влиянием гомокарнозина на активность ферментов метаболизма ГАМК. В опытах *in vitro* показано [59], что в синапсомной фракции мозга крыс гомокарнозин проявлял свойства неконкурентного ингибитора ГАМК-аминотрансферазы и глутаматдекарбоксилазы. Гомокарнозин влиял на поглощение ГАМК и глутамата синапсомными мембранами [59].

Другая точка зрения сводится к предположению о самостоятельной тормозной медиаторной или модуляторной функции гомокарнозина в мозгу [18, 60, 61]. Основанием для этого предположения послужили результаты опытов на животных, у которых введение гомокарнозина ингибировало судорожный приступ, вызванный электрическим током. Далее гомокарнозин был успешно применен при лечении детей, больных эпилепсией, а также при лечении экспериментальной эпилепсии у животных [61, 62].

Гомокарнозин отвечает некоторым критериям, характерным для нейромедиаторов ЦНС: неравномерность в распределении в морфофункциональных образованиях головного мозга, повышение содержания в эволюционном ряду вместе с усложнением ЦНС, в развивающемся мозгу, высокая концентрация предшественников его синтеза в нервных окончаниях, быстрая утилизация в постсинаптических структурах. Показано [63] изменение концентрации гомокарнозина в дорзальных ганглиях кошек и крыс при электрической стимуляции. В опытах *in vitro* получены экспериментальные данные о влиянии гомокарнозина на активный транспорт Na^+ и K^+ через мембрану [64] и на активность АХЭ [65]. Однако до сих пор не было установлено наличие специфических рецепторов гомокарнозина в клетках нервной ткани. Как уже было отмечено, гомокарнозин способен связываться с

ГАМК-рецепторами, но его сродство к ним составляет только 2% по сравнению с ГАМК [4].

Топографическое распределение гомокарнозина свидетельствует о его приуроченности к нервным структурам, связанным с тормозными процессами в головном мозгу, и отличается от распределения ГАМК. Так, было найдено [10, 66] содержание гомокарнозина в сравнительно высоких концентрациях (900—1200 нмоль/г ткани) в красном ядре, таламусе, гипоталамусе, бледном шаре, черной субстанции и мозжечке головного мозга людей.

Особого внимания заслуживает метаболизм гомокарнозина в мозжечке, в котором зарегистрировано наиболее высокое его содержание, а также наиболее высокая активность гомокарнозиназы по сравнению с другими отделами мозга крыс и кроликов. Содержание же ГАМК в мозжечке значительно ниже, чем в структурах, относящихся к среднему мозгу [18]. Многие авторы отмечали противоречие между низким содержанием ГАМК в мозжечке и высоким содержанием тормозных нейронов в этом отделе мозга [18]. Можно предположить, что гомокарнозин является тормозным медиатором именно в этом отделе мозга.

Наши экспериментальные материалы также подтверждают тормозную нейромедиаторную функцию гомокарнозина в мозгу. Нами было исследовано два противоположных по функциональному состоянию мозга воздействия: судорожная фаза кислородной интоксикации и депрессивное состояние ЦНС, вызванное действием гипоксической гипоксии. В судорожную стадию кислородной интоксикации содержание гомокарнозина снижалось во всех отделах мозга крыс и кроликов [56, 57]; в предсудорожную же стадию кислородной интоксикации содержание гомокарнозина не изменялось. Таким образом, отсутствие возбуждения ЦНС сопровождалось «нормальным» уровнем содержания гомокарнозина, а развитие судорог—резким снижением его концентрации в мозгу. Итак, можно полагать, что приведенные данные допускают участие гомокарнозина в регуляции тормозных и возбудимых процессов в мозгу и свидетельствуют о том, что этот дипептид может принимать участие в формировании и осуществлении высших функций головного мозга.

НОМОКАРНОСИН. МЕТАБОЛИЗМ И ФУНКЦИЯ

KRICHÉVSKAJA A. A., BONDARENKO T. I., MAKLETZOVA M. G.

Chair of Biochemistry, State University, Rostov on-Don

The review deals with literature and personal data concerning structure, properties, metabolism and biological role of neuropeptide homocarnosine. The homocarnosine's properties as possible neurotransmitter and its role in the regulation of inhibition and stimulation processes are discussed.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Udenfriend S., Pisano J. J., Wilson J. D.* Proc. 1-st Int. Neurochem. Symp., Varenna, p. 348—350, 1960.
2. *Pisano J. J., Wilson J. D., Cohen L., Abraham D., Udenfriend S. J.* Biol. Chem., v. 236, № 2, p. 499—502, 1961.
3. *Kanazawa A., Kakimoto J., Miyamoto E., Sano I. J.* Neurochem., v. 12, № 11, p. 957—958, 1965.
4. *Enna S. J., Snyder S. H. J.* Neurochem., v. 26, № 1, p. 221—224, 1976.
5. *Полянский О. Л.*—В кн.: Ферменты, с. 101—123, М., Наука, 1964.
6. *Kier L. J.* Med. Chem., v. 11, p. 441—445, 1968.
7. *Perez de Gracia B., De Mello W.* Acta physiol. latinoamer., v. 24, p. 356—359, 1974.
8. *Abraham D., Pisano J. J., Udenfriend S.* Arch. Biochem. and Biophys., v. 99, p. 210—213, 1962.
9. *Sano J.* Intern. Review of Neurobiology, v. 12, p. 235—268, 1970.
10. *Kish S. J., Perry T. L., Hansen S. J.* Neurochem., v. 32, № 6, p. 1629—1636, 1979.
11. *Perry T. L., Hansen S., Gandham S. S., Diamond S., Moc C. J.* Neurochem., v. 18, № 3, p. 513—519, 1971.
12. *Young A. B., Snyder S. H. J.* Neurochem., v. 21, № 2, p. 387—396, 1973.
13. *Кричевская А. А., Бондаренко Т. И., Менджерицкая Л. Г., Ходакова А. А.* Вопр. биохимии мозга, т. 12, с. 51—61, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1977.
14. *Ng R. H., Marshall F. D. J.* Neurochem., v. 30, № 1, p. 187—190, 1978.
15. *Промыслов М. Ш., Мирзоян Р. А.* Вопр. биохимии мозга, № 11, с. 71—76, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1976.
16. *Вайсфельд И. Л., Кассиль Г. Н.* Гистамин в биохимии и физиологии, М., Наука, 1981.
17. *Сытинский И. А.* Гамма-аминомасляная кислота в деятельности нервной системы (биохимия, фармакология, клиника), Л., Наука, 1972.
18. *Сытинский И. А.* Гамма-аминомасляная кислота—медиатор торможения, Л., Наука, 1977.
19. *Konishi H., Nakajima T., Sano I. J.* Biochem., v. 81, № 2, p. 355—360, 1977.
20. *Murrin L. Ch. J.* Neurochem., v. 34, p. 1779—1781, 1980.
21. *Kremzner L. T., Miller J. M., Simon E. J. J.* Neurochem., v. 25, № 6, p. 889—894, 1975.
22. *Seiler N., Al-Therib M. J., Kataoka R. J.* Neurochem., v. 20, № 4, p. 699—708, 1973.
23. *Seiler N., Welechmann M., Fischer H. A., Werner G.* Brain Res., v. 28, № 3, p. 317—325, 1971.
24. *Seiler N., Bink G., Grove J.* Neurochem. Res., v. 4, № 4, p. 425—435, 1979.
25. *Seiler N., Bink G., Grove G.* Neuropharmacology, v. 19, № 3, p. 251—258, 1980.
26. *Skaper S. D., Das S., Marshall F. D. J.* Neurochem., v. 21, № 6, p. 1429—1445, 1973.
27. *Lenney J. F., Siu-Chow K., Kingsum S., Glen H. S.* Arch. Biochem. and Biophys., v. 184, p. 257—266, 1977.
28. *Кричевская А. А., Бондаренко Т. И., Маклецова М. Г., Ускова Н. И.*—В кн.: IV Всесоюз. симпозиум по медицинской энзимологии, с. 137—138, Алма-Ата, 1983.
29. *Kanazawa A., Sano I. J.* Neurochem., v. 14, № 2, p. 211—214, 1967.
30. *Perry T. L., Hansen S., Fishler B., Bunting R., Berry K.* New Eng. J. Med., v. 277, № 23, p. 1219—1227, 1967.
31. *Hanin W. A., Agrawal H. C.*—In: Handbook of Neurochemistry (ed. A. Lajtha), v. 1, p. 170, Plenum Press, N. Y., 1969.

32. Van Balgooy J. N. A., Roberts E. Biochem. Pharmacol., v. 24, № 15, p. 1421—1425, 1975.
33. Van Sande M., Mardens J., Adriaenssens K., Lowenthal A. J. Neurochem., v. 17, № 2, p. 125—135, 1970.
34. Sjaastad O., Berstad J., Gjesdahl P., Glessing L. Acta neurol. scand., v. 53, p. 275—290, 1976.
35. Perry T. L., Hansen S., Wall R. A., Gauthier S. G. J. Neurochem., v. 38, № 3, p. 766—773, 1982.
36. Gjessing L. R., Sjaastad O. Lancet, v. 2, p. 1028—1029, 1974.
37. Sjaastad O., Gjessing L. R., Eerstad J. R., Gjesdahl P. Acta neurol. scand., v. 55, p. 158—162, 1977.
38. Perry T. L., Kish S. J., Sjaastad O., Gjessing L. R., Nesbakken R., Schrader H., Loken A. J. Neurochem., v. 32, № 6, p. 1637—1640, 1979.
39. Lunde H., Sjaastad O., Gjessing L. J. Neurochem., v. 38, № 1, p. 242—245, 1982.
40. Urquhart N., Perry T. L., Hansen S., Kennedy J. J. Neurochem., v. 24, p. 1071—1075, 1975.
41. Böhlen P., Tell G., Schechter P. et al. Life Sci., v. 26, p. 1009—1012, 1980.
42. Grove J., Schechten P. J., Tell G., Koch-Weser J., Sjordsma A., Warter J. M., Marescaux C., Rumbach L. Life Sci., v. 28, p. 2431—2439, 1981.
43. Tell G., Böhlen P., Schechter P. J., Koch-Weser J., Agid J., Bonnet A. M., Coquil-lat G., Chazot G., Fischer C. Neurology, v. 31, p. 207—211, 1981.
44. Бондаренко Т. И., Маклецова М. Г., Сухомовский Б. Н. Журн. невропатол. и психиатрии, т. 68, № 10, с. 1484—1488, 1983.
45. Бондаренко Т. И., Маклецова М. Г. Лаб. дело, № 4, с. 204—206, 1982.
46. Бондаренко Т. И., Маклецова М. Г. Укр. биохим. журн., т. 51, с. 135—138, 1979.
47. Глебов Р. Н., Крыжановский Г. Н. Функциональная биохимия синапсов, М., Медицина, 1978.
48. Богомолов Н. Н. Ультраструктура синапсов в норме и патологии, М., Медицина, 1975.
49. Кричевская А. А., Бондаренко Т. И., Маклецова М. Г.—В кн.: Механизмы пластичности мозга при функциональных и патологических воздействиях, т. 1, с. 193, Махачкала, 1982.
50. Кричевская А. А., Бондаренко Т. И., Малышева Н. В., Пожемакина И. А. Вopr. мед. химии, т. 28, № 2, с. 125—128, 1982.
51. Богомолов Н. Н. Ультраструктура мозга при гипоксии, М., Медицина, 1979.
52. Фанкони Г., Вальгрен А. Руководство по детским болезням, М., Изд-во медиц. лит-ры, 1960.
53. Елизарова И. П. Церебральные нарушения у новорожденных, перенесших родовую травму и асфиксию, Л., Медицина, 1977.
54. Савельева Г. М. Реанимация и интенсивная терапия новорожденных (родившихся в асфиксии), М., Медицина, 1981.
55. Маклецова М. Г. Гомокарбиозин в мозгу животных разного возраста в норме и при действии гипербарической оксигенации и гипоксии, автореферат канд. дис., Ереван, 1983.
56. Кричевская А. А., Бондаренко Т. И., Маклецова М. Г.—В кн.: 9-ая Всесоюз. конф. по биохимии нервной системы, с. 66—67, Ереван, 1983.
57. Бондаренко Т. И., Калинина Е. И. Укр. биохим. журн., т. 51, № 5, с. 483—486, 1979.
58. Кричевская А. А., Бондаренко Т. И., Маклецова М. Г., Михалева И. И. Вopr. мед. химии, т. 31, № 4, с. 75—79, 1985.
59. Tardy M., Rotland B., Bardakdulan J., Gounard P. Experientia, v. 34, № 7, p. 823—824, 1978.
60. Marshall F. D., Yockey W. C. Biochem. Pharmacol., v. 17, № 4, p. 640—642, 1968.

61. Hayashi T.—In: Enzymes in Mental Health (eds. G. J. Marthin, B. Kisch), p. 160—170, Lippincott Comp., Philadelphia e. a., 1966.
62. Hayashi T.—In: Research on Carnitine: its Relation to Lipid Metabolism (ed. G. Wolf), p. 183—191, Cambridge Press, 1965.
63. Osborne N. N., Wu P. H., Neuhoff V. Brain Res., v. 74, № 1, p. 175—181, 1974.
64. Haulica J., Topolceanu F., Cîrnea E. Acad. RSR, v. 13, № 6, p. 469—473, 1968.
65. Davies L. P. J. Neurochem., v. 32, № 2, p. 677—680, 1979.
66. Perry T. L., Hansen S., Gandham S. S. J. Neurochem., v. 36, № 2, p. 406—412, 1981.

Поступила 4. IV 1984г.



УДК 577.113.3.05:612.822.2

ЗАХВАТ АДЕНОЗИНА НЕРВНЫМИ ОКОНЧАНИЯМИ
И ЕГО РЕГУЛЯЦИЯ

РОМАНЕНКО А. В.

Институт биохимии им. А. В. Палладина АН УССР, Киев

Обобщены современные представления о механизмах захвата аденозина нервными окончаниями. Рассмотрены способы регуляции активного захвата нуклеозида нейронами. Приведены некоторые характеристики переносчика нуклеозидов. Обсуждена роль захвата аденозина в регуляции синаптической передачи.

Аденозин и его производные как нейронами соединения стали предметом широкого интереса исследователей лишь в последние два десятилетия. Толчком к этому послужило предположение о медиаторной или модуляторной роли АТР и аденозина в вегетативной НС [1, 2]. Установлено, что АТР или аденозинсодержащие нуклеотиды могут имитировать действие медиатора холинэргической, неадренэргической природы в гладких мышцах, а аденозин—участвовать в регуляции высвобождения медиаторов из нервных окончаний [1—4].

В последние годы обнаружено депрессорное влияние аденозина и его производных на синаптическую передачу в ЦНС, в частности в гиппокампе, коре головного мозга, хвостом ядре, таламусе, верхнем двухолмии, обонятельной луковице, мозжечке, спинном мозгу [5—9]. Это согласуется с данными фармакологических исследований, согласно которым введение аденозина и некоторых его производных оказывает на животных седативное, антиконвульсантное действие, подавляет спонтанную двигательную активность. Снотворное, противосудорожное влияние аденозина подтверждается данными электроэнцефалографических исследований [10—12].

Аденозин или его производные высвобождаются из нервных окончаний в ответ на электрическую стимуляцию или действие деполяризующих агентов [13—16]. Вследствие этого внеклеточная концентрация аденозина, очевидно, может достигать значительной величины и составлять 5—100 мкМ [17]. Важным фактором в регуляции уровня внеклеточного аденозина и родственных соединений является наличие в синаптической области ферментных систем обмена аденозина и его

производных, а также эффективное функционирование механизмов обратного захвата нуклеозида нервными окончаниями. Анализ этого вопроса и является задачей данного обзора.

В мозгу животных обнаруживаются в основном фосфорилированные производные аденозина. По данным ряда исследователей, содержание АТФ в мозгу крысы составляет в нмоль/г сырой массы ткани 1500—3000, АДФ—243—560, АМР—39—46, сАМР—1,6—2,3, аденозина—0,5—1,9 [18—23]. Наиболее высокий уровень АТФ обнаружен в таламусе, гипоталамусе, гиппокампе, мозжечке и стволе мозга [23, 24].

Существует несколько возможных путей образования аденозина в мозгу, в частности из 5'-АМР, в реакциях, катализируемых 5'-нуклеотидазой, щелочной или кислой фосфатазой, из 2'-АМР в присутствии 2'-нуклеотидазы, однако физиологическое значение имеет только первая реакция [25—27]. Образовавшийся аденозин в аденозинкиназной реакции может превращаться в 5'-АМР [25, 27—29], в аденозиндезаминазной—в инозин [25, 27], а пурииннуклеозидфосфорилазной—в аденин [30]. Последняя из приведенных реакций не имеет существенного значения для регуляции уровня аденозина, что же касается первых двух, то они, наряду с аденозинкиназной реакцией, играют ключевую роль в регуляции содержания нуклеозида. Учитывая эти факты, коротко охарактеризуем локализацию и некоторые свойства соответствующих ферментов.

Данные кинетических исследований показали, что в мозгу крысы и мыши K_m 5'-нуклеотидазы для АМР составляет в мкМ соответственно 245 и 139, аденозиндезаминазы для аденозина—34 и 16, аденозинкиназы для аденозина—1,5 и 0,7 [25]. Более низкое значение K_m для аденозина в аденозинкиназной реакции обнаруживается при очистке фермента из мозга крысы в 3900 раз [29]. Установлено, что аденозинкиназа, представляющая собой мономер с M_r около 40 кД, имеет для аденозина K_m , равную 0,2 мкМ. Максимальную активность фермент проявляет в присутствии 0,5 мкМ нуклеозида, а при более высоких концентрациях субстрата в среде инкубации она снижается.

Аденозинкиназа и аденозиндезаминаза локализованы в основном в цитоплазматической фракции [27], однако не исключено, что аденозиндезаминаза может функционировать также и как эктофермент [1]. Что же касается 5'-нуклеотидазы, то результаты биохимических, цитохимических и иммунологических исследований свидетельствуют в пользу локализации фермента в мембранах в синаптической области [31, 32]. Допускается, что 5'-нуклеотидаза может участвовать в гидролизе не только внеклеточного, но и внутриклеточного АМР [27].

При инкубации срезов неокортекса морской свинки в буфере, содержащем [^{14}C]аденин, обнаружено значительное количество радиоактивной метки в синапсосамах, полученных из срезов, причем она находится в основном в структуре адениннуклеотидов [33]. Эти данные согласуются с имеющимися в литературе сведениями о высоком

уровне адениннуклеотидов в синапсосамах, где АТФ обнаружена в количестве 7,36, АДФ—3,12, АМР—6,42 нмоль/мг белка [34].

Проведенные исследования показали, что инкубация синапсосом мозга с [^{14}C] аденозином или [^{14}C] аденином, взятых в концентрации 0,5—1,0 мкМ, сопровождается включением указанных соединений в синапсосомы, а скорость этого процесса для первого из них в 4 раза выше, чем для второго. 78—88% включившегося [^{14}C] аденозина находится в виде 5'-[^{14}C] адениннуклеотидов (АТФ, АДФ, АМР), причем на долю АТФ приходится около 50% включившейся радиоактивной метки, 7—18% [^{14}C] обнаруживается в аденозине и незначительное количество—в аденине, инозине, гипоксантине и сАМР. [^{14}C] аденин в синапсосах менее активно превращается в адениннуклеотиды и образовавшиеся адениннуклеотиды составляют 54—78% включившегося предшественника [13, 14]. Эти результаты согласуются с данными о том, что в срезах головного мозга аденозин фосфорилируется быстрее, чем аденин [35].

Как уже отмечалось выше, фосфорилирование аденозина осуществляется в аденозинкиназной реакции. Предполагается, что аденозинкиназа облегчает захват аденозина срезами мозга путем фосфорилирования включившегося нуклеозида [28]. Эта гипотеза базируется в первую очередь на данных о сходстве величин K_m фермента для аденозина и процесса захвата нуклеозида [25, 27, 28, 36]. Кроме того, аденозинкиназная активность угнетается в присутствии 1,0 мМ 3'-деоксиаденозина, аденин-9- β -L-рибофуранозида и аденин-9- β -D-арабинофуранозида соответственно на 87, 80 и 47%, а включение [^{14}C] аденозина в срезы мозга в этих же условиях уменьшается на 56, 56 и 51%.

Несмотря на привлекательность приведенной гипотезы, некоторые экспериментальные данные с нею не согласуются. В частности, ингибитор аденозинкиназы туберцидин лишь незначительно уменьшает захват аденозина как срезами коры головного мозга, так и препаратами синапсосом. Не всем исследователям удается обнаружить высокий процент превращения [^{14}C] аденозина, включившегося в синапсосомы, в адениннуклеотиды [36].

При обсуждении процессов обмена аденозина и его производных в ЦНС особого внимания заслуживает вопрос о механизме захвата аденозина синапсосамами. Хотя исследования в указанном направлении ведутся лишь в течение последних лет, накопленные данные позволяют, по крайней мере в общих чертах, охарактеризовать механизм захвата аденозина нервными окончаниями.

Обнаружено 2 механизма захвата аденозина синапсосамами мозга: быстрый и медленный. В первом случае насыщение наступает в течение 1 мин инкубации, во втором—30 мин [36—39]. Медленный захват аденозина синапсосамами частично ингибируется 2,4-динитрофенолом. Это свидетельствует о том, что наряду с активным захватом нуклеозида возможен диффузионный компонент. Предполагается, что захват аденозина происходит благодаря активному транспорту при

концентрации нуклеозида в среде ниже 10 мкМ, а при более высоких концентрациях—за счет облегченной диффузии. Медленный активный захват аденозина синаптическими включает два компонента: один с $K_m = 1$ мкМ, а другой с $K_m = 5$ мкМ.

Система активного захвата аденозина обнаружена и в холинергических синаптических синаптических, выделенных из электрического органа рыб *Torpedo marmorata* [16, 32, 40, 41]. Она, по-видимому, подобна медленному захвату нуклеозида, описанному в синаптических мозга. K_m захвата аденозина в холинергических синаптических синаптических составляет 1—3 мкМ, а V —около 30 пмоль/мин/мг белка.

Холинергические синаптические могут захватывать не только аденозин, но в меньшей степени и некоторые другие родственные соединения. В частности, захват аденозина происходит в 10 раз эффективнее захвата аденина. В незначительной степени захватываются синаптическими инозин и гипоксантин. АТФ для того, чтобы включиться в синаптические, должна быть дефосфорилирована до аденозина. Дефосфорилирование может осуществляться экто-АТФазой и экто-5'-нуклеотидазой, обнаруженных на нервных окончаниях в электрическом органе [32, 42].

Захват аденозина холинергическими синаптическими замедляется при уменьшении температуры инкубационной среды, коэффициент температурной активации Q_{10} рассматриваемого процесса составляет 1,8. Захват нуклеозида угнетается в присутствии ингибитора активного транспорта подоацетамида. Конкурентным ингибитором транспорта аденозина в синаптические являются туберцидин, 2'-деоксааденозин, для которого K_i составляет 91 мкМ [16]. Более эффективно захват аденозина холинергическими синаптическими блокируется динпридамом, являющимся неконкурентным ингибитором захвата, при этом K_i составляет 40 нМ [40].

В регуляции захвата аденозина синаптическими участвуют неорганические ионы. Захват аденозина холинергическими синаптическими из электрического органа снижается при увеличении внутрисинаптического уровня Ca^{2+} , вызываемого увеличением высвоточной концентрации кальция, кальцевой деполяризацией, ингибированием Na^+ , Ca^{2+} -обмена или ионофором A23187 [41]. Рассматриваемый механизм захвата аденозина может играть существенную роль в регуляции высвобождения медиатора при ритмическом раздражении нерва, когда в нервных окончаниях значительно повышается уровень кальция. В этом случае благодаря увеличению концентрации аденозина в синаптической щели должно усиливаться его ингибиторное влияние на высвобождение медиатора.

Описанная выше система захвата аденозина нервными окончаниями наряду с высокоаффинной системой захвата холина обеспечивает поступление в нервные окончания предшественников медиатора и комеднатора, что создает предпосылки для эффективного функционирования синаптической передачи. Отметим, что K_m захвата холина

близка к K_m захвата аденозина и составляет около 2 мкМ, а V захвата холина—величина того же порядка, что и V захвата аденозина [42, 43].

Наряду с системой медленного захвата аденозина в синапсомозге имеет место и быстрый захват нуклеозида, характеризуемый $K_m = 0,9$ мкМ и $V = 5,26$ моль/мг белка/30 с. Этот механизм обеспечивает линейный во времени захват аденозина в течение 30 с из среды инкубации, содержащей 1 мкМ нуклеозида. Быстрый захват аденозина зависит от pH среды и максимален при pH 8. Он увеличивается пропорционально росту температуры среды до 50°. Дальнейшее нагревание препаратов синапсомом ведет к уменьшению захвата нуклеозида. Коэффициент температурной активации Q_{10} рассматриваемого процесса равен 1,77. Быстрый захват аденозина зависит от ионного состава среды. Он снижается в присутствии 2 мМ NaCl и 0,1 мМ ЭГТА [36, 39].

Система быстрого захвата аденозина синапсомозгом не является специфичной по отношению к аденозину. Другие нуклеозиды, в частности цитидин, инозин, гуанозин, уридин и тимидин, являются конкурентными ингибиторами захвата аденозина. Все приведенные ниже данные по ингибированию быстрого захвата аденозина различными соединениями получены в опытах при инкубации синапсомом в присутствии 1 мкМ меченого аденозина, поэтому концентрация аденозина в инкубационной среде далее не указывается.

Величина K_i захвата синапсомозгом [3H]аденозина аденозином составляет 1 мкМ, а для других нуклеозидов она равна 300—400 мкМ, что свидетельствует о предпочтительности аденозина как субстрата для переносчика. Модификация пуринового кольца аденозина во втором положении несколько снижает способность молекулы конкурировать [3H]аденозином за систему захвата. Например, K_i захвата [3H]аденозина 2-азидоаденозином составляет 30 мкМ, 2-фтораденозином—43 мкМ, 2-п-метоксифениладенозином—23 мкМ. Для нитробензилтиогуанозина и нитробензилтиоинозина указанные величины равны соответственно 25 и 30 мкМ. Нуклеотиды не являются субстратом для переносчика и могут включаться в синапсомозг только после дефосфорилирования до нуклеозидов [39], что согласуется с данными по изучению захвата аденозина холинэргическими нервными окончаниями [16, 32, 40].

Во взаимодействии нуклеозида с молекулой переносчика вовлекаются, видимо, SH-группы последнего. Установлено, что п-хлормеркурибензоат и N-этилмаленимид являются конкурентными ингибиторами захвата аденозина синапсомозгом [39].

Определенные возможности для выделения и изучения молекулы переносчика открывает использование [3H]нитробензилтиоинозина как его лиганда. Выше уже отмечалось, что это соединение конкурирует с аденозином за систему захвата. Недавно установлено, что [3H]нитробензилтиоинозин специфически и необратимо связывается

с мембранами мозга, причем преимущественно с синаптическими мембранами. Выявлена гомогенная популяция лиганд связывающих участков с K_d , равной 0,15 нМ и максимальной величиной связывания 130 фмоль/мг белка. Связывание [3 H] нитробензилтионнозинна чувствительно к действию протеолитических ферментов. Ингибиторами связывания этого соединения с переносчиком являются нитробензилтионнозин, нитробензилтиогуанозин, а также дипиридамол и гексобендин. Величины их K_i равны соответственно 1,0, 2,1, 840 и 880 нМ [44]. Ультрафиолетовое облучение в течение 2—5 мин приводит к необратимому связыванию [3 H]нитробензилтионнозина с переносчиком нуклеозидов, локализованным в синаптических мембранах, что позволяет использовать указанное соединение в качестве фотоаффинного зонда [45].

Нитробензилтионнозин и N⁶-(п-азидобензил)-аденозин, также являющийся фотоаффинным зондом, ингибируют активный транспорт нуклеозидов и в эритроцитах человека. Эти соединения специфически связываются с соответствующим переносчиком нуклеозидов с K_d , равными соответственно 0,3—1,0 и 13,4 нМ. Их использование в качестве фотоаффинных зондов позволило установить, что они связываются с полипептидом, имеющим M_r 120 кД и представляющим собой либо весь переносчик нуклеозидов в эритроцитах, либо его часть [46].

К числу эффективных блокаторов захвата аденозина как срезами мозга, так и препаратами синапсом относится ряд соединений, принадлежащих к группе коронарных вазодилаторов. Среди них выделяются дипиридамол, его производные RE 244-BS, RE 642-BS, RE 86-BS и гексобендин, лидофлазин, дилазеп [47—49]. Отметим, что если величина K_i быстрого захвата [3 H] аденозина синапсосомами мозга аденозином составляет 1 мкМ, то для дипиридамола—0,92 [49]. Ингибирование захвата аденозина на 20% (IC_{20}) наблюдается в присутствии других коронарных вазодилаторов, взятых в концентрации 1—40 нМ, а на 50% (IC_{50})—270—1200 нМ [48].

Имеется ещё одна большая группа соединений, ингибирующих захват аденозина срезами мозга и препаратами синапсом. Она включает ряд лигандов бензодиазепиновых рецепторов. Наиболее эффективным среди бензодиазепинов в этом плане является клопазепам, для которого IC_{20} составляет 5 нМ [48, 49]. Предполагается, что эффективность бензодиазепинов может быть обусловлена их взаимодействием не с нуклеозидсвязывающим участком переносчика, а с другими структурами [44].

Отметим, что коронарные вазодилаторы конкурентно ингибируют связывание [3 H] диазепама с синаптическими мембранами, причем обнаружена зависимость между K_i захвата аденозина коронарными вазодилаторами и K_i связывания диазепама [49]. Дипиридамол ингибирует связывание с синаптическими мембранами не только [3 H] диазепама, но и других лигандов бензодиазепиновых рецепторов, в частности агониста [3 H] (+)-3-метилклопазепама и антагониста

[³H]R₀15-1788, причем во всех трех случаях величина K близка к: 200 нМ [50].

Ингибиторами связывания [³H] диазепама с синаптическими мембранами являются триазолопиридазин и зопиклон. Эти же соединения ингибируют захват аденозина синапсосомами, причем величины IC₅₀ и K_d для первого и второго случаев близки [48, 51, 52]. Помимо триазолопиридазина и зопиклона, ряд других соединений, относящихся к классу небензодиазепиновых анксиолитических и седативных средств может ингибировать захват аденозина синапсосомами.

Некоторые из эффектов, вызываемых введением в организм нейролептиков, в частности их анксиолитическое и седативное действие, также, видимо, могут быть связаны с ингибированием захвата аденозина. Производные фенотиазина, тioxантена, бутирофенона, дифенил-бутилпиперадина, дибензодиазепина и сульфамонлбензамида снижают захват нуклеозида синапсосомами мозга. Наиболее эффективными в этом плане являются трифтазин, спироперидол и сульприд, имеющие IC₂₀ около 1 нМ и IC₅₀ около 1 мкМ [48]. С данными об ингибирующем действии нейролептиков на захват аденозина синапсосомами согласуются сведения о снижении содержания АТР во фракции синапсом мозга крыс, выделенной после внутривенного введения животным трифтазина [53].

Недавно установлено, что нейролептики в концентрации 1 мкМ связываются с кальмодулином. Показано, что соединения указанного класса могут, в частности, ингибировать стимулирующее действие кальмодулина на сGMP-фосфодиэстеразу хвостатого ядра мозга крысы и Ca²⁺, Mg²⁺-АТФазу эритроцитов крысы [54]. Сопоставление эффективности отдельных нейролептиков как регуляторов действия кальмодулина с их эффективностью в качестве блокаторов захвата аденозина синапсосомами обнаруживает корреляцию. Это дает основание допускать, что захват аденозина синапсосомами мозга может регулироваться кальмодулином.

В литературе имеются сведения о возможности ингибирования захвата аденозина целым рядом нейроактивных агентов, в частности антиконвульсантами, антидепрессантами, метилксантинами, простагландинами, стероидами, нестероидными противовоспалительными средствами [48, 55]. Эффективность этих веществ в целом ниже, чем у рассмотренных ранее соединений.

По данным электрофизиологических исследований вещества, ингибирующие захват аденозина нервными окончаниями, потенцируют действие нуклеозида, угнетают спонтанную электрическую активность нейронов и амплитуду вызванных постсинаптических потенциалов. Наиболее детально в этом плане изучено действие дипиридамола, тексобендина, папаверина, 2-гидроксн-5-нитробензилтиогуанозина и диазепама [6, 11]. Указанные соединения оказывают депрессорное влияние на исследуемые нейроны не только при ионофоретической аппликации, но и при внутривенном введении, что согласуется с возможностью

их применения в медицинской практике. Угнетение ингибиторами захвата аденозина нейрональной активности свидетельствует, что механизм захвата нуклеозида нервными окончаниями эффективно функционирует в физиологических условиях и является важным фактором в регуляции синаптической передачи.

Захват аденозина нервными окончаниями, с одной стороны, прерывает его действие на мембранные структуры, локализованные в синаптической области, а с другой—обеспечивает поступление нуклеозида внутрь нервных окончаний, где тот может повторно включаться в синаптические везикулы. Достигнутые уже успехи в изучении механизма захвата аденозина нервными окончаниями и его регуляции биологически активными соединениями раскрывают возможности для целенаправленного воздействия на этот процесс фармакологическими агентами. Вместе с тем в настоящее время выяснены ещё не все детали механизма захвата аденозина нервными окончаниями. В этой связи представляется перспективным использование фотоаффинных лигандов молекулы переносчика нуклеозидов для выделения молекулы переносчика и изучения её организации.

ADENOSINE UPTAKE BY NERVE ENDINGS AND ITS REGULATION

ROMANENKO A. V.

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

The paper deals with modern ideas on mechanisms of adenosine uptake. The paths of regulation of active uptake of adenosine by neuroactive drugs are discussed. The role of adenosine uptake in the regulation of synaptic transmission is discussed.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Burnstock G. Pharmacol. Rev., v. 24, p. 509—581, 1972.
2. Shuba M. F., Vladimirova I. A. Neuroscience, v. 5, p. 853—859, 1980.
3. Ribeiro J. A. Life Sci., v. 22, p. 1373—1380, 1978.
4. Романенко А. В. Действие витаминов В₁, РР и их производных на электрофизиологические свойства гладких мышц. Автореф. канд. дис., К., 1981.
5. Артеменко Д. П., Герасимов В. Д. Нейрофизиология, т. 15, с. 639—646, 1983.
6. Dunwiddie T. V., Hoffer B. J. Brit. J. Pharmacol., v. 69, p. 59—68, 1980.
7. Kostopoulos G. K., Limacher J. J., Phillis J. W. Brain Res., v. 88, p. 162—165, 1975.
8. Okada Y., Ozawa S. Eur. J. Pharmacol., v. 68, p. 488—492, 1980.
9. Phillis J. W., Edstrom J. P., Kostopoulos G. K., Kirkpatrick J. R. Can. J. Physiol. and Pharmacol., v. 57, p. 1298—1312, 1979.
10. Bhattacharya I. C., Goldstein L., Pfeiffer C. C. Res. Commun. Chem. Path. Pharm., v. 1, p. 99—108, 1970.
11. Haulica I., Ababel L., Brantsteanu D., Topoligeanu F. J. Neurochem., v. 21, p. 1019—1020, 1973.

12. Marley E., Nistico G. *Brit. J. Pharmacol.*, v. 46, p. 619-636, 1972.
13. Daval J.-L., Barberis C. *Biochem. Pharmacol.*, v. 30, p. 2559-2567, 1981.
14. Kuroda Y., McIlwain H. J. *Neurochem.*, v. 22, p. 691-699, 1974.
15. Potter P., White T. D. *Neuroscience*, v.5, p. 1351-1356, 1980.
16. Zimmermann H., Dowdal M. J., Lane D. A. *Neuroscience*, v. 4, p. 979-983, 1979.
17. Rubio R., Berne R. M., Winn H. R.—In: *Cerebral vascular smooth muscle and its control* (Ciba Found. Symp.), p. 355-378, Amsterdam Elsevier; 1978
18. Newman M., McIlwain H. *Biochem. J.*, v. 164, p. 131-137, 1977.
19. Nordstrom C.—H., Rencrona S., Siesjö B. K., Westerberg E. *Acta Physiol. Scand.*, v. 101, p. 63-71, 1977.
20. Rencrona S., Siesjö B. K., Westerberg E. *Acta physiol. scand.*, v. 104, p. 453-463, 1978.
21. Veech R. L., Harris R. L., Veloso D., Veech E. H. J. *Neurochem.*, v. 20, p. 183-188, 1973.
22. Winn H. R., Welch J. E., Rubio R., Berne R. M. *Circ. Res.*, v. 47, p. 568-577, 1980.
23. Wu P. H., Phillis J. W. *Neurochem. Res.*, v. 3, p. 563-571, 1978.
24. Wu P. H., Moore K. C., Phillis J. W. *Experientia*, v. 35, p. 881-883, 1979.
25. Arch J. R. S., Newsholme E. A. *Biochem. J.*, v. 174, p. 965-977, 1978.
26. Nacamura S., Yamao S., Kameyama M. *Biochim. et biophys. acta*, v. 568, p. 30-38, 1979.
27. Phillips E., Newsholme E. A. J. *Neurochem.*, v. 33, p. 553-558, 1979.
28. Shimizu H., Tanaka S., Kodama T. J. *Neurochem.*, v. 19, p. 687-698, 1972.
29. Yamada Y., Goto H., Ogasawara N. *Biochim. et biophys. acta*, v. 616, p. 199-207, 1980.
30. Murray A. W., Elliot D. C., Atkinson M. R. *Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, v. 10, p. 87-119, 1970.
31. Bernstein H.—G., Webb J., Luppa H. *Histochemistry*, v. 55, p. 261-267, 1978.
32. Dowdal M. J. *J. Physiol. (France)*, v. 74, p. 497-501, 1978.
33. Kuroda Y., McIlwain H. J. *Neurochem.*, v. 21, p. 889-900, 1973.
34. Barberis C., McIlwain H. J. *Neurochem.*, v. 26, p. 1015-1021, 1976.
35. Wong P. C. L., Henderson J. F. *Biochem. J.*, v. 129, p. 1085-1094, 1972.
36. Bender A. S., Wu P. H., Phillis J. W. J. *Neurochem.*, v. 36, p. 651-650, 1981.
37. Barberis C., Minn A., Gayet J. J. *Neurochem.*, v. 36, p. 347-354, 1981.
38. Bender A. S., Wu P. H., Phillis J. W. J. *Neurochem.*, v. 35, p. 629-640, 1981.
39. Bender A. S., Wu P. H., Phillis J. W. J. *Neurochem.*, v. 37, p. 1289, 1981.
40. Meunier F. M., Morel N. J. *Neurochem.*, v. 31, p. 845-851, 1978.
41. Tomas J., Marsal J., Esquerda J. E., Solsona C. *Neurochem. Int.*, v. 4, p. 513-521, 1982.
42. Dowdal M. J., Zimmermann H. *Neuroscience*, v. 2, p. 405-421, 1977.
43. Morel N., Israël M., Manaranche R., Mastour-Francon P. *J. Cell. Biol.*, v. 75, p. 43-55, 1977.
44. Patel J., Marangos P. J., Skolnick P., Paul S. M., Martino A. M. *Neurosci. Lett.*, v. 29, p. 79-82, 1982.
45. Marangos P. L., Clark-Floresberg R., Patel J. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 85, p. 359-360, 1982.
46. Young J. D., Jarvis S. M., Robins M. J., Paterson A. R. P. *J. Biol. Chem.*, v. 258, p. 2202-2208, 1983.
47. Huang M., Daly J. W. *Life Sci.*, v. 14, p. 489-503, 1974.
48. Phillis J. W., Wu P. H. *Comp. Biochem. and Physiol.*, v. 72C, p. 179-187, 1982.
49. Wu P. H., Phillis J. W., Bender A. S. *Life Sci.*, v. 28, p. 1023-1031, 1981.
50. Skerritt J. H., Chow S. C., Johnston A. R., Davies L. P. *Neurosci. Lett.*, v. 34, p. 63-68, 1982.
51. Blanchard J. C., Eoircan A., Garret C., Joulou L. *Life Sci.*, v. 24, p. 2417-2420, 1979.

52. Lippa A. S., Critchett D., Sano M. C., Klepner C. A., Greenblatt E. N., Csapet J., Beer B. *Pharm. Biochem. and Behav.*, v. 10, p. 831—843, 1979.
53. Доведова Е. Л., Порфирьева Р. П. *Фармакология и токсикология*, т. 37, № 1, с. 14—18, 1974.
54. Lewin R. M., Welss B. *Neuropharmacology*, v. 19, p. 169—174, 1980.
55. Bender A. S., Wu P. H., Phillips J. W. *Pharmacol. Res. Commun.*, v. 14, p. 409—416, 1982.

Поступила 8. I 1985



РЕЦЕНЗИИ

А. А. БОЛДЫРЕВ. «Биологические мембраны и транспорт ионов», М., Изд-во МГУ, 1985.

Биохимия и биофизика мембран (или мембранология) является «горячей точкой» биологии. Это касается различных аспектов нейробиологии, переживающей сейчас своеобразный Ренессанс в связи с успехами в изучении медиаторов, нейропептидов и нейроспецифических белков, интегральных белков нейрональных мембран-рецепторов, ионных каналов и насосов. Проблемам нейробиологии уделяется большее внимание в программе вузов. Все больше научных учреждений и молодых специалистов вовлекаются в теоретическую и медицинскую нейробиологию. Исходя из этого понятен интерес в обобщающих трудах, учебных пособиях по нейробиологии в целом, и по ее отдельным аспектам в частности. Издательство Московского университета выпустило в 1985 г. учебное пособие Болдырева А. А. на тему «Биологические мембраны и транспорт ионов». Книга по мембранологии выходит далеко за рамки вузовского учебного пособия, она может быть полезной как для начинающих специалистов, так и для «умудренных опытом» нейробиологов, что обусловлено высоким профессионализмом автора пособия и изложением современных и новых, нередко сложных, методов исследования, широтой и глубиной рассматриваемых фактов и представлений и в то же время лаконичностью и обобщающей характеристикой тех или иных аспектов мембранологии.

Книга состоит из 7 глав. В 1-й главе кратко рассмотрены общие представления о динамическом состоянии мембран (липидный состав различных мембран клеток, интегральные и периферические белки, структурная организация липидного бислоя, характеристика гидрофобных сил, модификация бислоя белками, роль аннулярных липидов в липопротеидных комплексах, асимметрия биомембран, вода в бислое, жидкокристаллическое состояние мембран, подвижность белков и липидов в мембранах, фазовые переходы, в том числе и генерализованные структурные перестройки мембран). обстоятельно изложена роль холестерина как регулятора фазового состояния бислоя, плотности упаковки липидов. Однако в данном разделе автор уделяет мало внимания роли гликолипидов (цереброзидов и ганглиозидов), гликопротеидов, фосфатидилинозитидов в межклеточном узнавании, в рецепции Ca^{2+} , медиаторов и гормонов. В нем анализируется уникальная структура плазматических мембран—содержание на внешней стороне так называемого гликокаликса и на внутренней поверхности эктоплазмы, представления о которой важны для понимания функционирования клеточных мембран, но они кратки и неполны. Гликокаликс—это слой разветвленных олигосахаридных цепей, богатых анионными группами, входящих в состав гликолипидов, гликопротеидов и кислых мукополисахаридов. Этот слой простирается сравнительно далеко во внеклеточную среду и как своеобразные антенны отличает «своих среди чужих и чужих среди своих». Эктоплазма—это динамический слой (шириной до 50—100 нм) тесно переплетающихся элементов цитоскелета—микротрубочек, промежуточных филаментов и активных микрофиламентов. Эктоплазма регулирует эластичность, упругость мембран, кластеризацию рецепторов

и других белков в мембране, а также их интернализацию, процессы эндо- и экзоцитоза. Кстати, последние процессы являются основой для рециклизации (восстановления) мембран, о чем можно было упомянуть при рассмотрении скорости обмена мембранных компонентов. При обсуждении роли фосфолипаз полезно было бы обсудить цикл арахидоновой кислоты и его значение в синтезе простагландинов.

Во 2-й главе, важной в методическом отношении, детально изложены принципиальные возможности использования флуоресцентных и спинных зондов при исследовании фазовых переходов в мембране, измерении микровязкости и гидродинамического объема мембраны, флип-флопа и латеральной диффузии липидов, вращательной подвижности белков в бислое, межбелковых взаимодействий, использования метода «молекулярной мишени» для оценки молекулярной массы ферментов в мембране без их очистки. Обстоятельно описаны характеристика и принципы использования в мембранологии детергентов. Здесь также указывается как работать с ферментными мембранными препаратами, с буферными растворами. Справедливо подчеркивается высокая информативность исследованной температурной зависимости свойств мембранных структур. Описываются возможности и ограничения кинетического анализа мембранных ферментов.

3-я глава посвящена рецепторам и ионным каналам, где рассмотрены особенности взаимодействия лигандов и рецепторов. В качестве примеров описаны свойства и функции опиятных рецепторов мозга, Н-холинорецепторов, рецепторов гормонов, опосредующих свое действие на клетки-мишени через систему сАМР. Опять-таки скупно рассмотрены электрически и химически возбудимые неспецифические каналы. В последнем случае полезно было обсудить обмен фосфатидилинозитидов в регуляции химически возбудимых каналов, открывающихся при взаимодействии лигандов и рецепторов, роль фосфатидной кислоты как потенциального Ca^{2+} -ионофора. Не рассмотрены пути химической модификации ионных каналов системой сАМР и кальмодулина, роль взаимопревращений фосфолипидов (реакции метилирования и деметилирования) при лиганд-рецепторном взаимодействии. Полезно также упомянуть о новой динамической (стохастической) модели ионных каналов, суть которой состоит в том, что они формируются путем олигомеризации и кластеризации в ходе проведения нервного импульса. В этой главе читатель находит представления об ионофорах (в том числе и о новых краун-эфирах) и каналобразователях (например, аламетинине).

В 4-й главе рассмотрены общие механизмы диффузии, пассивного и активного транспорта веществ через биологические мембраны. Наиболее трудным в этом разделе является вопрос о протонной и анионной АТРазах. Эта проблема сейчас интенсивно разрабатывается и, естественно, некоторые факты, приведенные в учебном пособии, имеют противоречивый характер. В последнее время протонная АТРаза митохондриального происхождения успешно исследуется в секреторных гранулах, лизосомах, одетых везикулах, аппарате Гольджи. Например, функционирование H^{+} -насоса в хромаффинных гранулах надпочечников сопряжено с активным Mg^{2+} -АТР-индуцируемым захватом катехоламинов в гранулы из цитоплазмы.

В 5–7-й главах подробно и обстоятельно изложены свойства и функции Na^{+} -, K^{+} - и Ca^{2+} -насоса мембран различных клеток, в том числе и мозга. В этих главах рассмотрены современные представления о сопряжении гидролитических и транспортных процессов, моноформных пептидных участках отдельных фрагментов молекул транспортных АТРАЗ, олигомерной организации Na^{+} -, K^{+} - и Ca^{2+} -АТРАЗ.

Пособие прекрасно и обильно иллюстрировано схемами, рисунками, сделанные замечания, по всей вероятности, отражают меру увлечений самого рецензента, ибо трудно объять необъятное. Нужно отдать должное высокому профессионализму автора, который подарил нам, читателям (не только студентам, не только молодым, но и зрелым специалистам), хорошее современное учебное пособие, которое будет полезным и для нейрохимиков. В заключение целесообразно рекомендовать издательству «Высшая школа» переиздать это пособие в расширенном и дополненном варианте.

ГЛЕБОВ Р. Н.



РЕФЕРАТЫ СТАТЕЙ, НАПРАВЛЕННЫХ НА ДЕПОНИРОВАНИЕ В ВИНТИ

УДК 612.822.1

ВЛИЯНИЕ 6-ГИДРОКСИДОФАМИНА НА СОДЕРЖАНИЕ НОРАДРЕНАЛИНА В ГОЛОВНОМ МОЗГУ КРЫС

ТУРОВСКИЙ В. С.

Установлено, что введение нейротоксина 6-гидроксидофамина (6-ОН-ДА) вызывает избирательное повреждение структуры и функции нейронов катехоламинергической природы. Так как нейроны норадренергической и дофаминергической природы находятся в стволовых структурах головного мозга, а их аксональные терминалы в составленных восходящих пучков простираются в неокортексе, гиппокампе, стриатуме, то представлялось логичным использовать избирательный токсин для катехоламинергических нейронов и проследить в динамике его воздействие на содержание норадреналина (НА) в неокортексе.

6-ОН-ДА (300 мкг на крысу) растворяли в физиологическом растворе и вводили интравентрикулярно билатерально в объеме 20 мкл. Через 3, 5, 22 дня после операции крыс брали в опыт. Исследовали кору больших полушарий и целый головной мозг. Содержание НА определяли флуориметрическим способом и выражали в нг/г сырой массы ткани.

Результаты экспериментов показали, что у интактных крыс содержание НА в ткани целого мозга на 44,7% выше, чем в коре больших полушарий.

Исследование содержания НА в ткани коры головного мозга в динамике интравентрикулярного введения 300 мкг 6-ОН-ДА на животное выявило, что оно уменьшается через 2, 5 и 22 суток в 2,6, 2,2 и 2,0 раза соответственно.

Количество НА при воздействии такой же дозы нейротоксина снижалось в ткани целого мозга через 2 суток — в 6,5 раза, спустя 5 суток — в 2,8 раза, после 22 суток — в 2,9 раза по сравнению с контролем.

На основании проведенных экспериментов установлено, что интравентрикулярное введение специфического нейротоксина — 6-ОН-ДА

избирательно повреждает катехоламинергические структуры головного мозга крыс.

Таким образом, при изменении содержания НА в ткани коры больших полушарий и целого головного мозга после интравентрикулярного введения 6-ОН-ДА на 2-е сутки отмечается наибольшее падение содержания НА в обоих исследованных образцах ткани головного мозга. На 5-е сутки после экспозиции животных с нейротоксином количество НА также значительно снижено по сравнению с контролем. Через 22 суток после воздействия 6-ОН-ДА содержание НА снижено в ткани целого мозга больше, чем в коре больших полушарий. Это свидетельствует о более выраженном повреждении нейротоксином глубоких норадренергических структур мозга.

4 с., ил. 2, библиогр. 14

НИИ гигиены труда и профзаболеваний

МЗ РСФСР, Ленинград

Поступила 11. III 1985

Полный текст статьи депонирован в ВИНТИ 2.08.85. № 5797—85

УДК 577.158

О ДЕЙСТВИИ ЭНКЕФАЛИНОВ НА МОНОАМИНОКСИДАЗУ ГОЛОВНОГО МОЗГА

КАМЫШАНСКАЯ Н. С., МОСКВИТИНА Т. А., ПОЗДНЕВ В. Ф., ГОРКИН В. З.

В настоящее время известно, что некоторые биологически активные пептиды изменяют функции головного мозга, воздействуя, в частности, на метаболизм биогенных аминнов. Ключевыми ферментами катаболизма биогенных аминнов являются моноаминоксидазы (МАО).

Изучали влияние различных концентраций Met- и Leu-энкефалинов на дезаминирование серотонина (5-ОТ), 2-фенилэтиламина (ФЭА) и тирамина (ТМ) митохондриальной МАО мозга быка и человека. Ткань мозга быка исследовали через 1 ч после забоя, а человека — через 9, 28, 57 ч после смерти у мужчин в возрасте 58, 73 и 82 лет. Об активности МАО судили по количеству аммиака, освобождаемого при инкубации исследуемого биологического материала с одним из субстратов при оптимальных условиях.

Leu-энкефалин (1—100 мкМ) вызывал незначительное (от 3 до 20%) торможение окислительного дезаминирования 5-ОТ (но не ФЭА и ТМ), катализируемого митохондриальной МАО мозга быка. Эффект был статистически достоверным, но мог быть обусловлен неспецифическим влиянием относительно высоких концентраций пептидов на биомембраны.

В опытах с митохондриальными мембранами из стволовой части

избирательно повреждает катехоламинергические структуры головного мозга крыс.

Таким образом, при изменении содержания НА в ткани коры больших полушарий и целого головного мозга после интравентрикулярного введения 6-ОН-ДА на 2-е сутки отмечается наибольшее падение содержания НА в обоих исследованных образцах ткани головного мозга. На 5-е сутки после экспозиции животных с нейротоксином количество НА также значительно снижено по сравнению с контролем. Через 22 суток после воздействия 6-ОН-ДА содержание НА снижено в ткани целого мозга больше, чем в коре больших полушарий. Это свидетельствует о более выраженном повреждении нейротоксином глубоких норадренергических структур мозга.

4 с., ил. 2, библиогр. 14

НИИ гигиены труда и профзаболеваний

МЗ РСФСР, Ленинград

Поступила 11. III 1985

Полный текст статьи депонирован в ВИНТИ 2.08.85. № 5797—85

УДК 577.158

О ДЕЙСТВИИ ЭНКЕФАЛИНОВ НА МОНОАМИНОКСИДАЗУ ГОЛОВНОГО МОЗГА

КАМЫШАНСКАЯ Н. С., МОСКВИТИНА Т. А., ПОЗДНЕВ В. Ф., ГОРКИН В. З.

В настоящее время известно, что некоторые биологически активные пептиды изменяют функции головного мозга, воздействуя, в частности, на метаболизм биогенных аминнов. Ключевыми ферментами катаболизма биогенных аминнов являются моноаминоксидазы (МАО).

Изучали влияние различных концентраций Met- и Leu-энкефалинов на дезаминирование серотонина (5-ОТ), 2-фенилэтиламина (ФЭА) и тирамина (ТМ) митохондриальной МАО мозга быка и человека. Ткань мозга быка исследовали через 1 ч после забоя, а человека — через 9, 28, 57 ч после смерти у мужчин в возрасте 58, 73 и 82 лет. Об активности МАО судили по количеству аммиака, освобождаемого при инкубации исследуемого биологического материала с одним из субстратов при оптимальных условиях.

Leu-энкефалин (1—100 мкМ) вызывал незначительное (от 3 до 20%) торможение окислительного дезаминирования 5-ОТ (но не ФЭА и ТМ), катализируемого митохондриальной МАО мозга быка. Эффект был статистически достоверным, но мог быть обусловлен неспецифическим влиянием относительно высоких концентраций пептидов на биомембраны.

В опытах с митохондриальными мембранами из стволовой части

мозга человека было показано, что Met-энкефалин (0,01 мкМ) и Leu-энкефалин (1 мкМ) вызывают небольшое (19,5 и 14% соответственно), но статистически достоверное ингибирование деаминации ФЭА, но не 5-ОТ. Причем увеличение или уменьшение концентраций этих пептидов приводило к исчезновению этого эффекта.

Предположение о том, что эффект был небольшим вследствие разрушения Met- и Leu-энкефалинов пептидазами, присутствующими в митохондриальных мембранах (было исследовано действие 4-членного аналога энкефалинов, не разрушаемого пептидазами, а также введение в систему мощного ингибитора пептидаз—антибиотика бацитрацина) не подтвердилось. Не усиливало этот эффект и исключение Na^+ , играющего важную роль в регуляции взаимодействия морфинорецепторов с лигандами.

Таким образом, в условиях, способствующих наиболее эффективному взаимодействию, Met- и Leu-энкефалины вызывали лишь небольшое, но статистически достоверное торможение активности MAO мозга быка и человека.

6 с., ил. 2, библиогр. 23.
Институт биологической и медицинской
химии АМН СССР, Москва

Поступила 7. I 1985

Полный текст статьи депонирован в ВИНТИ 2.08.85. № 5796-85

УДК 577.151.64—612.015.1

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ MAO ГОЛОВНОГО МОЗГА НОРКИ И КРЫСЫ

МАЛОВ А. М., КОВАНСКИХ А. Е., АНТИПОВ А. Д.

В работе изложены результаты сравнительно-биохимического изучения активности митохондриальной MAO в полушариях головного мозга, межучастном мозгу, мозжечке, заднем и среднем мозгу. В опытах были использованы крысы (*Rattus rattus*)—4-месячные самки и норки (*Mustela vison*)—полугодовалые самцы и самки (нецензившиеся) и двухгодовалые самки из маточного стада. Активность MAO определяли семикарбазиновым методом по продуктам реакции окислительного деаминации субстратов—серотонина, тирамина и бензиламина.

В результате проведенного исследования обнаружено, что мозг норки обладает очень низкой по сравнению с мозгом крысы серотонин-деаминазной активностью, то есть MAO типа А представлена в головном мозгу норки в значительно меньшей степени, чем у крысы. В то же время бензиламиндеаминазная активность мозга норки достоверно выше, чем бензиламиндеаминазная активность мозга крыс соответст-

мозга человека было показано, что Met-энкефалин (0,01 мкМ) и Leu-энкефалин (1 мкМ) вызывают небольшое (19,5 и 14% соответственно), но статистически достоверное ингибирование деаминации ФЭА, но не 5-ОТ. Причем увеличение или уменьшение концентраций этих пептидов приводило к исчезновению этого эффекта.

Предположение о том, что эффект был небольшим вследствие разрушения Met- и Leu-энкефалинов пептидазами, присутствующими в митохондриальных мембранах (было исследовано действие 4-членного аналога энкефалинов, не разрушаемого пептидазами, а также введение в систему мощного ингибитора пептидаз—антибиотика бацитрацина) не подтвердилось. Не усиливало этот эффект и исключение Na^+ , играющего важную роль в регуляции взаимодействия морфинорецепторов с лигандами.

Таким образом, в условиях, способствующих наиболее эффективному взаимодействию, Met- и Leu-энкефалины вызывали лишь небольшое, но статистически достоверное торможение активности MAO мозга быка и человека.

6 с., ил. 2, библиогр. 23.
Институт биологической и медицинской
химии АМН СССР, Москва

Поступила 7. I 1985

Полный текст статьи депонирован в ВИНТИ 2.08.85. № 5796-85

УДК 577.151.64—612.015.1

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ MAO ГОЛОВНОГО МОЗГА НОРКИ И КРЫСЫ

МАЛОВ А. М., КОВАНСКИХ А. Е., АНТИПОВ А. Д.

В работе изложены результаты сравнительно-биохимического изучения активности митохондриальной MAO в полушариях головного мозга, межучастном мозгу, мозжечке, заднем и среднем мозгу. В опытах были использованы крысы (*Rattus rattus*)—4-месячные самки и норки (*Mustela vison*)—полугодовалые самцы и самки (нецензившиеся) и двухгодовалые самки из маточного стада. Активность MAO определяли семикарбазиновым методом по продуктам реакции окислительного деаминации субстратов—серотонина, тирамина и бензиламина.

В результате проведенного исследования обнаружено, что мозг норки обладает очень низкой по сравнению с мозгом крысы серотонин-деаминазной активностью, то есть MAO типа А представлена в головном мозгу норки в значительно меньшей степени, чем у крысы. В то же время бензиламиндеаминазная активность мозга норки достоверно выше, чем бензиламиндеаминазная активность мозга крыс соответст-

вующего возраста и пола, что свидетельствует о большей активности МАО типа Б в мозгу норок по сравнению с мозгом крыс.

Активность МАО и у крыс и у норок минимальна в полушариях головного мозга и максимальна в межуточном мозгу. Установлено, что с возрастом в полушариях мозга, межуточном мозгу и мозжечке норок тираминдезаминная и бензиламиндезаминная активности уменьшаются, тогда как в заднем и среднем увеличиваются.

Распределение тираминдезаминной активности в головном мозгу полугодовых самцов близко к таковой у полугодовых самок, тогда как распределение бензиламиндезаминной активности у этих самцов имеет сходство с распределением подобной активности у двухгодовых самок.

7 с., ил. 4, библиогр. 22.

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

Поступила 12. VI 1985

Полный текст статьи депонирован в ВИНТИ 2. 08. 85. № 5799—85

УДК 616.895.8:577.17

НЕЙРОМЕДИАТОРНЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ В РЕГУЛЯЦИИ ИММУННЫХ РЕАКЦИЙ У БОЛЬНЫХ ШИЗОФРЕНИЕЙ

АЛИЕВ Н. А.

У 20 больных острой и 30—хронической шизофренией исследовано влияние нейромедиаторных аминокислот (аспартат, глицин, ГАМК, глутамат, таурин) на интенсивность иммунных реакций (определение Т-, В-лимфоцитов, иммуноглобулинов А, М, G). Результаты сопоставлены с данными, полученными при обследовании 20 здоровых лиц. Установлено, что у больных острой шизофренией уровень содержания возбуждающих нейромедиаторных аминокислот и иммунных реакций повышен, а ГАМК и таурин—понижен. При хронической шизофрении, наряду с понижением концентрации возбуждающих нейромедиаторных аминокислот и интенсивности иммунных реакций, установлено повышение содержания тормозящих нейромедиаторных аминокислот.

В результате лечения активаторами глутаматергической (глутаминовая кислота, 2 г в день в течение 30 дней) и ГАМК-ергической (конвулксин, по 750 мг на протяжении 21 дня) систем установлено их разнонаправленное действие на исследуемые иммунологические показатели. Выявлено, что стимуляция глутаматергической системы способствует увеличению интенсивности иммунных реакций, а активация ГАМК-ергической системы подавляет иммунный ответ.

Выдвигаемое предположение о существовании регуляторного влия-

вующего возраста и пола, что свидетельствует о большей активности МАО типа Б в мозгу норок по сравнению с мозгом крыс.

Активность МАО и у крыс и у норок минимальна в полушариях головного мозга и максимальна в межуточном мозгу. Установлено, что с возрастом в полушариях мозга, межуточном мозгу и мозжечке норок тираминдезаминная и бензиламиндезаминная активности уменьшаются, тогда как в заднем и среднем увеличиваются.

Распределение тираминдезаминной активности в головном мозгу полугодовалых самцов близко к таковой у полугодовалых самок, тогда как распределение бензиламиндезаминной активности у этих самцов имеет сходство с распределением подобной активности у двухгодовалых самок.

7 с., ил. 4, библиогр. 22.

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

Поступила 12. VI 1985

Полный текст статьи депонирован в ВИНТИ 2. 08. 85. № 5799—85

УДК 616.895.8:577.17

НЕЙРОМЕДИАТОРНЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ В РЕГУЛЯЦИИ ИММУННЫХ РЕАКЦИЙ У БОЛЬНЫХ ШИЗОФРЕНИЕЙ

АЛИЕВ Н. А.

У 20 больных острой и 30—хронической шизофренией исследовано влияние нейромедиаторных аминокислот (аспартат, глицин, ГАМК, глутамат, таурин) на интенсивность иммунных реакций (определение Т-, В-лимфоцитов, иммуноглобулинов А, М, G). Результаты сопоставлены с данными, полученными при обследовании 20 здоровых лиц. Установлено, что у больных острой шизофренией уровень содержания возбуждающих нейромедиаторных аминокислот и иммунных реакций повышен, а ГАМК и таурин—понижен. При хронической шизофрении, наряду с понижением концентрации возбуждающих нейромедиаторных аминокислот и интенсивности иммунных реакций, установлено повышение содержания тормозящих нейромедиаторных аминокислот.

В результате лечения активаторами глутаматергической (глутаминовая кислота, 2 г в день в течение 30 дней) и ГАМК-ергической (конвулекс, по 750 мг на протяжении 21 дня) систем установлено их разнонаправленное действие на исследуемые иммунологические показатели. Выявлено, что стимуляция глутаматергической системы способствует увеличению интенсивности иммунных реакций, а активация ГАМК-ергической системы подавляет иммунный ответ.

Выдвигаемое предположение о существовании регуляторного влия-

яния нейромедиаторных аминокислот на иммунную систему организма больных шизофренией носит гипотетический характер и нуждается в дополнительных клинико-экспериментальных исследованиях. Окончательное решение этой проблемы даст возможность корректировать обнаруженные у больных шизофренией иммунологические нарушения с помощью психофармакологических препаратов.

4 с., ил. 2, библиогр. 6
Психиатрическая больница № 3
Минздрава АзССР, Баку

Поступила 5. V 1985

Полный текст статьи депонирован в ВИНТИ 2. 08. 85. № 5800-85

УДК 577.15:611-018.65

КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИЗОФЕРМЕНТОВ КРЕАТИНКИНАЗЫ МОЗГА

ХВАТОВА Е. М., СЕМЕНОВА Т. С., САВЕЛЬЕВА С. Н.,
ШУМАТОВА Е. Н., ОБРАЗЦОВА Н. Г.

Изучали кинетические свойства и величину У. А. митохондриально-го и цитоплазматического (ВВ) изоферментов мозговой ткани.

Распределение У. А. креатинкиназы (КК) в субклеточных фракциях первой клетки исследовано методом электрофореза на ацетатцеллюлозе. Кинетические исследования выполнены на митохондриальной креатинкиназе, экстрагированной с мембран 0,02 М фосфатным буфером, и растворимой в ВВ изоформе цитозоля.

В работе изучена возможность скорости образования креатина от концентрации Mg^{2+} -ADP и креатинфосфата (КФ). Зависимость начальной скорости реакции от концентрации одного из субстратов определяли на фоне постоянной высокой концентрации второго субстрата.

Определение скорости реакции проводили по креатину методом Энпог, Morrison [18]. Начальную скорость реакции использовали для расчета кинетических констант—кажущейся K_m , p_n и коэффициента q .

Показано, что 35% общей активности КК сосредоточено в митохондриях мозговой ткани, а 67% клеточной активности локализовано в цитозоле в виде ВВ изоформы.

Кинетическими исследованиями установлен гиперболический характер зависимости скорости реакции для обоих изоферментов при изменяющихся концентрациях Mg^{2+} -ADP.

По отношению к КФ у митохондриального изофермента выявлены отклонения от кинетики Михаэлиса-Ментен с изменением коэффициентов кооперативности (p_n , q) до величин меньше единицы. Расчет кин-

яния нейромедиаторных аминокислот на иммунную систему организма больных шизофренией носит гипотетический характер и нуждается в дополнительных клинико-экспериментальных исследованиях. Окончательное решение этой проблемы даст возможность корректировать обнаруженные у больных шизофренией иммунологические нарушения с помощью психофармакологических препаратов.

4 с., ил. 2, библиогр. 6
Психиатрическая больница № 3
Минздрава АзССР, Баку

Поступила 5. V 1985

Полный текст статьи депонирован в ВИНТИ 2. 08. 85. № 5800-85

УДК 577.15:611-018.65

КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИЗОФЕРМЕНТОВ КРЕАТИНКИНАЗЫ МОЗГА

ХВАТОВА Е. М., СЕМЕНОВА Т. С., САВЕЛЬЕВА С. Н.,
ШУМАТОВА Е. Н., ОБРАЗЦОВА Н. Г.

Изучали кинетические свойства и величину У. А. митохондриально- и цитоплазматического (ВВ) изоферментов мозговой ткани.

Распределение У. А. креатинкиназы (КК) в субклеточных фракциях нервной клетки исследовано методом электрофореза на ацетатцеллюлозе. Кинетические исследования выполнены на митохондриальной креатинкиназе, экстрагированной с мембран 0,02 М фосфатным буфером, и растворимой в ВВ изоформе цитозоля.

В работе изучена возможность скорости образования креатина от концентрации Mg^{2+} -ADP и креатинфосфата (КФ). Зависимость начальной скорости реакции от концентрации одного из субстратов определяли на фоне постоянной высокой концентрации второго субстрата.

Определение скорости реакции проводили по креатину методом Энпог, Morrison [18]. Начальную скорость реакции использовали для расчета кинетических констант—кажущейся K_m , p_i и коэффициента q .

Показано, что 35% общей активности КК сосредоточено в митохондриях мозговой ткани, а 67% клеточной активности локализовано в цитозоле в виде ВВ изоформы.

Кинетическими исследованиями установлен гиперболический характер зависимости скорости реакции для обоих изоферментов при изменяющихся концентрациях Mg^{2+} -ADP.

По отношению к КФ у митохондриального изофермента выявлены отклонения от кинетики Михаэлиса-Ментен с изменением коэффициентов кооперативности (p_n , q) до величин меньше единицы. Расчет кин-

нстических констант показал сродство митохондриального и ВВ изоферментов мозговой ткани к КФ (K_m — 2,0 и 1,2 мМ) и к Mg^{2+} -ADP (K_m — 0,77 и 0,45 мМ) соответственно, что подтверждается литературными данными. ВВ изофермент КК мозга мало отличим от ВВ изофермента других тканей. Митохондриальная КК мозга, напротив, отличается от таковой сердечной мышцы.

Установленные отклонения от нормальной кинетики Михаэлиса-Ментен в поведении митохондриального фермента при взаимодействии с гуанидиновыми субстратами могут быть связаны с межсубъединичным взаимодействием в молекуле изучаемого фермента или с наличием в мозгу нескольких форм митохондриального фермента (Wevers, 1981).

5 с., ил. 4, библиогр. 25

Кафедра биохимии Медицинского института, Гельский

Поступила 25. IV 1985

Полный текст статьи депонирован в ВИНТИ 2.08.85. № 5798—85

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

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

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

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

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

Под списком литературы слова 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 фотографий (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 сокращения 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.

СОДЕРЖАНИЕ

К 100-летию со дня рождения академика А. В. Палладина (1885—1972)	237
Полежаев А. Б., Грудень М. А. Изучение эндогенных белковых лигандов моз- госпецифических белков группы S-100	245
Коган А. Б., Калинин И. И., Гусатинский В. Н. Белковый спектр одиночного нейрона в контролируемом функциональном состоянии	254
Тонких А. К., Кузнецов В. И., Каранова М. В., Садыков А. А. Волнообразный характер кривых связывания ^3H -ГАМК и ^3H -мусцимола с мембранами из мозга крыс и мыши саранчи	260
Панушева Н. И., Доведова Е. Л. Метаболизм биогенных аминов в субклеточных структурах двигательной системы головного мозга крыс при длительной гипокинезии	268
Калинина С. Н., Этингер Р. Н. Характеристика антител к GTP-связывающим белкам наружных сегментов палочек сетчатки	276
Микеладзе Д. Г., Качарова Д. Г., Глаздя Н. В. Активация кальциевых каналов синапсом некоторыми фосфолипидными нервными тканями	284
Горбунов Н. В., Аннанесова Х. Н. Продукты перекисного окисления липидов и состав жирных кислот липидов синапсом головного мозга мышей «Quaking» и мышей с острой вирусной демиелинизацией	290

Краткие сообщения

Свами М., Прасад М. С. К., Садасивуду Б. Влияние аммиака на некоторые ферменты цикла мочевины и орнитин-аминотрансферазу головного мозга	296
Карагезян К. Г., Самаян В. М., Овсейян Л. М., Мамаджанян Л. З., Захарян Э. К. Изучение процессов перекисного окисления и обмена фосфолипидов при экспериментальном отеке мозга	301
Тюлькова Е. И., Павлинова Л. И. Метаболизм полифосфонитов мозга при его ишемии	306
Зинченко В. А., Сытинский И. А. Активность γ -глутамилтрансферазы в спин- номозговой жидкости больных с острыми нарушениями мозгового кро- вообращения	310

Обзоры

Кричевская А. А., Бондиренко Т. И., Маклецова М. Г. Гомокарбонизм: метабо- лизм и функции	314
Романенко А. В. Захват аденозина нервными окончаниями и его регуляция	327

Рецензии

Гасбов Р. И., Болдырев А. А. Биологические мембраны и транспорт ионов	337
---	-----

Рефераты статей, направленных на депонирование в ВИНТИ

Туровский В. С. Влияние 6-гидроксидофамина на содержание норадреналина в головном мозгу крыс	339
Камышанская Н. С., Москвитина Т. А., Позднеев В. Ф., Горкин В. З. О действии энкефалинов на моноаминоксидазу головного мозга	340
Малов А. М., Хованских А. Е., Антипов А. Д. Сравнительное изучение актив- ности митохондриальной МАО головного мозга норки и крысы	341
Алиев Н. А. Нейромедиаторные аминокислоты в регуляции иммунных реакций у больных шизофренией	342
Хватова Е. М., Семенова Т. С., Савельева С. Н., Шуматова Е. Н., Образцова Н. Г. Кинетические свойства изоферментов креатинкиназы мозга	343

CONTENTS

On the centenary of academician Palladin Alexander Vladimirovich birthday (1885—1972)	237
Poletayev A. B., Gruden M. A. Endogenous protein ligands of brain-specific protein of S-100 group	245
Kogan A. B., Kaminsky I. I., Gusatinsky V. N. Protein spectre of a single neuron in a functionally controlled condition	254
Tonkykh A. K., Kuznetsov V. I., Karanova M. V., Sadykov A. A. Wave-form curves of the rat brain and locust muscle membrane binding with ^3H -GABA and ^3H -muscimol	260
Panousheva N. N., Dovedova E. L. Metabolism of biogenic amines in rat brain motor system subcellular structures under the prolonged hypokinesia	268
Kalinina S. N., Etingof R. N. Characteristics of antibodies against GTP-binding proteins from retinal rods outer segments	276
Mikeladze D. G., Kacharava D. G., Gvalia N. B. Activation of calcium channels of synaptosomes by some nerve tissue phosphopeptides	284
Gorbunov N. V., Annanepesov H. N. A comparative study of lipid peroxidation products and phospholipid fatty acid composition in mice brain synaptosomes under acute viral demyelination and genetic demyelination	290

Short communications

M. Swamy, M. S. K. Prasad, Sadastvudu B. Effect of ammonia on some enzymes of urea cycle and ornithine aminotransferase in brain	296
Karagezyan K. G., Samvelyan W. M., Ovsepyan L. M., Mamadzhanyan L. Z., Zakhar'yan E. K. Lipid peroxidation and metabolism of phospholipids in experimental cerebral edema	301
Tulkova E. I., Pavlinova L. I. Metabolism of brain polyphosphoinositides in ischemia	306
Zinchenko V. A., Sytinsky I. A. Activity of gamma-glutamyltransferase (GGTF) in cerebrospinal fluid of patients with acute disturbances of cerebral blood circulation	310

Reviews

Krichevskaja A. A., Bondarenko T. I., Makletsova M. G. Homocarnosine. Metabolism and function	314
Romanenko A. V. Adenosine uptake by nerve endings and its regulation	327

Comments

Glebov R. N., Beldyrev A. A. Biological membranes and ion transport	337
---	-----

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

Turovsky V. S. Effect of 6-hydroxydopamine on noradrenalin content in rat brain	339
Kamyshanskaya N. S., Moskvitina T. A., Pozdnev V. F., Gorkin V. Z. Effect of enkephalins on brain MAO	340
Malov A. M., Khevasykh A. E., Antipov A. D. Comparison of mitochondrial MAO activity in mink and rat brain	341
Aliev N. A. Involvement of neurotransmitter amino acids in the regulation of immune response in schizophrenia	342
Khvatoeva E. M., Semanova T. S., Savelyeva S. N., Shumatova E. N., Obraztsova N. G. Kinetic properties of brain creatine kinase isoenzymes	343