

том 4. №4. 1985

ISSN 0203-493X

НЕЙРОХИМИЯ

ՆԵՅՂՈՔԻՄԻԱ



АКАДЕМИЯ НАУК СССР
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

НЕЙРОХИМИЯ ՆԵՅՐՈՔԻՄԻԱ

ТОМ 4, ВЫП. 4.
октябрь—декабрь

Журнал основан в 1982 году
Выходит 4 раза в год

ИЗДАТЕЛЬСТВО АН АРМЯНСКОЙ ССР
ЕРЕВАН 1985

Ст. редактор ХАЧАТУРОВА Э. А.

Техн. редактор АЗИЗБЕКЯН Л. А.

Сдано в набор 9.10. 1985 г. Подписано к печати 29.12. 1985 г. ВФ 05768
Бумага № 1, 70×108¹/₁₆. Высокая печать. Печ. лист. 7,63+2 вкл. Усл. печ. лист. 10
Учет. изд. 8,98. Тираж. 666. Заказ 1033. Издат. 6648.

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.

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. Крепе, А. А. Кричевская, Р. М. Налбандян, М. Ш. Промыслов, В. И. Розенгарт, Л. Я. Тяхепылд, Г. С. Хачатрян

Редакционный совет

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

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 CPA 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 осуществлять во всех отделениях «Союзпечати» (индекс для подписки—77787), а за границей—через агентство «Международная книга».

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



ЕВГЕНИЙ МИХАЙЛОВИЧ КРЕПС

(1899—1985)

Советская и мировая наука понесла тяжелую утрату—скончался крупнейший биолог нашего времени, один из основателей эволюционной физиологии и биохимии в нашей стране, всемирно известный нейрехимик, академик Евгений Михайлович Крепс. Перестало биться сердце большого доброго человека, выдающегося ученого, подлинного естественнспытателя-натуралиста, талантливого организатора науки. Он прожил долгую, активную жизнь и умер внезапно в разгаре кипучей деятельности.

Работа в лабораториях таких корифеев физиологии, как И. П. Павлов и Л. А. Орбели привлекла Евгения Михайловича Крепса к проблемам сравнительной и эволюционной физиологии и биохимии, которые стали предметом его научных исследований на протяжении всей жизни. Своими фундаментальными исследованиями он внес существенный вклад в развитие сравнительной физиологии высшей нервной деятельности.

Хорошо известны заслуги Евгения Михайловича в разработке концепции о метаболических основах адаптационно-трофической функции нервной системы, что способствовало созданию биохимической канвы физиологических процессов. Широкую известность получили работы академика Е. М. Крепса и его школы по биохимической эволюции головного мозга, по эволюции буферных систем, ферментов и дыхательных пигментов крови. Всемирную известность и признание получили также результаты исследований Е. М. Крепса и его учеников по эволюции липидов. Его недавно вышедшая монография «Липиды клеточных мембран» является замечательным подарком нейробиологам мира. Блестящее сочетание физиологии и биохимии, подведение физико-химической основы к сложнейшим физиологическим процессам—характерная черта учения Е. М. Крепса о липидах нервной системы.

Герой Социалистического труда, академик Е. М. Крепс до конца своей жизни обладал исключительной трудоспособностью. Совсем недавно в нашем журнале, одним из самых активных членов редколлегии которого являлся Е. М. Крепс, была опубликована большая статья о его славном 85-летнем юбилее, в которой отмечалось, что он встре-

чает эту дату в расцвете сил и высокой научной и общественной активности. В ближайшее время выйдет в свет специальный номер журнала «*Neurochemical Research*», издаваемого в США, посвященного академику Е. М. Крепсу. По традиции этого журнала такие номера посвящаются при жизни ученым, обогатившим нейробиологию исследованиями первостепенной важности.

Большой вклад внес Е. М. Крепс в подготовку высококвалифицированных кадров биохимиков не только в Институте сравнительной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова АН СССР, но и в других научных центрах страны. Можно надеяться, что многочисленные ученики академика Е. М. Крепса будут успешно продолжать развитие его идей по самым актуальным проблемам молекулярной нейробиологии и эволюции функций.

Наш народ потерял одного из своих замечательных сынов, большого патриота родины, крупнейшего ученого-мыслителя и человека большого личного обаяния, жизненный путь которого является хорошим примером для воспитания грядущего поколения.

Его светлый образ навсегда сохранится в наших сердцах.

РЕДКОЛЛЕГИЯ



УДК 612.892.1+612.815.1

ДЕЙСТВИЕ 6-ОКСИДОФАМИНА НА ГАМК-РЕЦЕПТОРЫ КОРЫ МОЗГА КРЫС

ПАРФЕНОВА Е. В.

Институт экспериментальной медицины АМН СССР, Ленинград

Синаптические мембраны, выделенные из коры головного мозга крыс через 5 суток после интракостеринального введения 6-оксидофамина (300 мкг), имеют повышенную способность к Na^+ -независимому связыванию ^3H -ГАМК. Это обусловлено 2—3-кратным снижением общего числа рецепторных участков и не связано с изменением активности эндогенных ингибиторов ГАМК-рецепторов. Функционирующие рецепторы проявляют повышенное сродство к лиганду. Полученные данные свидетельствуют о тесной взаимосвязи между ГАМК- и катехоламинергическими системами в коре головного мозга крыс.

6-оксидофамин (6-ОН-ДОФА), являясь природным неметаболизруемым аналогом дофамина, широко используется в нейроморфологических и нейрохимических исследованиях как нейротоксин специфического действия («ложный медиатор»), вызывающий повреждения катехоламинергической системы головного мозга [1]. Введение 6-ОН-ДОФА в желудочки мозга приводит к снижению содержания норадреналина и дофамина [2, 3], потере способности нервного волокна к возбуждению [4] и дегенеративным перестройкам терминалей катехоламинергических (КА-ергических) нейронов [5—7]. При этом содержание в мозгу других нейромедиаторов (АХ, ГАМК, глутамат) практически не изменяется [8]. Обнаруженные отклонения касаются как основных КА-ергических центров (черная субстанция, голубое пятно) и сопряженных с ними образований стриопаллидарной системы, так и коры головного мозга [6, 7]. Известно, что в коре осуществляется контакт КА-ергической системы с системами иной медиаторной природы, в частности, тормозной ГАМК-ергической, что создаёт структурный базис для межмедиаторных взаимодействий, с помощью которых интегрируется деятельность ЦНС. Задачей нашего исследования было изучение изменений, возникающих в рецепторном звене ГАМК-ергической системы коры головного мозга крыс в результате селективного повреждения КА-ергической системы 6-ОН-ДОФА.

Материалы и методы

Опыты проводили на крысах-самцах линии Wistar массой 180—200 г. Крысам под эфирным наркозом интрацестерально вводили 300 мкг 6-ОН-ДОФА в 20 мкл физиологического раствора. Контрольным животным вводили по 20 мкл физиологического раствора. В опытах использовали также интактных животных. Через 5 суток крыс декапитировали, отделяли кору больших полушарий и замораживали её на 1—2 суток при -18° .

Фракцию синаптических мембран из коры головного мозга получали с помощью дифференциального центрифугирования клеточного гомогената по методу Zukin и соавт. [9], используя модификацию, предложенную Дамбиновой и Горюхиным [10]. Чистоту полученной фракции контролировали электронномикроскопически. Для фиксации предварительно осажденных центрифугированием мембран использовали 2,5%-ный глутаральдегид и 1%-ный раствор четырехокиси осмия. Проводку и заливку материала выполняли общепринятыми методами.

Полученные синаптические мембраны замораживали на 1—2 суток при -18° . После оттаивания их промывали 5—6 раз 50 мМ трис-цитратным буфером pH 7.4 с последующим осаждением при 45000g в течение 20 мин или же предварительно обрабатывали 0,05%-ным тритоном X-100 в течение 30 мин при 37° .

Для определения Na^{+} -независимого связывания ^3H -ГАМК 10—40 мкг (по белку) синаптических мембран инкубировали в течение 10 мин при $0-4^{\circ}$ с 5—200 нМ ^3H -ГАМК (32 Ки/ммоль, Ленинград) в 1 мл трис-цитратного буфера pH 7.4 [9, 11]. Неспецифическое связывание определяли при наличии в инкубационной среде 1 мМ немеченой ГАМК («Fluka», Швейцария). В наших опытах оно составляло менее 30% от общего связывания метки. Специфическое связывание получали путем вычитания значений неспецифического связывания из величины общего связывания. Реакцию останавливали быстрой фильтрацией проб под вакуумом через целлюлозные фильтры с диаметром пор 0,42 мкм («Synpro», СССР) [11]. Осажденные на фильтрах синаптические мембраны промывали 10-кратным объемом холодного буфера. После высушивания фильтры помещали в вials, заливали сцинтилляционной жидкостью (5 г PPO и 50 мг POPOP в 1 л толуола) и измеряли радиоактивность на счетчике Mark II («Nuclear Chicago», США).

Активность эндогенных ингибиторов ГАМК-рецепторов оценивали по простоте Na^{+} -независимого связывания ^3H -ГАМК после обработки синаптических мембран 0,05%-ным тритоном X-100 и способности ингибиторсодержащего экстракта, полученного после осаждения замороженных-оттаявших синаптических мембран, снижать Na^{+} -независимое связывание ^3H -ГАМК с обработанными 0,05%-ным тритоном X-100 синаптическими мембранами коры мозга интактных животных.

Содержание белка определяли по методу Lowry и соавт. после предварительного гидролиза синаптических мембран в NaOH [12].

Результаты и обсуждение

Электронномикроскопическое исследование фракции синаптических мембран из коры головного мозга крыс. Электронномикроскопическое исследование позволило показать, что полученный нами препарат представляет собой совокупность разрушенных осмотическим шоком мембранных структур. Выявляются области синаптических контактов и постсинаптические уплотнения. Некоторые структуры образуют замкнутые везикулы, заполненные пузырьками, по строению и размерам сходными с синаптическими. Вместе с тем часть синаптических пузырьков в результате осмотического шока высвобождается из мемб-

ранных везикул. Полученный препарат оказался практически полностью лишен митохондриальных примесей, в поле зрения лишь изредка попадаются единичные митохондрии. Это представляется принципиально важным, так как митохондрии содержат ГАМК-утилизующие ферменты и согласно приводимым в литературе [13] и нашим неопубликованным данным, способны к связыванию ^3H -ГАМК, что искажает получаемые результаты и затрудняет оценку ГАМК-рецепторов синаптических мембран.

Na⁺-независимое связывание ^3H -ГАМК синаптическими мембранами коры мозга крыс через 5 суток после введения 6-ОН-ДОФА. Na⁺-независимое связывание ^3H -ГАМК с синаптическими мембранами, которое идентично связыванию ГАМК с постсинаптическими рецепторными участками [9], может быть выявлено только после замораживания-оттаивания мембран с последующими их промывками гипотоническим буфером [9, 14]. Такая обработка способствует вымыванию из мембранной фракции эндогенной ГАМК, конкурирующей с меченым лигандом за участки связывания [15, 16]. Кроме того, согласно полученным нами данным, при замораживании-оттаивании от синаптических мембран отделяются Фолли-положительные соединения полипептидной природы с максимумом поглощения при 280 нм. Они снижают Na⁺-независимое связывание ^3H -ГАМК и поэтому могут быть отнесены к эндогенным ингибиторам, роль которых в функционировании ГАМК-рецепторов интенсивно обсуждается [15, 17—19]. Ещё большего увеличения специфического связывания ^3H -ГАМК можно достичь с помощью обработки предварительно замороженных и оттаявших мембран тритоном X-100, который в концентрациях 0,01—0,1% также способствует отделению от мембран эндогенных ингибиторов ГАМК-рецепторов [15].

Na⁺-независимое связывание ^3H -ГАМК изучалось как на многократно промытых гипотоническим буфером, так и на предварительно обработанных 0,05%-ным тритоном синаптических мембранах из коры мозга подопытных и контрольных крыс. Исследуемые пробы содержали 100 нМ ^3H -ГАМК. Данные, представленные в табл. 1, свидетельствуют о том, что синаптические мембраны, выделенные из коры мозга подопытных крыс через 5 суток после введения им 6-ОН-ДОФА, имеют пониженную способность к рецепторному связыванию ^3H -ГАМК. Это наблюдается как на промытых буфером, так и на обработанных детергентом мембранах.

Кинетический анализ связывания ^3H -ГАМК при различных концентрациях меченого лиганда в среде инкубации, проведенный по методу Скэтчарда [20], показал, что синаптические мембраны, выделенные из коры мозга подопытных животных, имеют в 2—3 раза меньшее общее число участков связывания (B_{max}) по сравнению с мембранами коры мозга контрольных животных (рис. 1, табл. 2). Вместе с тем K_d у подопытных крыс в 1,5—4 раза ниже, чем у контрольных, что

свидетельствует о повышении сродства рецепторных участков к лиганду у подопытных животных (табл. 2).

Таблица 1

Na⁺-независимое связывание ³H-ГАМК синаптическими мембранами коры мозга крыс через 5 суток после интрацеребрального введения 6-ОН-ДОФА (300 мкг на крысу)

Условия получения синаптических мембран	Na ⁺ -независимое связывание ³ H-ГАМК		
	Специфическое связывание		
	контроль	опыт	
	нмг/мг-н/ мг белка	нмг/мг-н/ мг белка	% к контролю
Промывка буфером	10,300±2,500 (5)	4,200±1,100*	40
Обработка тритоном	22,500±3,600 (7)	14,200±2,800*	60

Примечание. В скобках указано количество опытов. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем

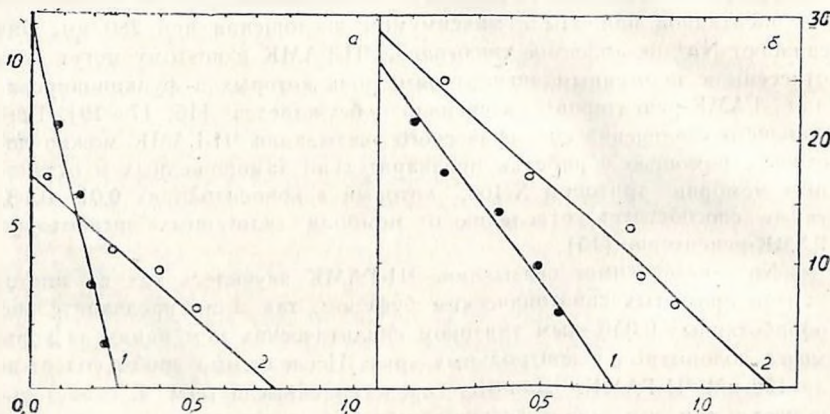


Рис. 1. Графики Скэтчарда для связывания ³H-ГАМК синаптическими мембранами коры мозга подопытных и контрольных крыс. а—промытые буфером мембраны; б—обработанные 0,05% тритоном X-100 мембраны. 1—мембраны из коры мозга подопытных крыс, 2—мембраны из коры мозга контрольных крыс. По оси абсцисс—связанная ³H-ГАМК (пмоль/мг белка), по оси ординат—связанная ³H-ГАМК/свободная ³H-ГАМК (фмоль/мг белка/нМ)

Обнаруженное уменьшение числа ГАМК-связывающих участков в коре мозга подопытных животных может быть обусловлено как утратой рецепторов, так и, вероятно, изменением активности эндогенных ингибиторов. Эти вещества, согласно приводимым в литературе данным, участвуют в регуляции ГАМК-ергической синаптической передачи на

уровне постсинаптической мембраны, обратимо уменьшая число высокочувствительных ГАМК-рецепторов и изменяя их сродство к лиганду [15—18]. Для проверки этого предположения была проанализирована активность эндогенных ингибиторов ГАМК-рецепторов в коре мозга подопытных и контрольных крыс.

Таблица 2

Кинетические параметры Na^+ -независимого связывания ^3H -ГАМК синаптическими мембранами коры мозга крыс через 5 суток после интрацеребрального введения 6-ОН-ДОФА (300 мкг на крысу)

Условия получения синаптических мембран	Специфическое Na^+ -независимое связывание ^3H -ГАМК			
	контроль		опыт	
	K_d (нМ)	$B_{\text{макс}}$ (нмоль/мг)	K_d (нМ)	$B_{\text{макс}}$ (нмоль/мг)
Промывка буфером Обработка тритоном	100 ± 10	$0,70 \pm 0,10$	$22 \pm 5^*$	$0,28 \pm 0,04^*$
	40 ± 5	$1,25 \pm 0,2$	$24 \pm 6^*$	$0,70 \pm 0,05^*$

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

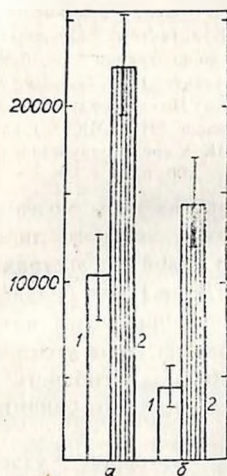


Рис. 2. Изменение Na^+ -независимого связывания ^3H -ГАМК синаптическими мембранами коры мозга контрольных (а) и подопытных (б) крыс после их обработки 0,05%-ным тритоном X-100. 1—мембраны, промытые буфером. 2—мембраны, обработанные тритоном X-100. По оси ординат—специфическое связывание ^3H -ГАМК с мембранами (нм/нм/мг белка), концентрация ^3H -ГАМК в среде инкубации равна 100 нМ

Активность эндогенных ингибиторов ГАМК-рецепторов в коре мозга крыс через 5 суток после введения 6-ОН-ДОФА. Обработка синаптических мембран коры мозга 0,05%-ным тритоном X-100 приводит к повышению уровня Na^+ -независимого связывания ^3H -ГАМК как у контрольных животных, так и у крыс, подвергшихся воздействию нейротоксина (рис. 2). Это указывает на присутствие эндогенных ингибиторов в синаптических мембранах животных обеих групп. Следует от-

метить, что удаление ингибиторов обработкой мембран детергентом хотя и приводит к 3-кратному возрастанию рецепторного связывания ^3H -ГАМК в коре мозга опытных животных, однако не поднимает его до уровня связывания с обработанными детергентом мембранами контрольных животных (рис. 2). Определение величины прироста связывания ^3H -ГАМК после обработки мембран низкими концентрациями детергента в стандартных условиях—косвенный метод оценки активности эндогенных ингибиторов, широко используемый в литературе [21, 22].

Эндогенные ингибиторы могут быть отделены от синаптических мембран не только в результате их обработки детергентами, но и при замораживании-оттаивании разрушенных осмотическим шоком и промытых гипотоническими буферными растворами мембран. Надсалоочные жидкости, полученные после осаждения замороженных-оттаивших синаптических мембран коры больших полушарий подопытных и контрольных крыс, дозозависимым образом ингибируют связывание ^3H -ГАМК с обработанными детергентом мембранами коры мозга интактных крыс (рис. 3). Кривые ингибирования имеют характер насы-

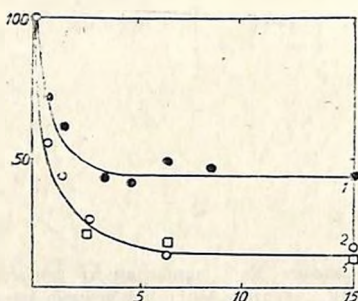


Рис. 3. Влияние эндогенных ингибиторов из коры мозга подопытных и контрольных крыс на Na^+ -независимое связывание ^3H -ГАМК синаптическими мембранами коры мозга интактных животных. 1—ингибитор из коры мозга подопытных, 2—контрольных, 3—интактных животных. По оси абсцисс—концентрация ингибиторсодержащего экстракта (мкг белка/мл инкубационной среды). По оси ординат—специфическое связывание ^3H -ГАМК (%), концентрация ^3H -ГАМК в среде инкубации равна 100 нМ

щения. При этом содержащий ингибитор экстракт из коры мозга подопытных крыс снижает специфическое связывание меченого лиганда не более чем на 50% ($\text{ИД}_{50}=5$ мкг белка/мл), а такой же экстракт из коры мозга контрольных животных—на 85% ($\text{ИД}_{50}=1$ мкг белка/мл), что совпадает с характеристиками ингибитора из коры мозга интактных крыс. Таким образом, эндогенные ингибиторы из коры мозга подопытных крыс имеют пониженную ингибирующую способность, что свидетельствует об относительно меньшем их содержании в синаптических мембранах.

Полученные в этом разделе работы данные позволяют утверждать, что наблюдаемое в коре мозга подопытных животных снижение числа ГАМК-связывающих участков не является следствием изменения активности эндогенных ингибиторов. Напротив, количество ингибиторов в коре мозга подопытных животных снижается. Это согласуется с приводимыми в литературе данными о том, что эндогенные ингибиторы тесно сопряжены с ГАМК-рецепторами и, возможно, составляют с ними в функциональном отношении единое целое [18].

Таким образом, через 5 суток после интрацестерального введения 6-ОН-ДОФА в коре головного мозга крыс, наряду с выраженными дегенеративными изменениями терминалей КА-ергических нейронов и снижением уровня катехоламинов [7], наблюдаются значительные перестройки в рецепторном звене ГАМК-ергической системы. Отмечено 2—3-кратное снижение числа ГАМК-рецепторных участков, не связанное с увеличением активности эндогенных ингибиторов и, вероятно, обусловленное утратой более половины ГАМК-рецепторов под влиянием нейротоксина. Функционирующие ГАМК-рецепторы проявляют повышенное сродство к медиатору, что можно рассматривать как компенсаторное явление, обеспечивающее гиперчувствительность нейронов. Аналогичные изменения (снижение общего числа рецепторных участков и увеличение их сродства к лиганду) были обнаружены в бензодиазепиновых рецепторах коры головного мозга крыс после внутривентрикулярного введения им 6-ОН-ДОФА [23]. Известно, что эти рецепторы функционально тесно взаимосвязаны с ГАМК-рецепторами и, возможно, составляют с ними единый комплекс [18]. Если считать твердо установленным факт строгой специфичности действия 6-ОН-ДОФА на КА-ергическую систему, то полученные в нашей работе данные свидетельствуют о тесной структурно-функциональной связи между КА- и ГАМК-ергическими системами в коре головного мозга крыс. Вместе с тем значительная выраженность обнаруженных нами изменений выдвигает вопрос о возможности непосредственного влияния 6-ОН-ДОФА на ГАМК-рецепторы.

ACTION OF 6-HYDROXYDOPAMINE ON GABA-RECEPTORS IN RAT BRAIN CORTEX

PARFENOVA E. V.

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

Synaptic membranes isolated from rat brain cortex 5 days after intracisternal injection of 6-hydroxydopamine (300 μ g) exert a decreased ability for Na^+ -independent binding of H^3 -GABA. These changes are due to a 2—3 fold decrease in the total number of binding sites for H^3 -GABA and have nothing to do with the change of activity of GABA endogenous inhibitors. Functioning GABA-receptors show an increased affinity for the ligand. Data presented point to a close interrelation between GABA-ergic and catecholaminergic systems in rat brain cortex.

ЛИТЕРАТУРА

1. Breese J. B.—In: Handbook of Psychopharmacology (Iversen L. L., Iversen S. B., Snyder S. H., eds.), v. 1, p. 137—189, N. Y. Plenum Press, 1975.
2. Uretsky N. J., Iversen L. L. J. Neurochem, v. 17, № 2, p. 269—278, 1970.
3. Sachs C., Jonsson G. Biochem. Pharmacol., v. 24, № 1, p. 1—8, 1975.

4. *Jonsson G.* Med. Biol., v. 54, № 4, p. 406—420, 1976.
5. *Hedreen J. C., Chalmers J. P.* Brain Res., v. 37, № 1, p. 1—36, 1972.
6. *Отеллин В. А., Гилерович Е. Г., Усова Н. И.* Архив анатомии гистол. и эмбриол., т. 86, № 3, с. 14—22, 1984.
7. *Отеллин В. А., Кучеренко Р. П., Гилерович Е. Г., Усова Н. П., Федосихина Л. А., Григорьев И. П., Неокесарийский А. А.* Журн. невропатол. и психиатрии, т. 7, с. 978—981, 1984.
8. *Jacks B., De Champlain J., Cordeau J.—P.* Eur. J. Pharmacol., v. 18, № 3, p. 353—360, 1972.
9. *Zukin S. R., Young A. B., Snyder S. H.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 71, № 14, p. 4802—4807, 1974.
10. *Дамбинова С. А., Городинский А. И.* Биохимия, т. 49, № 1, с. 67—75, 1984.
11. *Patel S. C., Peck E. J.* J. Neurosci. Res., v. 8, № 5, p. 603—611, 1982.
12. *Lowry O. H., Rosenbrough W. J., Farr A. L., Randell R. J.* J. Biol. Chem., v. 193, № 1, p. 265—275, 1951.
13. *Varga V., De Feudis F. Y., Ossola L., Geffard M., Mandel P.* Biochem. Pharmacol., v. 29, № 7, 1077—1079, 1980.
14. *Lester B. L., Peck E. J.* Brain Res., v. 161, № 1, p. 79—97, 1979.
15. *Massotti M., Guidotti A., Costa E.* J. Neurosci., v. 1, № 4, p. 409—418, 1981.
16. *Gardner C. R., Klejn J., Grove J.* Eur. J. Pharmacol., v. 75, № 1, p. 83—92, 1981.
17. *Guidotti A., Konkel D. R., Ebstein B., Corda M. G., Wise B. C., Krutzsch H., Meek J. L., Costa E.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 69, № 19, p. 6084—6088, 1982.
18. *Costa E.*—In: Receptor as supramolecular entities (Biggio G., Costa E., eds.), p. 213—235, Pergamon Press, 1983.
19. *Парфёнова Е. В.* Цитология, т. 26, № 9, с. 1076, 1984.
20. *Scatchard E. G.* Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 51, № 6, p. 660—672, 1949.
21. *Scerritt J. H., Johnston G. A.* Devel. Neurosci., v. 5, № 2, p. 189—197, 1982.
22. *Palacios J., Nichoff D. L., Kuhar M. J.* Brain Res., v. 179, № 2, p. 390—395, 1979.
23. *Sabato U. C., Novas M. L., Lowenstein P., Zieher L. M., De Robertis E.* Eur. J.

Поступила 28. III 1985



УДК 612.822.1

О ПРЕСИНАПТИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ СЕРТОНИНА В МЕЗОДИЭНЦЕФАЛЬНОЙ ОБЛАСТИ МОЗГА КРЫС

АРМЕНЯН А. Р., АРАКЕЛЯН Л. Н., ГАЛОЯН А. А.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Изучено влияние ГАМК, норадреналина и морфина на K^+ -вызванное высвобождение 3H -серотонина из синапсом мезодиэнцефальной области мозга крыс. ГАМК (10^{-3} М) и норадреналин (10^{-7} — 10^{-5} М) не изменяют K^+ -вызванное Ca^{2+} -зависимое высвобождение 3H -серотонина из синапсом. Морфин (10^{-4} — 10^{-3} М) подавляет вызванное высвобождение 3H -серотонина из синапсом, и этот эффект блокируется в присутствии налоксона (10^{-4} М). Предполагается, что в мезодиэнцефальной области мозга отсутствует ГАМК- и норадренергическая регуляция высвобождения серотонина на уровне нервных окончаний, тогда как опиатные нейроны участвуют в регуляции высвобождения серотонина, действуя непосредственно на серотонинергические нервные окончания.

Проблема взаимодействия нейромедиаторов в последние годы привлекает должное внимание исследователей, так как баланс между разными нейромедиаторными системами играет важную роль в регуляции функции мозга.

Мезодиэнцефальная область мозга богата ГАМК-ергическими, норадренергическими и серотонинергическими нервными окончаниями. Возможно, что в этой области существует взаимодействие между упомянутыми системами на уровне нервных окончаний. Результаты наших исследований последних лет свидетельствуют о том, что в этой области мозга ГАМК регулирует высвобождение норадреналина [1—3].

Установлено, что ГАМК тормозит вызванное высвобождение как эндогенного, так и экзогенного серотонина из срезов мезодиэнцефальной области [4, 5]. Однако эти данные еще не свидетельствуют о влиянии ГАМК на уровень серотонинергических нервных окончаний. С целью выяснения этого вопроса мы изучали в данной работе влияние ГАМК на вызванное высвобождение 3H -серотонина из синапсом мезодиэнцефальной области.

Несомненный интерес представляет также изучение участия норадренергической системы и опиатных рецепторов, обнаруженных на

катехоламинергических [6, 7] и ГАМК-ергических [8] нервных окончаний, в регуляции высвобождения серотонина в мезодienceфальной области мозга, что также стало предметом нашего исследования.

Материалы и методы

Синапсомы выделяли по методу Hajos [9] из мезодienceфальной области мозга крыс и инкубировали 10 мин в присутствии $5 \cdot 10^{-8}$ М 3 H-серотонина. Затем 1 мл инкубированной суспензии переносили в суперфузионные камеры на миллиметровые мембранные фильтры (диаметр—0,6 мкм, тип ДА). Высвобождение 3 H-серотонина изучали суперфузионным методом Raiteri и соавт. [10]. Суперфузию проводили со скоростью 1 мл/мин. Радиоактивность суперфузионной среды и синапсомом измеряли после добавления сцинтилляционной среды Брея на жидкостном сцинтилляционном счетчике «Intertechnique SL-4221» (Франция). Степень высвобождения (f) рассчитывали по отношению радиоактивности суперфузионной среды к оставшейся радиоактивности синапсомом (распады в мин).

Использовали Кребс-бикарбонатный буфер pH 7,2—7,4 со следующим составом (в мМ): NaCl—113; KCl—4,75; KH_2PO_4 —1,2; MgSO_4 —1,2; NaHCO_3 —25; CaCl_2 —2,5; глюкоза—11,5. В буфер добавляли 0,12 мг/мл паргиллина и 0,2 мг/мл аскорбиновой кислоты. В K^+ -обогатщенной среде (40 мМ) изотоничность раствора достигалась изомоларным замещением NaCl на KCl. В Ca^{2+} -свободную среду CaCl_2 не добавляли. Использовали 3 H-серотонин с величиной У. А. 15,9 Ки/мМ («Amersham», Англия), ГАМК («Serva», ФРГ), норадреналин и паргиллин («Sigma», США), морфин («Reanal», Венгрия).

Результаты и обсуждение

Влияние ГАМК на K^+ -вызванное Ca^{2+} -зависимое высвобождение 3 H-серотонина из синапсом мезодienceфальной области мозга. После предварительной инкубации синапсомом в присутствии 3 H-серотонина на 12-ой мин суперфузии с исходным буфером к ним добавляли K^+ -обогатщенную среду, что стимулировало высвобождение 3 H-серотонина на 130%. Когда к синапсомом совместно с K^+ добавляли ГАМК (10^{-3} М), вызванное высвобождение 3 H-серотонина не изменялось (рис. 1, а).

Известно, что вызванное деполяризацией высвобождение медлителей зависит от Ca^{2+} , что хорошо согласуется с результатами наших исследований, показавших подавление K^+ -вызванного высвобождения 3 H-серотонина в Ca^{2+} -свободной среде (рис. 1, б). Нами показано, что в бескальциевой среде подавленное высвобождение 3 H-норадреналина (вызванное K^+ и протонвератрином) частично восстанавливалось при добавлении ГАМК [2, 3]. Этот факт можно объяснить выбросом Ca^{2+} из его внутриклеточных запасов под действием ГАМК. Однако, как видно из рис. 1, б, ингибированное высвобождение 3 H-серотонина в Ca^{2+} -свободной среде в присутствии ГАМК не подвергается изменениям.

Таким образом, ГАМК не действует на вызванное высвобождение серотонина из нервных окончаний в мезодienceфальной области. Сопоставляя эти данные с результатами наших ранних исследований, показавшими подавление вызванного высвобождения 3 H-серотонина

из гипоталамических и мезодиэнцефальных срезов [4, 5] под действием ГАМК можно предположить, что в этой области ГАМК-ергическая регуляция высвобождения серотонина не осуществляется на уровне первичных окончаний. Вероятно, что полученный нами эффект ГАМК на высвобождение серотонина в срезах является результатом опосредованного действия через короткие интернейроны, а также влияния ГАМК на высвобождение серотонина из глии.

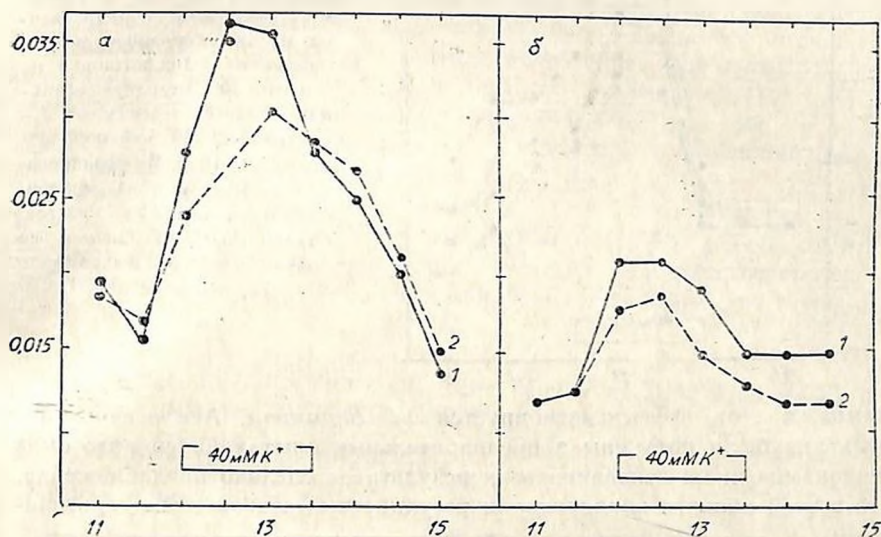


Рис. 1. Влияние ГАМК на K^+ -вызванное высвобождение 3H -серотонина из синапсом мезодиэнцефальной области мозга крысы: а—в присутствии и б—в отсутствие Ca^{2+} . По оси абсцисс—время суперфузии в мин; по оси ординат—степень высвобождения 3H -серотонина (f); 1—контроль, 2— 10^{-3} М ГАМК. Средние данные 7—10 опытов. Стандартные отклонения не более 10%.

Влияние норадреналина на K^+ -вызванное высвобождение 3H -серотонина из синапсом мезодиэнцефальной области мозга. При изучении влияния норадреналина на K^+ -вызванное высвобождение 3H -серотонина из синапсом в суперфузионную среду вместе с K^+ добавляли норадреналин в концентрациях 10^{-7} — 10^{-5} М. Результаты исследований показали, что используемые концентрации норадреналина не изменяли K^+ -вызванное высвобождение 3H -серотонина (рис. 2). Как видно из данных, представленных на рис. 2, в присутствии норадреналина в концентрации 10^{-5} М наблюдается тенденция подавления вызванного высвобождения 3H -серотонина, однако этот эффект статистически не достоверен. В присутствии норадреналина в концентрации 10^{-7} М степень высвобождения 3H -серотонина не изменяется, но время воздействия K^+ увеличивается (рис. 2).

Известно, что серотонинергические первичные окончания мезодиэнцефальной области возникают из ядер шва, на которых заканчивают-

ся первые окончания порадренергических нейронов из голубого пятна. Показано, что этими порадренергическими окончаниями модифицируется активность серотонинергических нейронов [11, 12]. Frankhuysen, Mulder [13] показали, что порадреналин ($3 \cdot 10^{-8}$ — $3 \cdot 10^{-6}$ М) подавляет K^{+} -вызванное высвобождение 3H -серотонина из срезов гиппо-

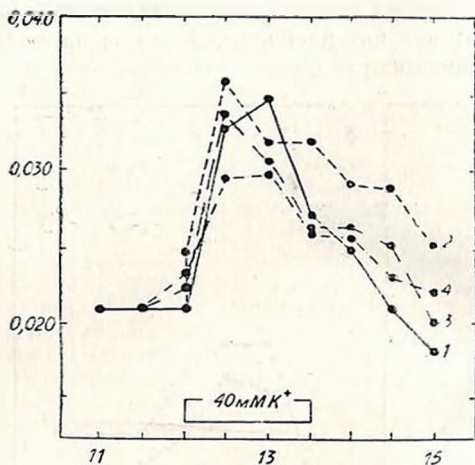


Рис. 2. Влияние порадреналина на K^{+} -вызванное высвобождение 3H -серотонина из синапсом мезодиэнцефальной области мозга крыс. 1 — контроль; 2— 10^{-7} М порадреналина; 3— 10^{-6} М порадреналина; 4— 10^{-5} М порадреналина. Средние данные 5—7 опытов. Стандартные отклонения не более 10%. Обозначения те же, что и на рис. 1.

кампа, и этот эффект ингибируется фентоламином. Аналогичные результаты были получены в предварительных опытах на синапсом гиппокампа, и на основании этих результатов сделано предположение, что в этой области порадреналин регулирует высвобождение серотони-

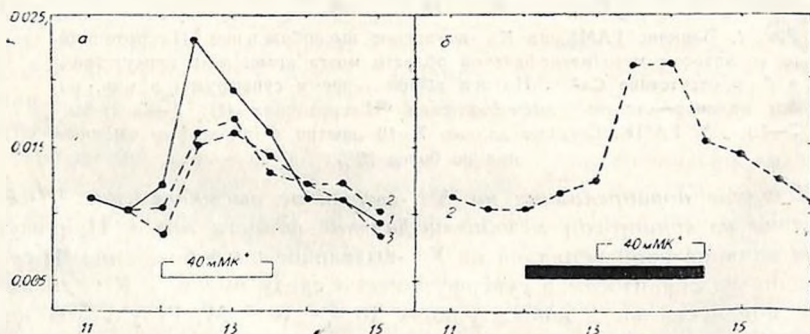


Рис. 3. Влияние морфина на K^{+} -вызванное высвобождение 3H -серотонина из синапсом мезодиэнцефальной области мозга крыс: а — в отсутствие и б — в присутствии палоксона (10^{-4} М) (заштрихованная область); 1 — контроль; 2— 10^{-4} М морфина; 3— 10^{-3} М морфина. Средние данные 8—11 опытов. Стандартные отклонения не более 10%. Обозначения те же, что и на рис. 1.

на через α -рецепторы, локализованные на серотонинергических первых окончаниях. Исходя из результатов настоящих исследований, можно предположить, что в мезодиэнцефальной области отсутствует ре-

гуляция высвобождения серотонина норадреналином на уровне нервных окончаний.

Влияние морфина на K^+ -вызванное высвобождение 3H -серотонина из синапсом мезодиэнцефальной области мозга. После инкубации синапсом с 3H -серотонином на 12-ой мин суперфузии в среду вместе с K^+ добавляли морфин в концентрациях 10^{-4} и 10^{-3} М. Используемые нами концентрации морфина значительно подавляли K^+ -вызванное высвобождение 3H -серотонина из синапсом (рис. 3, а). В следующей серии опытов изучали влияние морфина на K^+ -вызванное высвобождение 3H -серотонина после предварительной суперфузии синапсом с антагонистом опиатных рецепторов—налоксоном (10^{-4} М). Выяснилось, что налоксон не влияет на спонтанное высвобождение 3H -серотонина из синапсом, но в его присутствии тормозящий эффект морфина подвергается реверсии (рис. 3, б).

На основании полученных результатов можно предположить, что в мезодиэнцефальной области мозга опиатные нейроны участвуют в регуляции высвобождения серотонина, действуя непосредственно на серотонинергические нервные окончания через специфические опиатные рецепторы.

PRESYNAPTIC REGULATION OF SEROTONIN RELEASE IN RAT BRAIN MESODIENCEPHALIC REGION

ARMENIAN A. R., ARAKELIAN L. N., GALOYAN A. A.

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

Effects of GABA, noradrenaline and morphine on the K^+ -evoked release of 3H -serotonin from synaptosomes of rat brain mesodiencephalic region was studied. GABA (10^{-3} M) and noradrenaline (10^{-7} — 10^{-5} M) exerted no effect on the evoked release of 3H -serotonin, whereas this process was inhibited by morphine (10^{-4} — 10^{-3} M). The effect of morphine was antagonized by naloxone (10^{-4} M). These results make it possible to suggest the absence of GABA- and noradrenergic regulation of serotonin release at the nerve endings level and involvement of opiate neurons in this process in rat brain mesodiencephalic region.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Армениян А. Р., Чифликян М. Д., Бунятыан Г. Х. *Вопр. биохимии мозга*, т. 14, с. 135—142, Изд-во АН АрмССР, 1980.
2. Чифликян М. Д., Армениян А. Р., Бунятыан Г. Х. *Физиол. журн. СССР*, т. 67, с. 1001—1006, 1981.
3. Армениян А. Р., Чифликян М. Д. *Физиол. журн. СССР*, т. 67, с. 1265—1268, 1981.
4. Yessaian N. A., Armenian A. R., Buniatian H. Ch. *J. Neurochem.*, v. 16, p. 1425—1431, 1969.
5. Армениян А. Р. *Вопр. биохимии мозга*, т. 14, с. 143—148, Изд-во АН АрмССР, 1980.

6. Llorens C., Martres M. P., Bandry M., Schwartz J. C. *Nature* (London), v. 274, 603—605, 1978.
7. Malfroy B., Swerts J. P., Guyon A., Roques B. P., Schwartz J. C. *Nature* (London), v. 276, p. 523—526, 1978.
8. Iwatsubo K., Kando Y.—In: *Characteristics and Function of Opioids*, (J. M. van Ree and L. Terenius, eds), p. 357—358, Elsevier North-Holland Biochemical Press, Amsterdam, New York and Oxford, 1978.
9. Hajos F. *Brain Res.*, v. 93, p. 485—489, 1975.
10. Ralteri M., Angelini F., Levi G. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 25, p. 411—414, 1974.
11. Palkovits M., Jacobowitz D. M. *J. Comp. Neurol.*, v. 157, p. 29—42, 1974.
12. Saavedra J. M., Grobecker H., Zivin J. *Brain Res.*, v. 114, p. 339—345, 1976.
13. Frankhuyzen A. L., Mulder A. H. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 63, p. 179—182, 1980.

Поступила 1. III 1985

К СВЕДЕНИЮ АВТОРОВ!

Научно-технический совет Минвуза СССР сообщает, что Приказом Минвуза СССР от 13. II. 84 г. № 742 утверждены Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных.

Аналогичные Правила действуют в учреждениях систем Академии наук СССР, Министерства здравоохранения СССР, Министерства сельского хозяйства СССР.

Правила преследуют цель:

- повысить качество научных и других видов работ с животными
- обеспечить принципы гуманного обращения с животными.

Сообщаем, что в представляемых для публикации статьях авторы должны указывать вид и количество используемых животных, применявшиеся методы обезболивания и эвтаназии.

Редколлегия не будет принимать к публикации статьи, в которых не указываются эти данные.



УДК 577.352.54+615.211

ВЛИЯНИЕ КЕТАМИНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ СИНАПТОСОМ МОЗГА КРЫС

МЕРЕЖИНСКАЯ Н. В., ОКУНЬ Н. М., РАКОВИЧ А. А., ЛЫСКОВА Т. Н.,
АКСЕНЦЕВ С. Л., ОРЛОВ С. Н., КОНЕВ С. В.

Институт фотобиологии АН БССР, Минск

Общий анестетик кетамин (1 мМ) тормозит индуцированное Ca^{2+} выделение АХ из синапсом мозга без их деполяризации, действуя подобно блоктору кальциевых каналов верапамилом. Подавляется также выделение медиатора, индуцированное вератрином, открывающим натриевые каналы. Судя по распределению проникающего катиона 3Н-тетрафенилфосфония, кетамин в той же концентрации предотвращает тетродотоксинчувствительную деполяризацию синапсом, вызванную вератрином, но не 50 мМ KCl. Сделан вывод о действии кетамина на натриевые и кальциевые каналы нервных окончаний. В дозах свыше 2 мМ анестетик полностью деполяризует синапсомы. На основании сравнительного анализа ингибирования кетаминном и убаином Na^+ , K^+ -АТРазы синапсом предполагается, что эффект высоких концентраций кетамина объясняется неспецифическим нарушением ионной проницаемости пресинаптической мембраны.

Согласно существующим представлениям, общая анестезия, то есть потеря сознания и болевой чувствительности, возникает вследствие подавления центральных синапсов [1, 2]. Блокада синаптической передачи может быть достигнута за счет прекращения распространения потенциала действия в нервном окончании, торможения выделения нейромедиатора или нарушения процессов обратного его захвата, а также инактивации постсинаптического рецептора.

Кетамин—один из наиболее распространенных в клинике общих анестетиков—вызывает так называемую диссоциативную анестезию (при этом одни участки мозга возбуждаются, а другие угнетаются), воздействуя на таламо-кортикальные проводящие пути, лимбические структуры и задние рога спинного мозга [3]. Однако молекулярный механизм действия этого анестетика остается невыясненным. Из известных нейрохимических эффектов можно назвать угнетение нейронального захвата серотонина инорадреналина, изменение содержания в крови биогенных аминов и некоторых гормонов [3].

В настоящей работе на основании измерения выделения АХ и мем-

бранного потенциала показано, что кетамин в концентрациях до 1 мМ блокирует потенциалзависимые натриевые и кальциевые каналы синапсомозга крыс, не изменяя потенциал покоя. При более высоких концентрациях анестетик вызывает стойкую деполаризацию нервных окончаний, по-видимому, вследствие нарушения селективной ионной проницаемости мембран синапсомом.

Материалы и методы

Синапсомы из мозга белых крыс (150—200 г) получали по Hajos [4]. Суспензию синапсомом в 0,8 М сахарозе медленно разбавляли (20-минутное уравнивание) равным объемом охлажденной на льду среды, содержащей (в мМ): NaCl—145; KCl—5; $MgCl_2$ —1,4; NaH_2PO_4 —2,0; глюкоза—10; трис-HEPES буфер—20; pH 7,4; (среда «А»).

Синапсомы осаждали центрифугированием при 20000g в течение 6 мин, и осадок ресуспендировали в той же среде или в дистиллированной воде для измерения активности Na^+ , K^+ -АТФазы.

Выделение 3H -меченых продуктов из синапсомом, нагруженных 3H -холином. проводили по модифицированному методу Blaustein [5]. Синапсомы (0,5—0,6 мг белка/мл) преникубировали в течение 5 мин при 37°, затем вводили 3H -холинхлорид до конечной концентрации 1 нМ и инкубацию продолжали еще 30 мин, в течение которых происходил захват меченого холина и синтез из него АХ [6]. Аликваты по 0,7 мл (с радиоактивностью 55 нКи) разливали по пробиркам, в которые добавляли по 0,1 мл среды «А» с 20 мМ Ca^{2+} или без него; по 0,1 мл 10 мМ раствора кетамина в этой же среде и после 5-минутной инкубации в суспензию вводили по 0,1 мл вератрина (1 мг/мл) или KCl (500 мМ). Еще через 5 мин образцы быстро фильтровали под вакуумом через фильтры GF/F («Whatman», Англия) и трижды промывали 7 мл холодной инкубационной среды.

Величину выделения 3H -меченых продуктов из синапсомом определяли по снижению активности осадков на фильтрах в присутствии вератрина или KCl. В настоящей работе химическую природу этих продуктов не идентифицировали. Известно, однако, что в сходных экспериментальных условиях около 60% захваченного холина превращается в АХ [7], а 85% радиоактивности, освобождаемой при деполаризации, принадлежит меченому АХ и лишь 15%—неметаболизированному холину [8]. Учитывая это, индуцированное деполаризацией выделение 3H -продуктов из синапсомом интерпретировали как выделение АХ.

Для измерения мембранного потенциала синапсомом применяли меченый проникающий липофильный катион [3H] тетрафенилфосфоний ([3H]ТФФ+). 0,85 мл суспензии синапсомом (0,5—0,6 мг белка/мл) преникубировали в течение 5 мин при 37°, затем вводили 0,95 мл раствора [3H]ТФФ+ в среде до конечной концентрации 0,4 нМ (50 нКи). Равновесное распределение катиона достигалось менее чем за 3 мин. Все тестируемые соединения добавляли через 5 мин выдерживания с [3H]ТФФ+, и после дополнительных 5 мин инкубации количество [3H]ТФФ+ в синапсомом определяли по радиоактивности осадка на фильтрах GF/F после вакуумной фильтрации.

Использованный нами подход для расчета потенциала, в отличие от предлагавшегося ранее [9], позволяет корректно оценить его величину на внешней мембране синапсомом с учетом вкладов со стороны митохондрий и синаптических пузырьков.

Внутреннее содержимое синапсомом состоит из трех основных компартментов: цитоплазмы (с объемом $V_1=87,5-93,5\%$), митохондрий ($V_2=5-11,5\%$) и внутрисинапсомомных пузырьков ($V_3=1,5\%$) [10]. Трансмембранные потенциалы на плазматической, митохондриальной и пузырьковой мембранах обозначим, соответственно, E_1 , E_2 и E_3 . При добавлении к синапсомомам проникающего катиона, например

[³H]ТФФ +, он распределяется между компартментами в соответствии с их транс-мембранными потенциалами [11]:

$$C_{в}/C_{н} = \exp \left(- \frac{EF}{RT} \right),$$

где $C_{в}$ и $C_{н}$ — концентрация катиона внутри и снаружи компартмента соответственно; E — потенциал на мембране, ограничивающей данный компартмент; F — число Фарадея; R — универсальная газовая постоянная и T — температура по абсолютной шкале.

Содержание [³H]ТФФ + в каждом из компартментов в состоянии равновесия равно:

$$m_1 = V_1 C_0 \exp(-E_1 F/RT) \quad (1)$$

$$m_2 = V_2 C_0 \exp[-(E_1 + E_2) F/RT] \quad (2)$$

$$m_3 = V_3 C_0 \exp[-(E_1 + E_2) F/RT]. \quad (3)$$

где C_0 — концентрация [³H]ТФФ + во внешней среде; $m = V \cdot C$ — количество [³H]ТФФ +, находящегося в данном компартменте; индексы 1, 2 и 3 относятся, соответственно, к цитоплазме, митохондриям и внутрисинаптическим пузырькам. Следовательно, суммарное количество [³H]ТФФ + $= (M = m_1 + m_2 + m_3)$ (4)

В условиях деполяризации синапсом, например вератридином, открывающим натриевые каналы [12, 13], E_1 становится равным нулю и количество внутрисинаптического [³H]ТФФ + будет определяться уравнением:

$$M' = C_0 [V_1 + V_2 \exp(-E_2 F/RT) + V_3 \exp(E_3 F/RT)]. \quad (5)$$

Разделив уравнение (4) на (5), получим:

$$M/M' = \exp(E_1 F/RT), \quad (6)$$

или

$$E_1 = -RT/F \cdot \ln(M/M'). \quad (7)$$

Таким образом, для вычисления потенциала необходимо лишь найти отношение количеств внутрисинаптического [³H]ТФФ + без и в присутствии деполяризующих концентраций вератридина и не требуется определения объемов цитоплазматического, митохондриального и пузырькового матриксов.

Активность Na^+ и K^+ -АТФазы измеряли в синапсосомах (после их гипосмотического шока в воде) по освобождению P_i [14]. Инкубационная среда в конечном объеме 2 мл содержала разрушенные синапсосомы (100 мкг белка/мл), $MgCl_2$ (3 мМ), трис-НСI буфер (30 мМ, pH 7,55), NaCl (100 мМ), KCl (20 мМ). После преникубации при 37° (10 мин) реакцию начинали добавлением 0,5 мл АТФ до конечной его концентрации 3 мМ. Через 20 мин реакцию останавливали смешиванием суспензии с 1 мл 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Скорость гидролиза АТФ получали вычитанием из суммарной активности АТФазы активности в присутствии $2 \cdot 10^{-4}$ М убаина.

Для определения радиоактивности фильтры высушивали на воздухе при 70° и помещали в сцинтилляционную жидкость PPO+POPOP (6 г/л и 0,075 г/л соответственно) в толуоле. Радиоактивность определяли на сцинтилляционном счетчике «Mark III», используя 10-ю программу для счета гетерогенных систем.

Белок определяли по Lowry и соавт. [15], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин.

Препараты. В работе использовали тетродотоксин («Sankyo Co», Япония); вератрин, действующим началом которого является вератридин («Sigma», США); [³H]холинхлорид (78 Ки/моль) и [³H]тетрафенилфосфония бромид (24 Ки/ммоль) («Amersham», Англия); кетамин гидрохлорид («Ketalar, Parke-Davis», Англия); АТФ- Na_2 («BDH», Англия); убаин («Sigma», США); бычий сывороточный альбумин («Sigma», США); соли отечественного производства, квалификации ос. ч.

Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлены основные характеристики системы выделения АХ из синапсосом. Деполяризация синапсосом вератрином, открывающим натриевые каналы, или 50 мМ КСl, снижающим калиевый равновесный потенциал, вызывает выделение АХ, усиливающееся в присутствии 2 мМ Ca^{2+} . Этот эффект особенно выражен при калиевой деполяризации. Из данных таблицы следует, что инкубация в присутствии одного лишь кальция (без деполяризации вератрином или КСl) также приводит к частичному спонтанному выделению АХ. Подобное действие кальция наблюдалось ранее в отношении выделения эндогенного норадреналина из синапсосом [5]. Рациональное объяснение заключается, по-видимому, в том, что какая-то часть Ca^{2+} -каналов в синапсосомах остается открытой и пропускает кальций без деполяриза-

Таблица 1

Влияние кетамина на выделение ацетилхолина (АХ) из синапсосом мозга крыс, вызванное вератриновой и калиевой деполяризацией

Деполяризующее воздействие	Добавки		Радиоактивность образцов, имп/мин	
	Ca^{2+} (2 мМ)	Кетамин (1 мМ)	Содержание ^3H - меченых соединений в синапсосах	Выделение радио- активных соеди- нений
Вератрин** (100 мкг/мл)	—	—	2579±68	
	+	—	2101±33	478±76*
	+	+	2428±60	
	+	+	2218±34	210±69*
	—	—	1943±23	696±72
	—	+	2335±48	93±77
КСl** (50 мМ)	+	—	1369±30	732±45
	+	+	2119±16	99±38
	—	—	2111±30	468±74
	—	+	1949±54	479±81
	+	—	1239±21	872±39
	+	+	1800±38	418±51

Примечание. Представлены средние значения из 5 измерений. * Выделение АХ без деполяризации рассчитывали как разность между содержанием ^3H -меченых соединений в синапсосах без кальция и после его добавления. ** Выделение АХ в опытах с деполяризацией определяли по разности содержания ^3H -меченых соединений в синапсосах без и в присутствии деполяризующих агентов с соответствующими добавками.

ции, или существует фракция деполяризованных синапсосом с открытыми кальциевыми каналами. Действительно, как было показано нами ранее [16], Mg^{2+} , конкурирующий с Ca^{2+} , и блокатор кальциевых каналов верапамил, но не блокатор натриевых каналов тетродотоксин, уменьшают спонтанное выделение АХ, обусловленное только кальцием. На существование в синапсосах определенной доли открытых каналов указывают и прямые данные по входу $^{45}\text{Ca}^{2+}$ [5, 16].

Как видно из табл. 1, кетамин в концентрации 1 мМ примерно на 50% снижает выделение АХ, обусловленное Ca^{2+} без деполяризации. Тормозящее влияние кетамина оказывает и на Ca^{2+} -зависимое выделение АХ при деполяризации синапсом вератрином или КСl. Подавление Ca^{2+} -зависимой секреции можно объяснить блокадой кетаминном кальциевых каналов и/или ингибированием Ca^{2+} -зависимого экзоцитоза синаптических пузырьков, содержащих медиатор. Здесь следует обратить внимание на тот факт, что кетамин снижает Ca^{2+} -зависимое выделение АХ в недеполяризующих условиях с той же эффективностью (~ 50%), что и верапамил [16]. Наблюдающееся сходство в эффективности блокады Ca^{2+} -зависимого выделения АХ верапамилом и кетаминном указывает на кальциевый канал как наиболее вероятную мишень для кетамина в системе Ca^{2+} -зависимого выброса АХ.

Выделение медиатора при деполяризации вератрином или КСl наблюдалось в наших опытах и без экзогенного Ca^{2+} (табл. 1). Возможными причинами этого Ca^{2+} -независимого выделения могут быть: а) наличие в популяции синапсом замкнутых мембранных пузырьков, транспортирующих медиатор и имеющих мембранный потенциал, но лишенных аппарата Ca^{2+} -зависимого экзоцитоза [17]; б) существование в выделенных нервных окончаниях двух пулов АХ, причем высвобождение медиатора из одного пула (связанного, возможно пузырькового) зависит, а из второго (свободного, цитоплазматического) — не зависит от экзогенного Ca^{2+} [18]; в) несмотря на отсутствие Ca^{2+} в инкубационной среде, секреция АХ осуществляется по Ca^{2+} -зависимому пути, но за счет освобождения Ca^{2+} из внутрисинаптического депо при деполяризации [19]. В этой связи важно подчеркнуть, что Ca^{2+} -независимое выделение АХ, индуцированное деполяризацией вератрином, но не КСl, блокируется тетродотоксином [16]. Иными словами, процесс выделения медиатора при деполяризации вератрином целиком инициируется открытием натриевых каналов. Таким образом, по выделению АХ в условиях специфической (вератрин) и неспецифической (КСl) деполяризации можно оценивать состояние (открытое или закрытое) натриевых каналов в синаптической мембране. Из представленных в табл. 1 данных следует, что кетамин в концентрации 1 мМ существенно тормозит выделение медиатора, вызванное вератрином в бескальциевой среде, не затрагивая выделение, обусловленное калиевой деполяризацией. Такое избирательное ингибирование свидетельствует о влиянии кетамина на натриевые каналы синаптических мембран. Этот вывод был подтвержден при измерении потенциала на наружной мембране синапсом. Контрольные значения мембранного потенциала, составлявшие в наших условиях 30—40 мВ (минус внутри), находятся в соответствии с данными других авторов, использовавших ^3H ТФФ + [20]. Как видно из рис. 1, кетамин в концентрации ниже 1—2 мМ не изменяет мембранный потенциал синапсом и эффективно предотвращает деполяризующий эффект вератрина ($\text{C}_{0,5} = 0,5\text{—}1$ мМ). В противоположность вератриновой, калие-

вая деполяризация не чувствительна к кетамину, который в этом отношении оказался сходным с тетродотоксином, полностью устранявшим только вератринную деполяризацию [16]. Следовательно, имеется четкая корреляция между результатами, полученными по тесту выделения АХ и измерению мембранного потенциала. Такое соответствие между ответами на кетамин у натриевых каналов холинэргических синапсов (тестируемых по вератрининдуцированному выделению АХ), и всей популяции синапсов (анализируемых по вератрининдуцированному снижению потенциала) позволяет говорить о сходной чувствительности каналов к анестетику вне зависимости от типа (медиаторной «принадлежности») первого окончания.

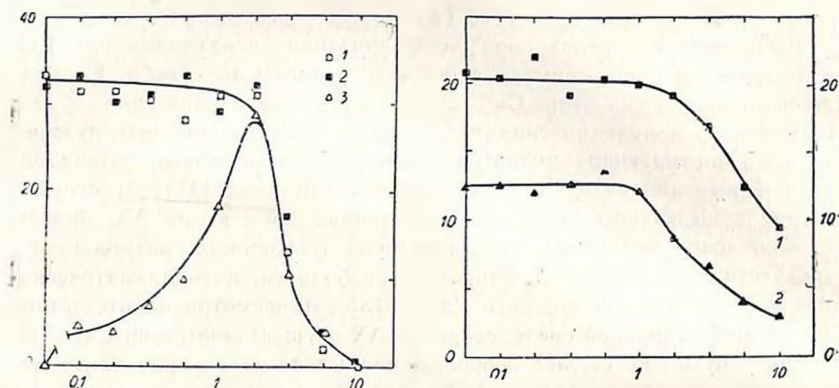


Рис. 1. Зависимость величины потенциала на плазматической мембране синапсом от концентрации кетамина. Условия инкубации (37°): 1 — 5 мин с $[^3\text{H}]\text{ТФФ} +$ ($0,4 \text{ нМ}$), затем 10 мин с кетаминном; 2 — одновременно с $[^3\text{H}]\text{ТФФ} +$ вводился тетродотоксин ($1 \cdot 10^{-7} \text{ М}$); 3 — через 5 мин после добавления кетамина введен вератрин (100 мкг/мл) с последующей инкубацией в течение 5 мин. По оси абсцисс — концентрация кетамина, мМ ; по оси ординат — величина потенциала ($-\Delta E$, мВ)

Рис. 2. Влияние кетамина на активность Na^+ , K^+ -АТФазы осмотически разрушенных синапсом (1) и содержание $[^3\text{H}]\text{ТФФ} +$ в интактных синапсах, предварительно деполяризованных вератрином (2). По оси абсцисс — концентрация кетамина, мМ ; по оси ординат слева — активность АТФазы ($\text{мкмоль } \text{P}_i/\text{мг белка/ч}$); по оси ординат справа — содержание $[^3\text{H}]\text{ТФФ} +$ (в $\text{имп/мин} \cdot 10^{-3}$).

Концентрации кетамина выше 2 мМ вызывают резкую и полную деполяризацию синапсов. При интерпретации снижения мембранного потенциала следует рассмотреть несколько альтернативных механизмов: 1) специфическое и стойкое открытие натриевых каналов (по аналогии с действием вератрина); 2) ингибирование натриевого насоса (Na^+ , K^+ -АТФазы) мембран за счет прямого взаимодействия с ним или вследствие истощения запасов эндогенного АТФ из-за разобщения окислительного фосфорилирования во внутрисинапсовых митохондриях; 3) нарушение ионного баланса в синапсах в ре-

зультате повышения неспецифической проницаемости для ионов. Первое легко исключается тем фактом, что тетродотоксин не способен предотвращать деполяризующее влияние больших концентраций кетаминна (рис. 1). В пользу второго механизма свидетельствуют, на первый взгляд, два обстоятельства— а) кетамин действительно снижает содержание $[^3\text{H}]\text{ТФФ}^+$ в синапсосамах, наружные мембраны которых предварительно деполяризованы вератрином, что указывает на падение мембранного митохондриального потенциала и, как возможное следствие, разобщение окислительного фосфорилирования; б) при тех же концентрациях кетамин ингибирует Na^+ , K^+ -АТФазу синапсосом, подвергнутых осмотическому шоку (рис. 2). Однако, как следует из табл. 2, специфический ингибитор Na^+ , K^+ -АТФазы убаин ($5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) снижает потенциал на плазматической мембране синапсосом лишь на 20%. В то же время кетамин (10 мМ) полностью деполяризует синаптическую мембрану, но активность Na^+ , K^+ -АТФазы при этом уменьшается не более чем на 50%. Отсюда следует, что мощное деполяризующее действие высоких концентраций кетаминна нельзя целиком объяснить лишь исключением натриевого насоса. Значительный вклад в этот эффект вносит, по-видимому, неспецифическое изменение проницаемости для Na^+ и K^+ за счет структурной модификации мембран.

Таблица 2

Влияние кетаминна и убаинна на потенциал покоя синапсосом и Na^+ , K^+ -АТФазу синаптических мембран

Добавки	E, мВ	Na^+ , K^+ -АТФаза, (мкмоль P_i /мг белка/ч)
—	$-35,2 \pm 1,5$	$20,5 \pm 0,4$
Кетамин (10 мМ)	0	$9,5 \pm 0,3$
Убаин (0,5 мМ)	$-29,8 \pm 3,0$	0

Примечание. Время инкубации синапсосом с добавками—10 мин

Таким образом, кетамин в концентрациях до 1 мМ блокирует потенциалзависимые натриевые и кальциевые каналы синапсосом и не изменяет потенциал покоя. Важнейшим функциональным следствием подобных эффектов может быть торможение секреции нейромедиаторов, то есть блокада синаптической передачи. При более высоких, скорее всего токсических, концентрациях кетаминна потенциал покоя падает вследствие нарушения селективности ионной проницаемости мембраны.

EFFECT OF KETAMINE THE FUNCTIONAL-STATE OF RAT BRAIN SYNAPTOSOMES

MEREZHINSKAYA N. V., OKOON I. M., RAKOVICH A. A., LYSKOVA T. I.,
AKSENTSEV S. I., ORLOV S. N., KONEV S. V.

Institute of Photobiology, Acad. Sci. Belorussian SSR, Minsk

Ca^{2+} -induced release of acetylcholine from rat brain synaptosomes measured in the absence of depolarizing agents is depressed by general anesthetic ketamin (1 mM), this action being similar to that of Ca^{2+} -channel blocker verapamil. Ca^{2+} -independent transmitter release induced by veratrine-mediated opening of Na^{+} -channels was also inhibited. Judged by the distribution of ^3H / tetraphenyl-phosponium ketamine prevents the tetrodotoxin-sensitive depolarization evoked by veratrine but not by 50 mM KCl. Conclusion was made about ketamine influence on Na^{+} - and Ca^{2+} -channels of nerve endings. At doses above 2 mM the anesthetic caused complete depolarization of synaptosomes. Comparative analysis of synaptosomal $\text{Na}^{+}, \text{K}^{+}$ -ATPase inhibition by ketamine and ouabaine shows that ketamine at high doses perturbs the presynaptic membrane nonspecifically damaging its ion permeability.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Roth S. H. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., v. 19, p. 159—179, 1979.
2. Seeman P. Pharmacol. Rev., v. 24, № 4, p. 583—655, 1972.
3. Беляевский А. Д., Каркищенко Н. Н., Бурмудейяль Р. Ч. Анестезиология и реаниматология, т. 4, № 1, с. 67—71, 1982.
4. Hajos F. Brain Res., v. 93, № 3, p. 485—489, 1975.
5. Blaustein M. P. J. Physiol. (Gr. Brit.), v. 247, № 2, p. 617—655, 1975.
6. Marchbanks R. M., Wonnacot S., Rubio M. A. J. Neurochem., v. 36, № 2, p. 379—393, 1981.
7. Haga T., Noda H. Biochim. et biophys. acta, v. 291, № 2, p. 564—575, 1973.
8. Mulder A. H., Yamamura H. I., Kuhar M. J., Snyder S. H. Brain Res., v. 70, № 1, p. 372—376, 1974.
9. Lichtstein D., Kaback H. R., Blume A. J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 76, № 2, p. 650—654, 1979.
10. Deutsch C., Drown C., Rafalowska U., Silver L. A. J. Neurochem., v. 36, № 6, p. 2063—2072, 1981.
11. Grinius L. L., Jasaitis A. A., Kadziauskas Y. P., Liberman E. A., Skulachev V. P., Topali V. P., Tsofina L. M., Vladimirova M. A. Biochim. et biophys. acta, v. 216, № 1, p. 1—12, 1970.
12. Ulbricht W. Ergeb. Physiol. Biol. Chem. Exp. Pharmacol., v. 61, № 1, p. 18—71, 1969.
13. Krueger B. K., Blaustein M. P. J. Gen. Physiol., v. 76, № 3, p. 287—313, 1980.
14. Fiske C. H., Subbarow J. J. Biol. Chem., v. 66, № 2, p. 375—380, 1925.
15. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., v. 193, № 1, p. 265—275, 1951.
16. Aksentsev S. L., Rakovitch A. A., Okoon I. M., Konev S. V., Orlov S. N., Kravtsov G. M. Pflügers Arch., v. 397, № 1, p. 135—140, 1983.
17. Kanner B. J. Biochemistry, v. 19, № 4, p. 692—697, 1980.
18. Haycock J. W., Levy W. B., Denner A. L., Cotman C. W. J. Neurochem., v. 30, № 5, p. 1113—1125, 1978.
19. Kelly B. R., Deutsch J. W., Carlson S. S., Wagner J. A. Ann. R. ev. Neurosci., v. 2, p. 399—446, 1979.
20. Ponzio G., Jacques Y., Frelin Ch., Chicheportiche R., Lazdunski M. FEBS Lett., v. 121, № 2, p. 265—268, 1980.

Поступила 20. IV. 1985-



УДК 577.352.354.46:577.113.3

О ПРИРОДЕ УЧАСТКОВ СИНАПТИЧЕСКИХ МЕМБРАН КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА, СВЯЗЫВАЮЩИХ НИКОТИНАМИДАДЕНИНДИНУКЛЕОТИД

КУЧМЕРОВСКАЯ Т. М., ПАРХОМЕЦ П. К., ЧИЧКОВСКАЯ Г. В.,
ХАЛМУРАДОВ А. Г., РОЖАНСКАЯ О. П.

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

Изучали природу участков синаптических мембран коры головного мозга крыс, специфически связывающих NAD^+ . Использование ряда методических приемов (протеолитическая, липолитическая, нейраминидазная, температурная обработка синаптических мембран, химическая модификация белковой структуры) позволило установить, что рецепторные участки, локализованные на синаптических мембранах, связывающие NAD^+ , представляют собой протеолипиды, окруженные олигосахаридной частью ганглиозидов. В процессе связывания NAD^+ участвуют свободные SH-группы рецепторных участков синаптических мембран.

Ранее нами было показано, что синтезирующийся в клетках мозга из ограниченно проникающих через ГЭБ никотиновой кислоты и никотинамида [1] никотинамидадениндинуклеотид (NAD^+), являющийся естественным компонентом синаптосом коры [2], специфически связывается синаптическими мембранами. Связывание NAD^+ как насыщаемый и обратимый процесс осуществляется двумя рецепторными участками синаптических мембран, характеризующимися согласно данным графика Скэтчарда высоким и низким сродством к лиганду [3].

Целью настоящего исследования было изучение некоторых вопросов, связанных с природой рецептора NAD^+ , локализованного в синаптической мембране коры головного мозга крыс.

Материалы и методы

Синаптические мембраны получали из коры головного мозга крыс-самцов массой 150–180 г по методу Abita и соавт. [4], а их чистоту и нативность контролировали электронномикроскопически и по активности ферментов—маркеров субклеточных оргanelл (лактаатдегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы, глюкозо-6-фосфатазы, кислой фосфатазы, Na^+ , K^+ -АТФазы).

Во всех экспериментах по связыванию в качестве меченого лиганда использовали никотинамид [$\text{U}-14\text{C}$]адениндинуклеотид («Amersham», Англия) с удельной радиоактивностью 269 мКи/ммоль. Состав инкубационной среды, условия инкубации, а

также приемы расчета общего, неспецифического и специфического связывания NAD⁺ синаптическими мембранами были такими, как и в предыдущей нашей работе [3].

При обработке синаптических мембран трипсином («Srofa», СССР), химотрипсином той же фирмы и проназой («Serva», ФРГ), пробы подвергали преинкубации на протяжении 1 ч при 37°, добавляя в среду по 100 мкг протеолитического фермента на 1 мл инкубационной среды.

В исследованиях были также использованы фосфолипаза A₂, выделенная из яда пчелы (10–7 М), С—из *Bacillus cereus* (180 мкг на 1 мг белка) и D—из *Streptomyces cinnamomeus* (270 мкг на 1 мг белка). В этих случаях преинкубацию синаптических мембран в присутствии фосфолипаз проводили в течение 30 мин при 37°.

При обработке синаптических мембран нейраминидазой («Worthington», США) пробы преинкубировали на протяжении 20 мин при 37°, добавляя в инкубационную среду 50 мкг фермента на 1 мг белка мембран.

Исследования по химической модификации рецептора NAD⁺, локализованного на синаптической мембране коры головного мозга крыс проводили с помощью диэтиотрептола (преинкубация 1 мг мембранного белка в присутствии 3 мг диэтиотрептола на протяжении 30 мин) и нодацетамида (преинкубация в те же сроки, с добавлением 2 мг препарата в расчете на 1 мг белка мембран).

Результаты и обсуждение

Как видно из рис. 1, специфическое связывание никотинамид [¹⁴C]аденидинуклеотида ([¹⁴C]NAD⁺) синаптическими мембранами пропорционально концентрации мембранного белка, вносимого в среду инкубации. Кроме того, процесс этот является температурозависимым (рис. 2). Связывание, достигая плато при 24°, снижается после 45° и полностью прекращается при использовании прокипяченных проб.

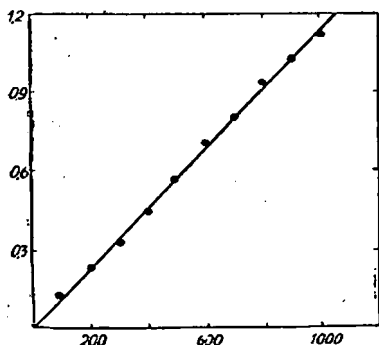


Рис. 1. Зависимость связывания [¹⁴C]NAD⁺ синаптическими мембранами от концентрации белка. По оси абсцисс—белок, мкг; по оси ординат—связанный [¹⁴C]NAD⁺, имп. 10³/мин

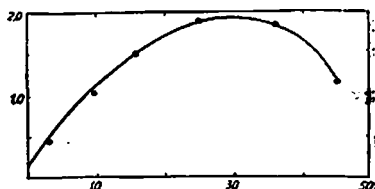


Рис. 2. Температурный оптимум связывания [¹⁴C]NAD⁺ синаптическими мембранами. По оси абсцисс—температура, по оси ординат—связанный [¹⁴C]NAD⁺, имп. 10³/мин/мг белка

Приведенные данные свидетельствуют о том, что связывающие NAD⁺ участки синаптической мембраны коры головного мозга крыс имеют белковую природу. В последующих экспериментах синаптические

ские мембраны предварительно подвергали действию протеолитических ферментов (трипсина, проназы, химотрипсина) и, инкубируя далее в присутствии $[^{14}\text{C}] \text{NAD}^+$, измеряли интенсивность специфического связывания радиоактивного лиганда с мембраной. Как видно из табл., обработка синаптических мембран тремя различными представителями протеолитических ферментов, различающихся по характеру своего действия, вызывает примерно в одинаковой степени снижение способности их связывать $[^{14}\text{C}] \text{NAD}^+$. Так, трипсин, химотрипсин и проназа вызывают снижение эффективности связывания $[^{14}\text{C}] \text{NAD}^+$ соответственно на 80, 75 и 70%. Эти результаты позволяют сделать важный вывод о том, что по своей природе связывающий NAD^+ компонент синаптической мембраны действительно является белком, локализованным, вероятно, на внешней поверхности синаптических мембран, поскольку обработка мембран протеолитическими ферментами приводит, как известно, к гидролизу только поверхностных белков [5].

В литературе накоплено достаточно сведений о том, что рецепторы многих гормонов, нейромедиаторов, нейропептидов по своей природе являются сложными, генетически детерминированными макромолекулами, состоящими из комплексов белков с липидами и углеводами [6]. Если считать, что рецептор NAD^+ является белком действительно синаптической мембраны, можно допустить наличие в его составе и липидов. Обычно подобную вероятность проверяют, используя в большинстве весьма специфичные методы ферментативного гидролиза липидов мембран.

Результаты наших исследований указывают на то, что специфическое связывание $[^{14}\text{C}] \text{NAD}^+$ синаптическими мембранами после их предварительной обработки фосфолипазой A_2 , отщепляющей жирнокислотные остатки в β -положении фосфолипидов, снижается на 61% (табл.). Фосфолипаза D , отщепляющая азотистое основание от полярной головки фосфолипида, также уменьшает специфическое связывание NAD^+ на 60%. Отрицательное действие фосфолипазы D на лиганд-рецепторное взаимодействие можно объяснить тем, что специфические места связывания находятся, вероятно, на поверхности липидного бислоя и закорены в мембране с помощью связи с полярной головкой фосфолипида. С нарушением полярности фосфолипидной головки фосфолипазой D изменяется пространственная конформация участков узнавания рецепторов, что и отражается в наблюдаемом нами уменьшении связывания NAD^+ мембранами. Если это суждение справедливо, тогда отщепление полярной головки (то есть азотистого основания и остатка фосфорной кислоты) с помощью фосфолипазы C должно еще в большей степени уменьшать связывание NAD^+ . Действительно, как выяснилось из проведенных исследований, после обработки фосфолипазой C синаптических мембран, специфическое связывание NAD^+ синаптическими мембранами снижается на 89%. Интересен тот факт, что несмотря на различия в механизме расщепления фосфолипидов мембран фосфолипазами A_2 , C и D , все они, как следует из таблицы,

приводят к торможению специфического связывания радиолиганда, что свидетельствует о важной роли фосфолипидов в поддержании структуры активного центра рецептора NAD^+ или же его доступности для лиганда.

Таблица

Влияние ферментативной и химической модификации рецепторных участков синаптических мембран на специфическое связывание $[^{14}\text{C}]\text{NAD}^+$, имп/мин на 1 мг белка ($n=7$)

Воздействие	Специфическое связывание $[^{14}\text{C}]\text{NAD}^+$		
	контроль	опыт	% изменения
Протеолитические ферменты			
Трипсин	1895 ± 132	$385 \pm 31^*$	-80
Химотрипсин	.	$472 \pm 40^*$	-75
Проназа	.	$573 \pm 54^*$	-70
Липолитические ферменты			
Фосфолипаза A_2	2030 ± 185	$790 \pm 46^*$	-61
D	.	$812 \pm 64^*$	-60
C	.	$210 \pm 20^*$	-89
Нейраминидаза	.	$3943 \pm 205^*$	+95
Алкилирование SH-групп			
Иодацетамид	2865 ± 201	$632 \pm 51^*$	-78
Восстановление S-S-связей			
Дитиотреитол	.	$2175 \pm 187^*$	-24

* $p < 0,05$

Существенная роль липидного микроокружения в функционировании рецепторов показана на примере связывания ряда гормонов. Так, обработка жировых клеток и мембран печени фосфолипазами A_2 и C приводила к 3—6-кратному увеличению связывания инсулина, что позволило выявить новые связывающие места [7], в то время как для фолликулостимулирующего гормона и для тиреолиберина наблюдали уменьшение связывания после обработки фосфолипазами [8]. Все это позволило предположить, что липиды входят в состав рецептора NAD^+ , а их полярная часть способствует рецепции $[^{14}\text{C}]\text{NAD}^+$.

Нельзя исключить роль углеводов мембран в рецепции $[^{14}\text{C}]\text{NAD}^+$ специфическим рецептором. Согласно современным взглядам, нейраминидаза—фермент, отщепляющий сialовые кислоты от полисialogанглиозидов, а также расщепляющий ганглиозиды, находящиеся в комплексе с белками мембран, является наиболее специфическим ферментом для идентификации углеводов [9]. В наших исследованиях при обработке синаптических мембран нейраминидазой было обнаружено значительное увеличение (на 95%) их способности связывать $[^{14}\text{C}]\text{NAD}^+$ (таблица).

Приведенные выше результаты не позволяют однозначно ответить на вопрос, являются ли углеводы компонентами рецептора $[^{14}\text{C}]\text{NAD}^+$. Однако с известной долей осторожности можно предположить, что олигосахаридная часть ганглиозидов, находящаяся на внешней стороне постсинаптических мембран и ориентированная в синаптическую

щель, «маскирует» рецепторные участки, связывающие $[^{14}\text{C}]\text{NAD}^+$, поскольку удаление сialовых кислот с помощью нейраминидазы повышает доступность к ним $[^{14}\text{C}]\text{NAD}^+$.

Для более полного изучения их природы мы провели анализ структуры активных участков рецептора NAD^+ с помощью метода химической модификации [10]. При обработке мембран дитиотрептолом — агентом, избирательно восстанавливающим дисульфидные связи белков, специфическое связывание радиоактивного лиганда тормозится всего лишь на 24%, в то время как подацетамид, алкилирующий SH-группы белков, оказывает более выраженное действие на рецепцию NAD^+ , вызывая торможение связывания на 78% (таблица).

На основании вышеизложенных данных (таблица) можно предположить, что свободные SH-группы молекулы рецепторного белка синаптических мембран играют важную роль в процессе образования комплекса с NAD^+ .

Таким образом, полученные в настоящей работе данные свидетельствуют о том, что рецепторные участки синаптических мембран коры головного мозга крыс, связывающие NAD^+ , представляют собой протеолипиды, окруженные олигосахаридной частью ганглиозидов, в структуру которых входят SH-группы, взаимодействующие с $[^{14}\text{C}]\text{NAD}^+$.

NATURE OF NAD -BINDING SITES IN BRAIN CORTEX SYNAPTIC MEMBRANES

KUCHMEROVSKAYA T. M., PARKHOMETS P. K., CHICHKOVSKAYA G. V.,
KHALMURADOV A. G., ROZHANSKAYA O. P.

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

Nature of specific ($\text{U-}^{14}\text{C}$) NAD binding sites has been investigated in rat brain cortex synaptic membranes. Application of various methodological approaches (protease, lipase, neuraminidase and temperature treatment of synaptic membranes and chemical modification of protein) makes it possible to conclude that NAD -binding receptor sites in synaptic membranes are composed from proteolipids, surrounded by oligosaccharide moiety of gangliosides. Free SH-groups of the receptor sites in synaptic membranes are involved in NAD binding.

ЛИТЕРАТУРА

1. Spector R. J. *Neurochem.*, v. 33, p. 895—904, 1979.
2. Кучмеровская Т. М., Чичковская Г. В., Пархомец П. К., Халмуратов А. Г., Докл. АН УССР, серия Б, № 3, с. 71—74, 1984.
3. Халмуратов А. Г., Пархомец П. К., Кучмеровская Т. М., Чичковская Г. В. *Биохимия*, т. 48, № 8, с. 1287—1292, 1983.
4. Abita J., Chicheportiche R., Schwetz H., Lazduiski M. *Biochemistry*, v. 16, № 9 p. 1838—1864, 1977.

5. Snow C., Allen A. Biochem. J., v. 119, № 4, p. 707—714, 1970.
6. De Robertis E.—In: Reviews of Physiology, biochemistry and pharmacology, p. 9—38, 1975.
7. Cuatrecas P. J. Biol. Chem., v. 246, № 21, p. 6532—6542, 1971.
8. Cuatrecasas P. Annu. Rev. Biochem., v. 43, p. 169—173, 1974.
9. Ziegler D., Keilich G., Brossmer R., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., v. 363, № 9, p. 1040—1041, 1982.
10. Silman H. I., Karlin A. Proc. Nat. Acad. Sci., USA, v. 58, № 4, p. 1664—1668, 1967.

Поступила 15. IV 85

НОВЫЕ КНИГИ

Redulation of Transmitter Function: Basic and Clinical Aspects
(ed. by E. S. Vizi and K. Magyar), Elsevier Science Publishers, Amsterdam—New York, 1984.

Сборник составлен по материалам 5-й конференции Европейского нейрохимического общества (Будапешт, 21—26 августа 1984 г.). В нем широко представлены нейрохимические исследования при таких заболеваниях нервной системы, как болезнь Альцгеймера, паркинсонизм, шизофрения и рассеянный склероз. Большинство статей посвящено вопросам изучения процессов высвобождения нейротрансмиттеров и модуляции, взаимодействия нейротрансмиттеров с рецепторами, влияния нейротоксина на систему нейротрансмиттеров и иммуноцитохимию их специфических маркеров при указанных патологиях. Обсуждается широкий диапазон нейротрансмиттеров и нейромодуляторов от ацетилхолина до недавно обнаруженных нейропептидов.

Книга представляет интерес для нейрохимиков, нейрофармакологов и клиницистов, интересующихся нейрохимическими основами нейробиологических и психиатрических заболеваний.



РАСТВОРИМАЯ ФОСФАТЗАВИСИМАЯ ГЛУТАМИНАЗА МОЗГА КРЫС И РОЛЬ РАЗЛИЧНЫХ МОДУЛЯТОРОВ В РЕГУЛЯЦИИ ЕЕ АКТИВНОСТИ

БЕДЖАНИЯН К. Д., БАДАЛЯН Л. Л., ОГАНЕСЯН В. С.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Установлено, что среди множества испытанных соединений единственным эффективным активатором растворимой фосфатзависимой глутаминазы (ФЗГ) мозга является фосфат. Стимулирующий эффект малеата (МТ), цитрата (ЦТ) и 3,3',5-трийодо-L-тиронина (T_3) составляет соответственно 5,4 и 1,3% от эффекта фосфата. Действие тироксина (T_4) выражено еще слабее. Сукцинат (СТ), α -кетоглутарат (КГ), N-ацетил-L-аспартат (ААК) и L-аспартат (АК), а также 3,5-дйодо-L-тиронин (T_2) и 3,3',5-трийодотиреоусная кислота (T_3 УК) практически не стимулируют активность растворимого фермента. Однако в присутствии тиреоидных соединений (ТС) действие фосфата и других модуляторов значительно усиливается. Наиболее эффективным в этом отношении является T_3 . В его присутствии эффект низких концентраций фосфата усиливается более чем в 10 раз, а остальных модуляторов — в несколько десятков раз. T_4 , в отличие от других ТС, в этих условиях оказался совершенно не эффективным. При совместном применении фосфата с ЦТ, СТ, КГ, ААК и АК также наблюдается усиление их действия, но не более, чем в 3 раза. Однако любые другие сочетания испытанных модуляторов без участия фосфата или ТС не приводят к повышению активности растворимой глутаминазы. Полученные данные показывают, что растворимая глутаминаза мозга по своим регуляторным свойствам во многом принципиально отличается от её мембраносвязанной формы.

Сравнительно недавно работами английских исследователей было показано, что в митохондриальной фракции мозга свиньи, наряду с мембраносвязанной глутаминазой, содержится и легко экстрагируемая растворимая форма фермента [1]. Имея одинаковую субклеточную локализацию, они отличаются некоторыми регуляторными и кинетическими свойствами. Мембраносвязанная глутаминаза более чувствительна к низким концентрациям фосфата, чем растворимая и, если активированная фосфатом растворимой глутаминазы связано с её агрегацией, то мембраносвязанная глутаминаза не подчиняется этой закономерности. Показаны значительные отличия и в кинетике ингибирования глутаматом [2—4].

Следует отметить, что тиреоидные гормоны (ТГ), являясь эффективными аллостерическими активаторами ФЗГ, занимают особое место в регуляции активности её мембраносвязанной формы митохон-

дриальной фракции мозга и почек [5—9]. Вместе с этим установлено, что в митохондриях коркового слоя почек крыс также содержится растворимая глутаминаза и регуляция её активности ТГ во многом принципиально отличается от таковой мембраносвязанной формы фермента [10—12]. Однако роль ТГ, а также их возможных взаимоотношений с другими модуляторами в процессе регуляции активности растворимой глутаминазы мозга не изучена. Целью данной работы было изучение этого вопроса.

Материалы и методы

Митохондриальную фракцию, выделенную из коры мозга беспородных крыс массой 150—200 г по ранее описанной методике [13], промывали в ледяной дистиллированной воде и центрифугировали при 17000g в течение 20 мин. Полученный осадок суспендировали в воде, затем подвергали 6-кратному замораживанию-размораживанию и оставляли в замороженном состоянии в течение 20 ч при -20°. На следующий день размороженную митохондриальную фракцию центрифугировали 2 раза при 20000g: сначала в течение 40 мин, затем брали супернатант и центрифугировали ещё 20 мин. Полученную таким путем прозрачную, слегка опалесцирующую надосадочную жидкость использовали в качестве источника растворимой глутаминазы.

Инкубационная смесь в объеме 1,5 мл содержала 0,4 мл ферментного препарата (0,4—0,55 мг белка); 0,5 мл 0,2 М трис-НСl буфера pH 8,0; 20 мМ L-глутамин и, в зависимости от поставленной задачи, различные активаторы в следующих концентрациях: фосфат—6,25, 12,5 и 25 мМ, ЦТ, МТ, СТ, КГ, ААК и АК—по 50 мМ. Растворы этих соединений доводили NaOH до соответствующего pH. Концентрации ТС—Т₄ («Reanal», Венгрия), Т₃ («Koch-Light», Англия), Т₂ («Sigma», США), Т₃УК («Sigma», США) в опытах варьировали от 0,0125 до 0,1 мМ. Гормональные препараты растворяли добавлением 0,01 н. NaOH (pH 10). Реакционную смесь инкубировали 30 мин при 37° и постоянном встряхивании. Реакцию останавливали добавлением 0,3 мл 10%-ной трихлоруксусной кислоты. О глутаминазной активности судили по количеству образовавшегося аммиака, который определяли микродиффузионным методом. [14]. Количество белка в пробах определяли по методу Lowry и соавт. [15].

Результаты и обсуждение

Необходимо отметить, что полученная нами растворимая глутаминаза мозга обладает чрезвычайно низкой каталитической активностью, которая в отсутствие эффекторов не поддается определению. В связи с этим в первой серии опытов изучали влияние различных соединений на активность растворимой глутаминазы при различном pH среды. Среди испытанных модуляторов единственным эффективным активатором этой глутаминазы является фосфат (рис. 1). Максимальное повышение активности фермента в присутствии фосфата происходит при pH 8,5. Стимулирующее действие ЦТ и МТ на растворимую глутаминазу составляет примерно 4—5% от эффекта фосфата, а СТ, КГ, ААК и АК, Т₂ и Т₃УК практически не стимулируют активность фермента. Эффект Т₃ составляет немногим более 1% от эффекта фосфата. Ещё меньше выражено действие Т₄. В связи с приведенными данными интересно отметить, что ТГ и другие соединения являются эффективными активаторами мембраносвязанной глутаминазы мозга [7, 16].

В следующей серии опытов изучали влияние фосфата на активность растворимой глутаминазы мозга в присутствии ТС, учитывая то обстоятельство, что их совместное применение значительно стимулирует активность мембраносвязанной формы фермента [8].

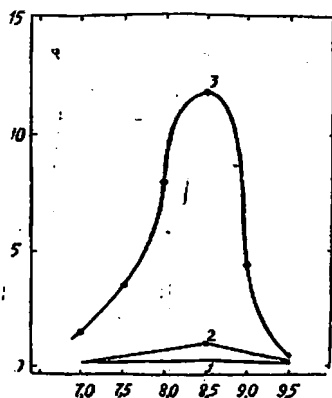


Рис. 1. Влияние различных эффекторов на активность растворимой глутаминазы мозга крысы в зависимости от pH среды. 1—активность фермента в присутствии T_3 (0,1 мМ); 2—MT; ЦТ (50 мМ); 3— P_1 (25 мМ). По оси абсцисс—значение pH среды; по оси ординат—активность фермента, мкмоль NH_3 /мг белка. $n = 8-10$

Как показывают данные, представленные на рис. 2, все испытанные ТС-потенцируют стимулирующее действие фосфата. Однако потенцирование происходит в различной степени и зависит как от природы применяемого гормона, так и от концентрации фосфата. При одновременном применении 25 мМ фосфата с высокими концентрациями T_3 и $T_3УК$ происходит примерно 6-кратное усиление действия фосфата, а в аналогичных опытах с T_4 и T_2 эффект фосфата усиливается соответственно в 3 и 2,5 раза. Во всех случаях предельное повышение активности фермента наступает при концентрации ТС, равной 0,05 мМ. Повышение концентраций T_3 , $T_3УК$, T_2 и T_4 до 0,1 мМ не приводит к заметным изменениям уровня активности фермента. Однако при уменьшении концентрации фосфата, потенцирование его действия в случае применения T_3 сильно возрастает. Так, эффект 12,5 и 6,25 мМ фосфата усиливается соответственно в 12—17 раз, между тем как в опытах с $T_3УК$ и T_2 стимулирующее действие этих же концентраций фосфата усиливается всего лишь в 3—4 раза. При применении низких концентраций фосфата потенцирование его эффекта в присутствии T_4 полностью исчезает. В этой связи необходимо отметить, что и T_4 , и T_3 примерно одинаково потенцируют стимулирующее действие фосфата на мембраносвязанную глутаминазу митохондрий и синапсом мозга, а повышение активности фермента в этом случае происходит не более, чем в 3 раза. Иначе проявляется и действие $T_3УК$ на активность этих форм фермента [8]. Если с повышением концентрации $T_3УК$ активность мембраносвязанной глутаминазы митохондрий, стимулируемая фосфатом, резко падает, а эффект потенцирования полностью исчезает, то активность растворимой глутаминазы в этих же условиях несколько возрастает.

Далее исследовали влияние ЦТ, МТ, СТ, КГ, ААК и АК на активность растворимой глутаминазы мозга в присутствии различных ТС. Начальные точки на кривых, представленных на рис. 3, показывают, что при pH 8,0 СТ, ААК, АК и КГ (50 мМ), также как и ТС, добавленные в отдельности, почти не активируют растворимую глутаминазу. Несмотря на это, при одновременном добавлении указанных модуляторов с T_3 и его производными активность фермента сильно возрастает. Как видно, степень активирования фермента зависит не только от при-

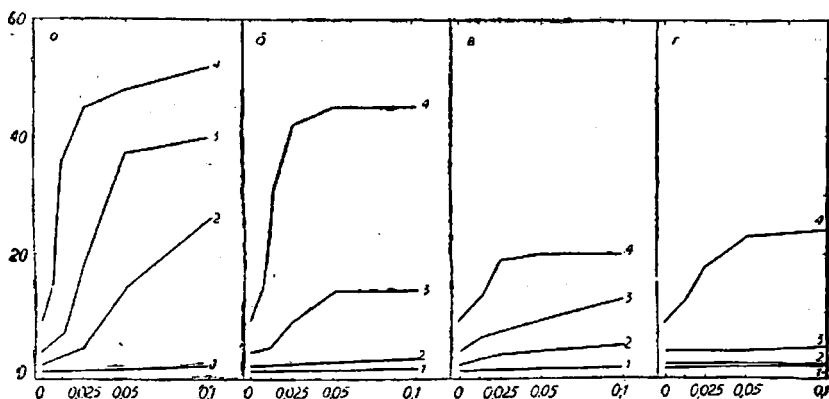


Рис. 2. Действие фосфата на активность растворимой глутаминазы мозга крыс в присутствии различных тиреоидных соединений (ТС) (pH 8,0). а—активность фермента в присутствии T_3 ; б— T_3UK ; в— T_2 ; г— T_4 . 1—ТС; 2—ТС + 6,25 мМ P_i ; 3—ТС + 12,5 мМ P_i ; 4—ТС + 25 мМ P_i . По оси абсцисс—концентрация тиреоидных соединений; по оси ординат—активность фермента, мкмоль NH_3 /мг белка, $n=10-12$.

роды ТС, но и от характера применяемого модулятора. Так, в присутствии T_3 , T_3UK и T_2 глутаминазная активность, стимулируемая МТ и ЦТ, повышается значительно сильнее, чем в случае применения СТ, ААК, АК и КГ, а наиболее эффективным среди гормональных препаратов, также как и в опытах с фосфатом, является T_3 . В его присутствии эффект МТ и ЦТ и остальных модуляторов возрастает в несколько десятков раз. Их действие в присутствии T_3UK выражено сильнее, чем при сочетанном применении с T_2 .

Однако, как выяснилось, из всех испытанных ТС исключение в этом отношении составляют только T_4 . При любых сочетаниях T_4 с указанными модуляторами не происходит сколько-нибудь заметного повышения активности глутаминазы. Этот факт заслуживает внимания в связи с тем, что T_4 и T_3 в одинаковой степени усиливают эффект указанных соединений на мембраносвязанную глутаминазу мозга, а её активность в этом случае повышается не более чем в 3—4 раза (неопубликованные данные). Кроме того, было показано, что в присутствии ТС действие ЦТ и МТ на мембраносвязанную глутаминазу потенцируется не сильнее, чем действие СТ, КГ, ААК и АК.

Таким образом, можно прийти к заключению, что по своим регуляторным свойствам растворимая глутаминназа во многом принципиально отличается от её мембраносвязанной формы, и это отличие, в основном, обусловлено особенностями действия ТС.

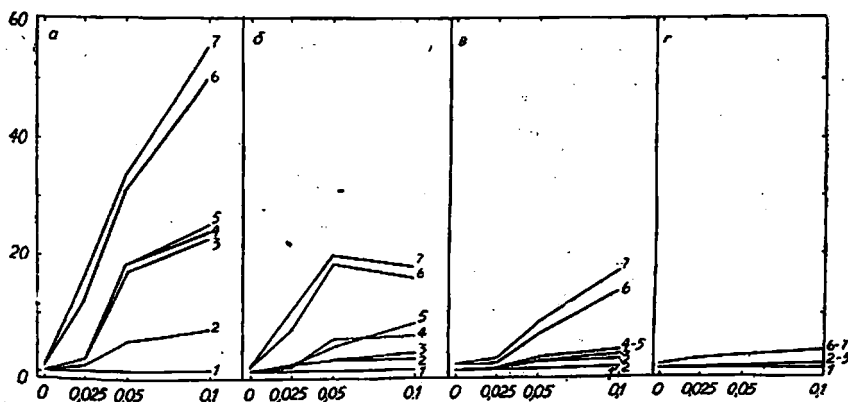


Рис. 3. Действие цитрата, малеата, сукцината, аспартата, ацетиласпартата и кетоглутарата на активность растворимой глутаминазы мозга крыс в присутствии различных тиреоидных соединений (ТС) (рН 8,0). а—активность фермента в присутствии T_3 ; б— T_3 УК; в— T_2 ; г— T_4 . 1—ТС; 2—ТС+АК (50 мМ); 3—ТС+ААК (50 мМ); 4—ТС+КГ (50 мМ); 5—ТС+СТ (50 мМ); 6—ТС+СТ (60 мМ); 7—ТС+МТ (50 мМ). По оси абсцисс—концентрация тиреоидных соединений, мМ; по оси ординат—активность фермента, мкмоль NH_3 /мг белка, $n = 10-12$.

Из полученных данных становится ясно, что потенцирующий эффект гормона находится в зависимости от количества атомов йода в его молекуле. Для проявления максимального эффекта гормона необходимо наличие трех атомов йода и целостности аланинового радикала в молекуле тиронина. В то же время при увеличении на атом йода гормон (T_4) утрачивает потенцирующую способность, а с уменьшением на атом йода (T_2) эффективность ТС сильно падает.

Итак, выяснилось, что из двух гормонов щитовидной железы только T_3 активно действует на растворимую глутаминазу мозга. Специфичность эффекта T_3 интересна, так как в органах-мишенях регуляция обменных процессов обычно протекает с участием как T_4 , так и T_3 .

Работами ряда исследователей было установлено, что фосфат усиливает стимулирующее действие других модуляторов на активность глутаминазы мозга [17—19]. Потенцирующее действие фосфата проявляется и в опытах с мембраносвязанной глутаминазой митохондрий (неопубликованные данные). Исследования, проведенные с растворимой глутаминазой мозга (рис. 4), показали, что при сочетанном применении фосфата с другими модуляторами их эффект возрастает от 1,5 до 3 раз, а степень повышения активности фермента при низких концентрациях фосфата выражена несколько сильнее, чем при высо-

ких. Здесь важно отметить, что при сочетанном применении ЦТ с МТ, СТ, КГ, ААК или АК, а также при любых других сочетаниях этих соединений не происходит сколько-нибудь заметного повышения активности фермента.

Таким образом, можно прийти к выводу, что в процессе регуляции активности растворимой глутаминазы мозга среди всех испытанных эффекторов особое место занимают фосфат и T_3 . Вместе с этим можно отметить, что фосфат, хотя и является самым эффективным активатором фермента, однако в координировании действия других модуляторов более важная роль принадлежит T_3 .

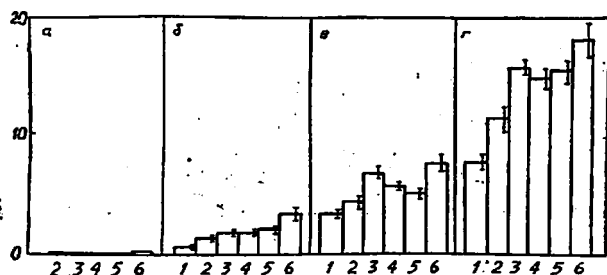


Рис. 4. Действие цитрата, сукцината, аспартата, ацетиласпартата и кетоглутарата на активность растворимой глутаминазы мозга в присутствии фосфата (рН 8,0). а—активность фермента в отсутствие фосфата; б—в присутствии 6,25 мМ P_i ; в—12,5 мМ P_i ; г—25 мМ P_i . 1— P_i , 2— P_i +КГ (50 мМ); 3— P_i +АК (50 мМ); 4— P_i +СТ (50 мМ); 5— P_i +ААК (50 мМ). По оси ординат—активность фермента, мкмоль NH_3 /мг белка, $n=10-12$.

В регуляции активности глутаминазы участвует и ряд других гормонов. Диэтилstilбестрол оказывает двоякое действие на активность глутаминазы мозга: в зависимости от применяемого активатора в одном случае ингибирует, в другом—усиливает их эффект [20]. Глутаминаза митохондриальной фракции печени стимулируется глюкагоном, вазопрессинном, норадреналином и ангиотензином-II. Среди них наиболее эффективным является глюкагон, в присутствии которого активность фермента повышается в 2,5 раза [21]. Однако ТГ являются специфическими активаторами глутаминазы и занимают ключевое положение в процессе регуляции активности этого фермента [5—10, 16].

Известно, что ФЗГ мозга и почек, имея субъединичную структуру и благодаря способности ассоциировать и диссоциировать в буферных системах, может существовать в различных взаимопревращающихся молекулярных формах [22, 23]. Установлено, что фосфат и борат способствуют быстрой кооперации субъединиц и приводят к образованию димера, а в случае совместного их применения—полимера, которые являются более активными формами фермента [24—26]. Можно допустить, что в наших опытах в присутствии фосфата повышение актив-

ности глутаминазы происходит вследствие его димеризации, но при этом, по-видимому, не наблюдается полного завершения этого процесса, а в случае совместного добавления фосфата с T_3 либо завершается процесс димеризации, либо фермент приобретает совершенно новую конформацию, переходя в высокоактивное олигомерное или полимерное состояние. Отсутствие заметного повышения активности фермента в присутствии T_3 или других эффекторов, добавленных в отдельности, можно объяснить тем, что эти соединения сами по себе не вызывают каких-либо изменений в четвертичной структуре фермента, а при их совместном применении повышение активности глутаминазы происходит, вероятно, вследствие образования ассоциатов из мономерных форм фермента.

В настоящее время, по-видимому, трудно сказать какие молекулярные формы глутаминазы функционируют в клетках организма, происходит ли их взаимопревращение и чем это обусловлено. Надо полагать, что растворимая глутаминаза—это та часть мембраносвязанной формы фермента, которая, будучи не прочно связанной со структурными элементами митохондрий мозга, с переходом в раствор превращается в иную молекулярную форму, приобретая при этом другие регуляторные свойства. В то же время оставшийся в осадке фермент прочно связан и перевести его в раствор не удастся. Наряду с этим было показано, что многократное повторное замораживание и размораживание осадка гомогенатов почек крыс приводило к высвобождению все новых и новых порций растворимой глутаминазы с присущими ей регуляторными свойствами [12]. На основании этих данных можно предположить, что растворимая и мембраносвязанная формы глутаминазы почек—это взаимопревращающиеся молекулярные формы, и в связанном состоянии фермент имеет одну олигомерную структуру, а в свободном—другую. Возможно, именно этим обусловлено различие их регуляторных свойств.

Надо отметить, что растворимая и мембраносвязанная глутаминазы как мозга, так и почек обладают идентичными регуляторными свойствами [5, 8—10, 12] и, можно думать, что прочная связь мозговой глутаминазы с мембранами митохондрий обусловлена спецификой белкового и липидного окружения фермента. Конечно, трудно сказать, может ли функционировать в клетке растворимая глутаминаза как таковая и каковы механизмы регуляции её высвобождения и связывания. Однако из вышесказанного следует, что в регуляции активности глутаминазы, помимо многочисленных низкомолекулярных соединений физиологической природы, очевидно, немаловажную роль играют липиды и белки внутренней мембраны митохондрий.

PHOSPHATE-DEPENDENT SOLUBLE GLUTAMINASE FROM RAT BRAIN: ROLE OF DIFFERENT AGENTS IN THE MODULATION OF ITS ACTIVITY

BEDJANYAN K. D., BADALYAN L. L., OGANESYAN V. C.

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

Phosphate turned to be the sole effective activator of soluble phosphate-dependent glutaminase (PDG) from brain tissue. Stimulating effect of maleate (MT), citrate (CT) and 3,3',5'-triodo-L-tyrosine (T_3) comprises 5,0,3,0 and 1.3% of phosphate effect, respectively. Succinate (ST), α -ketoglutarate (α -KG), N-acetyl-L-aspartate (N-AA), L-aspartate (A), 3,5-diiod-L-tyrosine (T_2) and 3,3',5'-triodoacetic acid (T_3 AA) exert no effect on PDG. Thyroid compounds (TC), except for T_4 potentiate the effect of phosphate and other modulators: T_3 proved to be the most effective one, potentiating the effect of low concentration of phosphate 10-fold, that of other TC-several tens-fold. Joint addition of phosphate and CT, ST, α -KG, N-AA or A enhances the effect not more than 3-fold.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nimmo G., Tipton K. F. J. Neurochem., v. 33, p. 1083—1094, 1979.
2. Nimmo G., Tipton K. F. Biochem. Pharmacol., v. 29, p. 359—367, 1980.
3. Nimmo G., Tipton K. F. Biochem. Pharmacol., v. 30, p. 1635—1641, 1981.
4. Nimmo G., Tipton K. F. Eur. J. Biochem., v. 117, p. 57—64, 1981.
5. Оганесян В. С., Бунятыан Г. Х., Микиртумова К. С., Бадалян Л. Л. Вопр. биохимии мозга, т. 6, с. 5—13, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1970.
6. Оганесян В. С., Бадалян Л. Л., Микиртумова К. С., Саакян Ж. Дж. Вопр. биохимии мозга, т. 6, с. 5—13, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1970.
7. Бадалян Л. Л., Бунятыан Г. Х., Оганесян В. С. Вопр. биохимии мозга, т. 10, с. 40—54, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1975.
8. Оганесян В. С., Амбарцумян В. Г., Беджаниян К. Д. Нейрохимия, т. 3, с. 372—381, 1984.
9. Саакян Ж. Дж., Оганесян В. С. Биол. журн. Армении, т. 35, № 4, с. 264—271, 1982.
10. Оганесян В. С., Саакян Ж. Дж., Айрапетян Р. Л., Бунятыан Г. Х. Биол. журн. Армении, № 33, с. 932—940, 1980.
11. Оганесян В. С., Бадалян Л. Л., Бунятыан Г. Х. Докл. АН АрмССР, 69, с. 243—245, 1979.
12. Бадалян Л. Л., Оганесян В. С. Биол. журн. Армении, т. 35, № 1, с. 29—36, 1982.
13. Паладин А. В., Кирсенко О. Б. Биохимия, т. 26, с. 385—390, 1961.
14. Силакова А. И., Труш Г. П., Являкова А. Вопр. мед. химии, т. 5, с. 538—545, 1962.
15. Lowry O. H., Rosenbrough N. T., Farr A. L., Randall R. G. J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
16. Оганесян В. С., Микиртумова К. С., Бунятыан Г. Х. Вопр. биохимии мозга, т. 12, с. 5—12, 1977.
17. Оганесян В. С., Бунятыан Г. Х., Бадалян Л. Л., Микиртумова К. С. Вопр. биохимии мозга, т. 5, с. 5—16, 1969.
18. Weil-Malherbe H. J. Neurochem., v. 16, p. 855—864, 1969.

19. *Svenneby G. J.*, *Neurochem.*, v. 18, p. 2201—2208, 1971.
20. *Микиртумова К. С., Айрапетян Р. Л., Оганесян В. С., Бунятян Г. Х.* *Вопр. биохимии мозга*, т. 11, с. 17—28, 1976.
21. *Corvera S., Garcia-Sainz J. A.* *Biochem. J.*, v. 219, p. 957—960, 1983.
22. *Svenneby G., Torgner I. Aa., Kvamme E. J.* *Neurochem.*, v. 20, p. 1217—1224 1973.
23. *Olsen B. R., Torgner I. Aa., Christensen T. B., Kvamme E. J.* *Mol. Biol.*, v. 74, p. 239—251, 1973.
24. *Kvamme E., Svenneby G., Tveit B.* In: *Regulation of Enzyme Activity and Allosteric Interactions* (eds. Kvamme E., Pihl A.), *FEBS Symposium*, p. 89, Universitetsforlaget, Oslo, 1968.
25. *Svenneby G., Tveit B., Kvamme E. J.* *Biol. Chem.*, v. 245, p. 1878—1882, 1970.
26. *Godfrey S., Kuhlenschmidt T., Curtoys N. P.* *J. Biol. Chem.*, v. 252, p. 1927—1951, 1977.

Поступила 26. VI 1985

НОВЫЕ КНИГИ

Receptor Biochemistry and Methodology (ed. by J. C. Venter and L. C. Harrison), John Wiley & Sons Ltd, England.

Новая серия книг, посвященных молекулярным аспектам изучения структуры и биохимических основ действия рецепторов, а также необходимой методологии их исследования. Первые три тома этой серии содержат обзоры, касающиеся общих подходов и специфической технологии, необходимых для проведения работ по изолированию, очистке и биохимической характеристике белков клеточной поверхности.

Том 1: Мембраны, детергенты и солюбилизация рецепторов, 238 с., 1984 г.

Том 2: Процедуры очистки рецепторов, 184 с., 1984 г.

Том 3: Молекулярные и химические характеристики рецепторов мембран, 306 с., 1984 г.



ВОДА В АКТИВНОМ ЦЕНТРЕ НЕЙРОКУПРЕИНА

ГАСПАРОВ В. С., НАЛБАНДЯН Р. М.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Методом протонной релаксации показано, что в активном центре нейрокупрена содержится одна молекула воды, координированная к меди. Расстояние между атомом меди и протонами воды составляет 0,3 нм. Время жизни молекулы воды в первой координационной сфере составляет 10^{-7} с. Показано, что основной вклад в парамагнитную релаксацию вносит вращательное броуновское движение макромолекулы белка.

Нейрокупренн—крайне кислый медьсодержащий белок, полученный из мозга, имеет M_r 10 кД и содержит 1 атом меди [1]. Он способен связывать и вступать в окислительно-восстановительные реакции с катехоламинами [2], которые возможны благодаря наличию меди в белке. Медь нейрокупрена принадлежит к так называемому второму типу, который, в частности, характеризуется доступностью к растворителю (воде). В связи с этим для изучения особенностей связывания воды в активном центре нейрокупрена целесообразно использовать метод протонной магнитной релаксации. Нейрокупренн, содержащий единственный атом меди, является особенно удобным объектом для таких исследований. В данной работе приведены результаты изучения нейрокупрена этим методом.

Материалы и методы

Нейрокупренн из мозга крупного рогатого скота был получен по методу Gasparov и соавт. [2], а апонейрокупренн—по методу Sharoyan и соавт. [1]. Восстановление белка проводили дитионитом натрия, удаляя избыток восстановителя гель-фильтрацией через сефадекс G-25 (сверхтонкий). Во всех описанных экспериментах белок ($5 \cdot 10^{-4}$ М) был растворен в 0,2 М ацетатном буфере, pH 6,0. Изменения pH этого раствора достигали добавлением 0,1 н. HCl или NaOH.

Время спин-решеточной (T_1) и спин-спиновой (T_2) релаксаций измеряли на импульсном ЯМР-спектрометре фирмы «Bruker» BKR-322S. T_1 —при помощи стандартной импульсной последовательности: 180° — τ — 90° , а T_2 —методом Карра-Парселла-Мейбума-Гилла [3]. Погрешность измерения T_1 и T_2 не превышала $\pm 5\%$.

Как известно, экспериментально измеряемые величины T_1 и T_2 для водных растворов белков, содержащих парамагнитный металл, и число молекул воды, связанных с этим металлом, находятся в зависимости друг от друга согласно уравнению Луза-Мейбума [4].

$$(\rho_m T_{ip})^{-1} = \frac{q}{\tau_m + T_{im}}, \quad (i = 1, 2)$$

где $(T_{ip})^{-1}$ представляет парамагнитный вклад связанного с белком металла в скорость протонной релаксации воды, ρ_m — отношение молярной концентрации связанного парамагнитного иона к концентрации воды, T_{1m} и T_{2m} — время продольной и поперечной релаксации протонов воды в первой координационной сфере металла, q — число молекул воды, связанных с металлом, τ_m — время жизни молекул воды в первой координационной сфере.

Время релаксации T_{1m} и T_{2m} для первой координационной сферы ионов меди может быть найдено из уравнений Соломона-Бломбергена [5, 6] в упрощенной для макромолекула форме:

$$\frac{1}{T_{1m}} = \frac{2}{15} \cdot \frac{\gamma_j^2 g^2 \beta^2 S(S+1)}{r^6} \cdot \left(\frac{3\tau_c}{1 + \omega_j^2 \tau_c^2} \right)$$

$$\frac{1}{T_{2m}} = \frac{1}{15} \cdot \frac{\gamma_j^2 g^2 \beta^2 S(S+1)}{r^6} \cdot \left(4\tau_c + \frac{3\tau_c}{1 + \omega_j^2 \tau_c^2} \right),$$

где γ_j — ядерное гиромагнитное отношение, β — магнетон Бора, τ — расстояние между ионом металла и протоном связанной с металлом воды, ω_j — Ларморова прецессия ядра, τ_c — время корреляции, характеризующее диполь-дипольное взаимодействие между спинами электрона и ядра, определяемое как сумма:

$$\tau_c^{-1} = \tau_R^{-1} + \tau_s^{-1} + \tau_m^{-1},$$

где τ_R — вращательное время корреляции связанного парамагнитного центра τ_s — время спин-решеточной релаксации электрона.

Результаты и обсуждение

В табл. 1 приведены значения T_1^{-1} и T_2^{-1} растворов нейрокуперина в окисленной, восстановленной и апо-форме. Резкое увеличение (в 5—6 раз) времен протонной релаксации окисленного белка по сравнению с восстановленной и апо-формой непосредственно указывает на наличие координированной к меди воды.

Таблица 1

Скорости протонной релаксации (s^{-1}), водных растворов нейрокуперина в 0,2 М ацетатном буфере, pH 6,4 при $T=300^\circ K$ на частоте 20 МГц

Препарат	$T_1^{-1} (s^{-1})$	$T_2^{-1} (s^{-1})$
Нейрокуперин окисленный	2,02	2,38
Нейрокуперин восстановленный	0,38	0,39
Апобелок	0,37	0,38
0,2 М ацетатный буфер	0,26	

На рис. 1 представлены температурные зависимости нормализованных парамагнитных вкладов раствора нейрокуперина, измеренных

на частотах 20 и 38,4 МГц. Как видно, температурные коэффициенты имеют отрицательный знак. С другой стороны, τ_m уменьшается с увеличением температуры. Поэтому можно заключить, что для данной области температур и частот выполняется условие быстрого химического обмена, то есть $\tau_m \ll T_{im}$. Следовательно, в упрощенном виде можно считать:

$$\frac{1}{T_{ip}} \approx \frac{\rho q}{T_{im}}$$

Рассчитанная величина при 300°K и 20 МГц оказалась равной $3,6 \cdot 10^{-9}$ с и близка к $\tau_R = 4,2 \cdot 10^{-9}$ с, полученной из гидродинамического уравнения Стокса-Эйнштейна. Это свидетельствует о том, что основной вклад в парамагнитную релаксацию вносит вращательное броуновское движение всей макромолекулы.

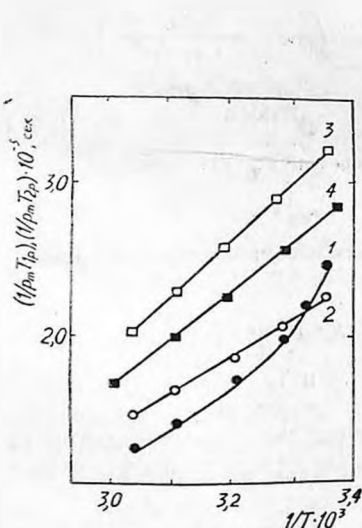


Рис. 1.

Рис. 1. Температурные зависимости нормализованных парамагнитных вкладов скоростей протонной релаксации воды нейрокупрена при рН 6,0. (—●—) — зависимость для $1/\rho_m T_{1p}$ при 20 МГц, (—○—) — зависимость для $1/\rho_m T_{1p}$ при 38,4 МГц, (—□—) — зависимость для $1/\rho_m T_{2p}$ при 38,4 МГц, (—■—) — зависимость для $1/\rho_m T_{2p}$ при 20 МГц.

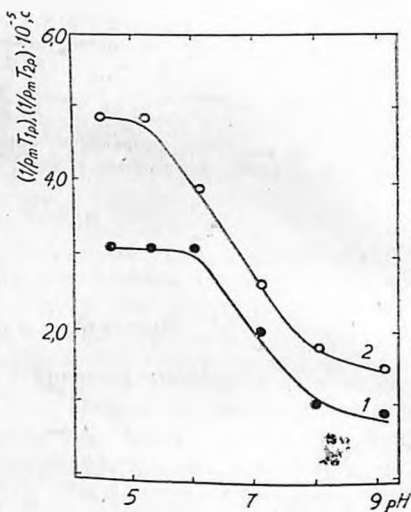


Рис. 2.

Рис. 2. Парамагнитные вклады в скорости протонной релаксации воды в водных растворах нейрокупрена в зависимости от рН при 20 МГц и 300 К. (—●—) — данные для $1/\rho_m T_{1p}$, (—○—) — данные для $1/\rho_m T_{2p}$.

рН-зависимости парамагнитных вкладов приведены на рис. 2. Как и оптические и ЭПР-спектры, изменения парамагнитных вкладов в зависимости от рН были полностью обратимы в диапазоне рН 4—10. Полученные зависимости имеют характер кривых титрования с точкой

перегиба вблизи от pH 7,0, что указывает на депротонирование воды, являющейся лигандом.

Определенный интерес представляет сравнение свойств воды, координированной к меди нейрокупреина и супероксиддисмутазы. Хорошо известно, что водный лиганд, координированный к меди в экваториальном положении, заметно отличается по свойствам от аксиально координированной воды. Так, экваториальный водный лиганд замещается сравнительно легче, чем аксиальный. Водный лиганд меди нейрокупреина имеет большее сходство с аксиальным. Как видно из табл. 2, в которой сравниваются основные параметры воды нейрокупреина и супероксиддисмутазы [7], вода в нейрокупреине находится на расстоянии 0,3 нм от атома меди и имеет время жизни $\tau_m = 10^{-7}$ с. Эти данные показывают также, что в первой координационной сфере меди в нейрокупреине содержится только одна молекула воды.

Таблица 2.

Параметры воды, координированной к меди в
нейрокупреине и супероксиддисмутазе

Величина	Нейрокупреин	Супероксиддисмутаза [7]	
		Аксиальный лиганд	Экваториальный лиганд
$\tau_m(\text{с})$	10^{-7}	$1,6 \cdot 10^{-7}$	$1,0 \cdot 10^{-5}$
$r(\text{нм})$	0,3	0,34	0,27
q	1	1	$\frac{1}{2}$
$\tau_e(\text{с})$	$4,3 \cdot 10^{-9}$ (при 20 МГц)	$2,7 \cdot 10^{-9}$ (при 60 МГц)	$2,7 \cdot 10^{-9}$ (при 60 МГц)

Наличие молекулы воды в медьсодержащем участке нейрокупреина объясняет ранее обнаруженную сильную зависимость формы сигнала ЭПР меди от pH [1] и указывает, что реакции замещения в активном центре белка идут именно через этот водный лиганд.

Мы выражаем признательность Гапгардту М. Г. (МГУ) за измерения, проведенные на частоте 36,4 МГц.

WATER IN THE ACTIVE SITE OF NEUROCUPREIN

GASPAROV V. S., NALBANDYAN R. M.

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences, Armenian SSR, Yerevan

Proton relaxation method has been used to detect a water molecule coordinated to copper in the active centre of neurocuprein. The distance between copper and protons of water was evaluated to be 0,3 nm. The life-time of water in the first coordination sphere is 10^{-7} sec. Brownian motion of the protein macromolecule is the main contributor to paramagnetic relaxation.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Sharoyan S. G., Shaljian H. H., Nalbandyan R. M., Buniatian H. Ch. *Biochim. et biophys. acta* v. 493, p. 478—487, 1977.
2. Gasparov V. S., Nalbandyan R. M., Buniatian H. Ch, *FEBS Lett.* v. 97, № 2, p. 37—39, 1979.
3. Farrar T. C., Becker E. D. *Pulsed and Fourier Transform NMR*, 1971.
4. Luz Z., Meiboom S. J. *Chem. Phys.*, v. 40, p. 2686—2692, 1964.
5. Solomon J. *Physiol. Revs.*, v. 99, p. 559—565, 1955.
6. Blombergen N. J. *Chem. Phys.*, v. 27, p. 512—516, 1957.
7. Boden N., Holmes M. C., Knowles P. F. *Biochem. J.*, v. 177, p. 303—309, 1979.

Поступила 24. III 1985.

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ФОСФОЛИПИДОВ
В НЕЙРОНАХ И НЕЙРОГЛИИ

ФЛЕРОВ М. А.

Физиологический институт им. А. А. Ухтомского Ленинградского
государственного университета им. А. А. Жданова-2

Исследовали метаболическую активность отдельных фракций фосфолипидов в различные сроки после введения ацетата- ^{214}C и (метил- ^3H)холина. Установлено, что в течение изученных сроков радиоактивной экспозиции наибольшая интенсивность включения радиоактивного углерода как в нейронах, так и в нейроглии наблюдается во фракциях фосфатидных кислот и фосфоинозитидов. При введении (метил- ^3H)холина радиоактивность зарегистрирована в 3-х фосфолипидных фракциях: лизофосфатидилхолине, фосфатидилхолине и сфингомиелине. Показано, что независимо от вводимого предшественника уровень радиоактивности отдельных фракций фосфолипидов выше в нейронах по сравнению с нейроглией, что, по-видимому, связано с наличием в нейронах и нейроглии различных генетически обусловленных систем биосинтеза фосфолипидов.

Изучение биохимических механизмов функциональной деятельности нейронов и их метаболической взаимосвязи с нейроглией является одним из актуальных направлений современной нейрохимии. Как известно, экспериментальные данные, полученные на гомогенатах мозговой ткани, позволяют охарактеризовать метаболические процессы в наиболее общем виде без учета своеобразия и специфики отдельных клеточных популяций ЦНС, а ведь именно нервная ткань отличается крайне выраженной гетерогенностью клеточного состава. Несмотря на то, что нейроны и нейроглии значительно различаются как по морфологическим признакам, так и по выполняемым функциям, они образуют единую метаболическую систему, идея о существовании которой впервые была выдвинута в классических работах Нуден [1—3].

Значительный прогресс в развитии функциональной нейрохимии был достигнут благодаря разработке метода препаративного получения клеточных фракций головного мозга, обогащенных нейронами и нейроглией [4—9]. Особое место в исследовании химического состава и метаболизма нейроглии занимают фосфолипиды. Е. М. Крекс писал: «Без непременно участия сложных липидов—фосфолипидов, протолипидов, стеролов не осуществляется почти ни один биологический процесс» [10]. Важнейшими из перечисленных липидов являются фосфоли-

пиды, составляющие около 70% всех липидов головного мозга. Они являются не только постоянными структурными компонентами клеточных мембран, но и принимают непосредственное участие в регуляции тонко сбалансированных биохимических реакций [11]. В то же время имеющиеся в литературе данные об участии фосфолипидов в функционировании системы нейрон—нейроглия немногочисленны, что во многом связано с методическими трудностями препаративного выделения фракций, обогащенных нейронами и нейроглией.

Целью настоящей работы явилось исследование метаболической активности отдельных фракций фосфолипидов в нейронах и нейроглии, выделенных из коры головного мозга.

Материалы и методы

Опыты ставили на белых крысах-самках массой 120—150 г. В качестве радиоактивных предшественников биосинтеза фосфолипидов использовали ацетат- ^{214}C (вводили подкожно из расчета 30 мкКи/100 г веса животного) и (метил- ^3H)холин (вводили интракраниально в дозе 5 мкКи). Время радиоактивной экспозиции было равно 60, 120, 180 мин.

По прошествии времени радиоактивной экспозиции крыс декантировали, быстро извлекали и отмывали от крови мозг охлажденным физиологическим раствором. Кору больших полушарий помещали на охлажденные стеклянные пластинки, тщательно измельчали, суспендировали в растворе поливинилпирролидона и выделяли фракции, обогащенные нейронами и нейроглией, по методу Sellinger и созат. [9] в нашей модификации, позволявшей выделять значительно больше клеточного материала. Подробно этапы предпринятой нами модификации описаны ранее [12]. Отдельные фракции фосфолипидов нейронов и нейроглии получали методом двумерной хроматографии в тонком слое силикагеля КСК [13]. Пятна, соответствующие фракциям фосфолипидов, после проявления в парах йода переносили с хроматограмм в вials для подсчета радиоактивности. Идентификацию отдельных фракций фосфолипидов проводили с помощью ИК-спектроскопии. Для этого пятна, соответствующие фракциям фосфолипидов нейронов и нейроглии, соскабливали в пробирку с притертой пробкой и осуществляли 3-кратную элюцию с помощью системы растворителей хлороформ: метанол: 7 н. NH_3 (120:70:10). Элюаты выпаривали на ротационном испарителе и после растворения в 10 мкл сероуглерода переносили в микрокюветы. Применение микротехники обусловлено тем, что выделенного из нейронов количества фосфолипидов (особенно минорных фракций) недостаточно для снятия ИК-спектров в обычных кюветах. Спектры снимали на инфракрасном спектрофотометре UR-20. Ввиду идентичности спектров нейрональных и нейроглиальных фосфолипидов на рисунке представлены ИК-спектры отдельных фракций фосфолипидов, выделенных из нейронов коры головного мозга. Для всех фракций фосфолипидов, как нейронов, так и нейроглии характерно наличие сильной полосы поглощения в области 1250—1215 см^{-1} , связанной с колебаниями группы $\text{P}=\text{O}$ и в области 1100—1050 см^{-1} ($\text{P}-\text{O}-\text{C}$). Это две главные полосы, которые отличают фосфолипиды от других липидов. Глицерофосфолипиды имеют сильную полосу поглощения 1750—1740 см^{-1} , связанную с колебаниями сложноэфирной группировки. В ИК-спектре сфингомиелинов были обнаружены полосы 1640 и 1550 см^{-1} (амид I и 2), связанные с колебаниями групп $\text{CO}-\text{NH}$. Присутствие холиновых группировок обнаруживается по полосе средней интенсивности 970 см^{-1} , характерной для фракций лизофосфатидилхолинов (ЛФХ), сфингомиелинов (СФМ) и фосфатидилхолинов (ФХ). Благодаря этой полосе отличают холинсодержащие фосфолипиды от этаноламинсодержащих. Так, в ИК-спектре фосфатидилэтанолamina (ФЭ) имеется одиночная полоса 1080 см^{-1} , а для холинсодержащих фосфолипидов характерен дуплет 1090,

1070 см^{-1} . Следует отметить, что в ИК-спектрах ФЭ нейроглии в отличие от ФЭ нейронов полоса 1650 см^{-1} , характерная для плазмалогенов, имеет большую интенсивность. Этот факт, по-видимому, свидетельствует об относительном обогащении ФЭ нейроглии по сравнению с нейрональными. После снятия спектра определяли количественное содержание отдельных фракций фосфолипидов в микрокувете. Данные представлены в табл. 1. Таким образом, количества отдельных фракций ФЛ для

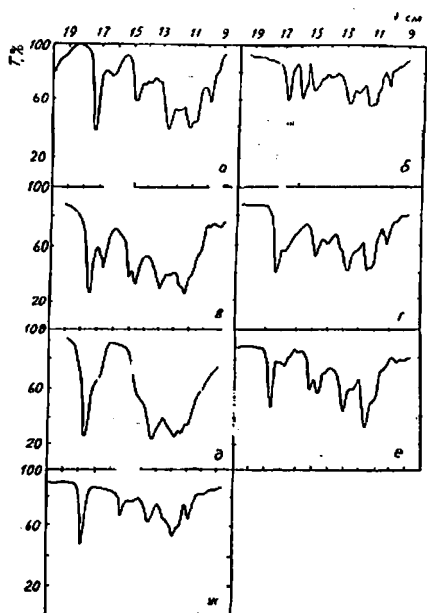


Рис. ИК-спектры отдельных фракций фосфолипидов нейронов. а—лизофосфатидилхолины, б—сфингомиелины, в—фосфатидилсерины, г—фосфатидилхолины, д—фосфонозиаты, е—фосфатидилэтаноламины, ж—фосфатидные кислоты

ИК-спектроскопии колебались в пределах от 6,2 до 29,2 мкг, давая удовлетворительные спектры, сравнимые с ИК-спектрами фосфолипидов, получаемых в обычных кюветах [14], в которых для анализа необходимо значительно большее количество вещества. Это несомненно существенно расширяет границы применения ИК-спектроскопии в нейрохимических исследованиях.

Результаты и обсуждение

В табл. 2 приведены данные по включению радиоактивного углерода C^{14} в отдельные фракции фосфолипидов нейронов в различные сроки после введения ацетата- 2^{14}C . Величина У. А. представлена в импульсах в 1 мин на 1 мг углерода (имп/мин·мг «С»). Из представленных данных видно, что через 60 мин после введения ацетата- 2^{14}C наибольшей У. А. обладает ФК, а наименьшей—СФМ. Довольно высоким уровнем метаболизма характеризуются фракции ЛФХ и ФИ. Через 120 мин после введения ацетата- 2^{14}C происходит увеличение У. А. отдельных фракций фосфолипидов: У. А. ФИ увеличивается по сравнению с 60-й мин после введения радиоактивного предшественника в среднем в 7 раз, а У. А. фосфатидилсерина (ФС) и СФМ—в 4

раза. У. А. остальных фракций также увеличивается, но не столь значительно. Через 180 мин после введения ацетата- 2^{14}C хоть и происходит увеличение У. А., но по сравнению с 2-часовой радиоактивной

Таблица 1

Содержание отдельных фракций фосфолипидов нейронов и нейроглии в микрокювете (мкг).

Фракции фосфолипидов	Нейроны	Нейроглия
Лизофосфатидилхолин	7,4	7,9
Сфингомиелин	12,4	9,6
Фосфатидилсерин	18,5	20,8
Фосфатидилхолин	17,8	27,8
Фосфатидилэтаноламин	18,5	29,2
Фосфатидилинозит	13,0	18,7
Фосфатидная кислота	6,2	15,2

экспозицией оно не столь значительно, как переход от 60 до 120 мин. Наибольшей У. А., как и через 120 мин, обладают фракции ФИ и ФК, наименьшей—СВМ и ФЭ. Увеличение У. А. ФИ и ФК в этот период по сравнению с 2-часовой радиоактивной экспозицией колеблется в пределах 1,5—2 раза.

Таблица 2

Удельная активность отдельных фракций фосфолипидов нейронов в различные сроки после введения ацетата- 2^{14}C (имп/мин. мг «С»)

Фракция фосфолипидов	Время радиоактивной экспозиции (мин)		
	60	120	180
Лизофосфатидилхолин	1060 $\pm$ 221	3560 $\pm$ 1215	9139 $\pm$ 2367
Сфингомиелин	613 $\pm$ 34	2308 $\pm$ 611	2778 $\pm$ 573
Фосфатидилсерин	719 $\pm$ 274	3034 $\pm$ 348	7402 $\pm$ 877
Фосфатидилхолин	747 $\pm$ 106	1784 $\pm$ 279	4020 $\pm$ 779
Фосфатидилинозит	902 $\pm$ 69	6230 $\pm$ 1115	10381 $\pm$ 1318
Фосфатидилэтаноламин	682 $\pm$ 69	1513 $\pm$ 301	2685 $\pm$ 391
Фосфатидная кислота	2313 $\pm$ 722	4291 $\pm$ 1051	10235 $\pm$ 1952

Представленные данные величин У. А. отдельных фосфолипидов свидетельствуют об их высокой метаболической активности в нейронах. Однако очевидно, что в общую метаболическую активность фосфолипидов головного мозга вносят вклад и фосфолипиды, принадлежащие нейроглиальным клеткам. Поэтому нами была исследована динамика включения радиоактивного углерода в отдельные фракции фосфолипидов нейроглии. Данные представлены в табл. 3.

В нейроглии через 60 мин после введения ацетата- 2^{14}C наибольшей У. А. обладает фракция ФК, а наименьшей—ФЭ. В следующие 60 мин происходит увеличение уровня У. А. всех нейроглиальных фосфолипидных фракций, особенно ФИ, ФС, и ЛФХ. У. А. ФИ в этот

период возрастает в 4 раза по сравнению с часовой радиоактивной экспозицией. Через 180 мин после введения ацетата- 2^{14}C только в двух фракциях, а именно в ФК и ФЭ, У.А. возрастает в среднем в 1,5 раза. Наибольшей У.А., так же как и при 120 мин экспозиции, обладает фракция ФИ, а наименьшей—ФЭ.

Таблица 3

Удельная активность отдельных фракций фосфолипидов нейроглии после введения ацетата- 2^{14}C (имп/мин. мг «С»)

Фракции фосфолипидов	Время радиоактивной экспозиции (мин)		
	60	120	180
Лизофосфатидилхолин	492 $\pm$ 117	1443 $\pm$ 135	2185 $\pm$ 322
Сфингомиелин	372 $\pm$ 120	698 $\pm$ 77	743 $\pm$ 121
Фосфатидилсерин	326 $\pm$ 23	1049 $\pm$ 256	1945 $\pm$ 511
Фосфатидилхолин	64 $\pm$ 153	864 $\pm$ 89	995 $\pm$ 130
Фосфатидилинозит	414 $\pm$ 98	2317 $\pm$ 310	2782 $\pm$ 626
Фосфатидилэтаноламин	157 $\pm$ 25	326 $\pm$ 30	481 $\pm$ 99
Фосфатидная кислота	1206 $\pm$ 96	1591 $\pm$ 118	2504 $\pm$ 498

Полученные данные по динамике включения радиоактивного углерода свидетельствуют о том, что во все исследованные сроки радиоактивной экспозиции нейропальные фосфолипиды имеют более высокий метаболический статус по сравнению с нейроглиальными. Как известно, с помощью ацетата- 2^{14}C удастся проследить метаболическую активность гидрофобных компонентов молекулы фосфолипидов. Наряду с этим несомненный интерес представляют обменные реакции азотистых оснований. Данные по изучению включения меченых азотистых оснований позволяют сделать заключение относительно активности ферментативных систем биосинтеза отдельных представителей фосфолипидов в различных клеточных популяциях ЦНС. Одним из важнейших азотистых оснований, входящих в состав наиболее представительной группы фосфолипидов, а именно ЛФХ, ФХ и СФМ, является холин. В табл. 4 представлены результаты по включению (метил- ^3H)холина во фракции фосфолипидов нейронов и нейроглии в различные сроки радиоактивной экспозиции. В нейронах через 60 мин после введения (метил- ^3H)холина наибольшей У.А. обладает фракция ЛФХ, а наименьшей—фракция СФМ. ФХ по уровню метаболизма в этот период занимает промежуточное положение. Через 120 мин У.А. ФХ увеличивается более чем в 2 раза, а У.А. ЛФХ и СФМ практически не изменяется. В дальнейшем происходит снижение уровня ЛФХ в среднем в 1,5 раза и повышение У.А. СФМ в 2,4 раза. При расчете процентного распределения радиоактивности по фракциям 80% последней во все исследованные сроки сосредоточено во фракции ФХ.

В нейроглии через 60 и 120 мин после введения (метил- ^3H)холина наибольшей У.А. обладают ЛФХ, а наименьшей—СФМ. Следует отметить, что в период между 60 и 120 мин наблюдается увеличение

У.А. ЛФХ более чем в 1,5 раза, а через 180 мин она достигает такого же уровня, как через 60 мин после введения (метил- ^3H)холина. Для СФМ характерен относительно постоянный уровень У.А. в течение 2-часовой радиоактивной экспозиции с последующим резким, в среднем в 5 раз, возрастанием её в период между 120 и 180 мин. У.А. ФХ в первые 2 ч ниже У.А. ЛФХ в среднем в 2 раза, однако через 180 мин после введения (метил- ^3H)холина её уровень в среднем в 1,7 раза выше, чем У.А. ЛФХ. В исследованные сроки в ФХ нейроглии сосредоточено от 75 до 90% радиоактивности общих липидов.

Таблица 4

Удельная активность отдельных фракций фосфолипидов нейронов и нейроглии в разные сроки после введения (метил- ^3H)холина (нмп/мин·мг ФЛ)

Фракция фосфолипидов	Время радиоактивной экспозиции (мин)		
	60	120	180
Нейроны			
Лизофосфатидилхолин	10121±1240	11362±1936	7578±1016
Сфингомиелин	1477±211	1669±291	4079±175
Фосфатидилхолин	5556±1039	12837±2011	12037±1039
Нейроглия			
Лизофосфатидилхолин	4689±944	7416±1090	4286±502
Сфингомиелин	405±112	585±158	2710±550
Фосфатидилхолин	2952±209	4781±745	7859±780

Таким образом, на основании приведенных данных можно сделать вывод, что независимо от используемого радиоактивного предшественника в нейронах фосфолипидные фракции обладают более высокой скоростью обмена, чем фосфолипиды нейроглии.

Это положение справедливо не только для предшественников, меченных ^{14}C и ^3H , но также и для ^{32}P [15]. Следовательно, все компоненты молекулы фосфолипидов, как гидрофобные, так и гидрофильные различаются в нейронах и нейроглии по уровню своего метаболизма. Более высокий уровень метаболической активности нейрональных фосфолипидов по сравнению с нейроглиальными подтверждает важную роль фосфолипидов в процессах, связанных с транспортом ионов, секрецией медиаторов, действием гормонов и др. В настоящее время установлено, что такие фракции фосфолипидов, как ФХ, ФС, ФИ и ФЭ, обладают способностью связывать двухвалентные ионы, и в частности Ca^{2+} [16—18]. Прямое отношение фосфолипидов к ионной проницаемости подтверждается в опытах с адренохромом, осуществляющим деполяризацию мембран [19], и с обработкой мембран фосфолипазами, вызывающими быстрое падение мембранного потенциала и сопротивления мембраны [20]. Наиболее значительные изменения в метаболизме отмечены для фракций ФИ, ФК и ЛФХ. Это связано прежде всего с тем, что ФК и ФИ принимают самое непосредственное

участие в осуществлении нейрохимических процессов, происходящих на уровне нейрональных клеток. Поэтому эти фракции являются одними из самых высокометаболизируемых фракций в нейронах (табл. 2). Во все изученные сроки радиоактивной экспозиции их У.А. значительно превышает У.А. остальных фосфолипидных фракций. Высокий уровень обмена ЛФХ ещё до недавнего времени объясняли тем, что этот минорный фосфолипид является основной транспортной формой холина [21], потребности в котором наиболее значительны в нейронах.

Однако появившиеся в последнее время данные свидетельствуют о том, что ЛФХ играет определенную роль в секреции нейромедиаторов. По-видимому, не только ФК, но и ЛФХ являются теми мембранными липидами, которые осуществляют связь между деполаризацией и освобождением медиаторов в головном мозгу на молекулярном уровне [22—24]. Довольно высокий уровень метаболизма ФИ и ФК в нейроглии (табл. 3) подтверждает их прямую связь с транспортом ионов, в частности в регуляции активности Na^+ , K^+ -АТФазы, которая выше в клетках нейроглии по сравнению с нейронами [25, 26]. Следует также отметить высокую степень включения радиоактивных предшественников в СФМ нейронов. У.А. СФМ в нейронах в 2—3 раза выше У.А. СФМ нейроглии. Такое различие в метаболизме сфингомиелинов связано с двойственной функцией, которую они выполняют в ЦНС: с одной стороны, динамической, связанной с высоким уровнем метаболизма в телах нейронов, и с другой—структурной функцией в мембранах нейроглии и миелине [27—29]. По-видимому, все сказанное о СФМ в полной мере относится к ФС, которые также обмениваются в нейронах интенсивнее, чем в нейроглии. Представленные данные по динамике включения радиоактивных предшественников свидетельствуют о существовании различных систем биосинтеза фосфолипидов в нейронах и нейроглии. По-видимому, биосинтез нейрональных фосфолипидов обусловлен транспортом предшественников из нейроглии. Данные о большей интенсивности обмена фосфолипидов подтверждаются и при исследовании ферментов, катализирующих их превращения. Так, активность CDP-холин-1,2-диглицерид-фосфотрансферазы в нейронах почти в 3 раза выше, чем в нейроглии, а этаноламинтрансферазная активность более чем в 2 раза выше в нейрональных телах [30, 31]. Активность таких ферментов деградации фосфолипидов, как фосфолипаза A_1 , в 8 раз, а фосфолипазы A_2 в 5 раз выше во фракции нервных клеток по сравнению с нейроглией [32]. Обнаруженные различия в метаболизме отдельных фракций фосфолипидов отражают скорее количественные, чем качественные отличия в процессах распада и синтеза последних в нейронах и нейроглии и подтверждают существование единой метаболической системы нейрон—нейроглии на уровне обмена фосфолипидов.

METABOLIC ACTIVITY OF PHOSPHOLIPIDS IN NEURONS AND NEUROGLIA

FLEROV M. A.

Leningrad State University

The metabolic activity of individual phospholipid fractions has been studied at different time intervals (60, 120 and 180 min) after acetate- ^{214}C and (methyl- ^3H) choline injection to rats. It was established that maximal intensity of radioactive carbon incorporation in neurons and neuroglia was in the fractions of phosphatidic acid and phosphoinositides. After injection of (methyl- ^3H)-choline the radioactivity was detected in three phospholipid fractions: lysophosphatidylcholine, phosphatidylcholine and sphingomyelline. It was shown that irrespective of injected radioactive precursors the level of radioactivity in individual phospholipid fractions was higher in neurons than in neuroglia. Apparently, it is due to existence of genetically different systems of phospholipid biosynthesis in neurons and neuroglia.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hyden H. *Nature*, v. 184, p. 433—439, 1959.
2. Hyden H. *The Neuron* (ed. Elsevier), Amsterdam, 1967.
3. Хиден Х., Ланге П.—В кн.: Биохимия и функции нервной системы (под ред. Е. М. Крепса), с. 21—34, Л., Наука, 1967.
4. Rose S. P. R. *Nature*, v. 206, p. 621—622, 1965.
5. Rose S. P. R. *Biochem. J.*, v. 102, p. 33—34, 1967.
6. Freysz L., Bieth R., Judez C., Jacob M., Sensenbranner M. J. *Physiol. (France)*, v. 59, p. 239—245, 1967.
7. Norton W. T., Potusto S. E. *Science*, v. 167, p. 1144—1145, 1970.
8. Blomstrand C., Hamberger A. J. *Neurochem.*, v. 16, p. 1401—1407.
9. Sellinger O. L., Legrand J., Clos J., Ohlsson W. *i. J. Neurochem.*, v. 23, p. 1137—1144, 1971.
10. Крепс Е. М. Липиды клеточных мембран, Л., Наука, 1981.
11. Крепс Е. М. Фосфолипиды клеточных мембран нервной системы в развитии животного мира (под ред. Опарина А. И.), Л., Наука, 1967.
12. Флёров М. А. *Вопр. мед. химии*, т. 24, с. 174—180, 1978.
13. Pumprey A. M. *Biochem. J.*, v. 108, p. 38, 1968.
14. Флёров М. А., Зубер В. Л. *Вопр. мед. химии*, т. 17, № 2, с. 211—215, 1971.
15. Freysz L., Bieth R., Mandel P. J. *Physiol. (France)*, v. 58, p. 520—522, 1967.
16. Haesser H., Chapman O., Dawson R. M. C. *Biochim. et biophys. acta*, v. 183, p. 309—331, 1969.
17. Jabusaki K. K., Wells M. A. *Biochemistry*, v. 14, p. 162—166, 1975.
18. Puskin I. S., Martin T. *Biochim. et biophys. acta*, v. 552, p. 53—65, 1979.
19. Flerov M. A. *Abstr. 5th Int. Meet. of Int. Soc. For Neurochem.*, Barcelona, v. 294, p. 377, 1975.
20. Hinsen D. H., Taus L. J. *Physiol.*, v. 268, p. 21—34, 1977.
21. Hingworth, Portman O. *Biochem. J.*, v. 130, p. 557—567, 1972.
22. Harris R. A., Schmidt J., Hitzemann B. A., Hitzemann R. J. *Science*, v. 212, p. 1290—1291, 1981.

23. Putney J. W. Jr. Life Sci., v. 29, p. 1183—1191, 1981.
24. Bradford P. G., Marinetti G. V., Abood L. G., J. Neurochem., v. 41, № 6, p. 1684—1693, 1983.
25. Medzihradsky F., Sellinger O. L., Nandasri P. S., Santlago J. C. J. Neurochem., v. 19, p. 543—545, 1972.
26. Флёров М. А., Толстухина Т. И., Тезисы докладов VI конф. биох. прибалтийских республик, БССР г. Ленинграда. с. 447—448, Зинатне, 1981.
27. Freysz L., Bleth R., Mandel P. J. Neurochem., v. 16, p. 1417—1424, 1969.
28. Freysz L., Lastennet A., Mandel P. J. Neurochem., v. 27, p. 355—360, 1976.
29. Freysz L., Mandel P. J. Neurochem., v. 34, № 2, p. 305—308, 1980.
30. Freysz L., Mandel P. FEBS Lett., v. 40, p. 110—113, 1974.
31. Binaglia L., Roberti R., Francesconsell E., Porcellati G. Lipids, v. 9, p. 738—747, 1974.
32. Woelt H., Jahrreiss R. In: Myelination and demyelination, p. 45—53, N. Y.—London, 1978.

Поступила 28. III 1985

НОВЫЕ КНИГИ

Inositol and Phosphoinositides. Metabolism and Regulation (ed. by I. E. Bleasdale, I. Elchberg and G. Hauser), John Wiley & Sons Ltd, England, 1985.

В книге представлены сведения о современном состоянии и перспективах исследований в области изучения инозитола и фосфоинозитидов. Подробно освещены вопросы, касающиеся метаболизма инозитола и гомеостаза, биосинтеза и деградации фосфоинозитидов, роли фосфоинозитидов и кальция в фосфорилировании белков, метаболизма фосфоинозитидов в нервной системе и т. д.



УДК 577.352.56:577.115

СОСТАВ ЛИПИДНОЙ ФАЗЫ НЕРВНЫХ ПРОВОДНИКОВ
В ПОКОЕ И ИЗМЕНЕНИЕ ЕГО ПРИ ВОЗБУЖДЕНИИРЕВИН В. В., КАДИМАЛИЕВ Д. А., ЛНЯСЬКИН Ю. К.,
КОЛЕСНИКОВА В. Н., *КОЛЬС О. Р.Мордовский госуниверситет им. Н. П. Огарева, г. Саранск,
*Московский госуниверситет им. М. В. Ломоносова, Москва

Изучен индивидуальный состав фосфолипидов и молярное соотношение холестерин/фосфолипиды в сепальном нерве лягушки и нервном стволе кальмара в покое и при проведении ритмического возбуждения, а также после прекращения раздражения. Показано, что изменение количества заряженных фосфолипидов—фосфатидной кислоты и фосфоинозитидов, а также молярное соотношение холестерин/фосфолипиды являются параметрами, тонко реагирующими на изменение функционального состояния нервных проводников.

В последние годы появилось довольно много работ, посвященных изучению роли липидов в функционировании возбудимых мембран. Большинство выводов об активном участии липидов в процессах, протекающих на мембранах, сделано на основании экспериментов, выполненных, во-первых, на модельных системах, главным образом на бислойных липидных мембранах и липосомах; во-вторых, на выделенных из клеток фракциях—синапсоммах, саркоплазматическом ретикулуле, плазматических везикулах и др.; в-третьих, непосредственно на возбудимых образованиях. В последнем случае обычно исследовали фосфолипидный состав мембран и сравнивали данные, полученные на организмах, находящихся на разных ступенях эволюционного развития [1—3]. При этом оставался, по существу, в тени принципиальный вопрос: происходят ли изменения в липидной фазе возбудимых мембран при переходе от покоя к возбуждению? Между тем обнаружение различий в индивидуальном составе липидов нервных проводников в покое и при возбуждении свидетельствовало бы о возможном участии липидов в функционировании возбудимых мембран. В литературе на этот счет имеются лишь отдельные сведения [4—6].

Для выяснения вопроса об участии липидной фазы нервных про-

проводников в процессе проведения возбуждения мы исследовали индивидуальный фосфолипидный состав нервов в покое и при возбуждении и изменения параметра, характеризующего состояние мембраны—молярного соотношения холестерина/фосфолипиды.

Материалы и методы

В работе использовали седлищные нервы лягушки и гигантские аксоны кальмара (кальмара Бертрапа). Изолированные нервные проводники раздражали во влажной камере от стимулятора ЭСЛ-2. Потенциалы действия наблюдали на экране катодного осциллографа С1-48 или С1-65. Нервы лягушки раздражали с частотой 80 имп/с, а нервы кальмара с частотой 30 имп/с. Параметры раздражающих электрических импульсов: для лягушки амплитуда—450 мВ, длительность—0,3 мс; для кальмара амплитуда—750 мВ, длительность—0,3 мс. Нераздражившиеся нервы (нервы в покое) выдерживали во влажной камере столько же времени и при той же температуре, как и при раздражении. Липиды из нервных стволов экстрагировали по Bligh, Dyer [7]. Для разделения индивидуальных фосфолипидов (ФЛ) использовали метод двумерной микротонкослойной хроматографии в системе Rouser на пластинках фирмы Merck и КСК [8, 9].

Для идентификации ФЛ использовали общепринятые методы и соответствующие свидетели [10, 11]. Определение количества фосфора проводили по методу Vaskovsky и соавт. [12]. Концентрацию холестерина измеряли по модифицированному методу Courthaine и соавт. [13]. Для количественной оценки индивидуального состава ФЛ суммарное количество ФЛ принимали за 100% и рассчитывали долю каждой фракции.

Результаты и обсуждение

В седлищном нерве лягушки в состоянии покоя обнаружено и идентифицировано 8 индивидуальных ФЛ: фосфатидная кислота (ФК), фосфатидилсерин (ФС), фосфоинозитид (ФИ), лизофосфатидилхолин (ЛФХ), сфингомиелин (СФМ), фосфатидилэтанолламин (ФЭА), фосфатидилхолин (ФХ) и кардиолипин (КЛ) (табл. 1).

Было установлено, что при покое в нерве лягушки ФК, КЛ и ЛФХ содержались в следовых количествах. Наибольшая доля ФЛ от их общего количества приходилась на ФХ и ФЭА. Из общего количества липидов количество всех холинсодержащих ФЛ составляло 45%, а аминокислотсодержащих—51%. Раздражение нервов лягушки с частотой 80 имп/с в течение 1,5 мин приводило к снижению фракции ФИ на 20%. Процентное содержание остальных фракций практически не менялось (табл. 1).

Приведенные данные были получены на нерве лягушки, включающем тысячи нервных волокон. Поэтому здесь можно говорить только об интегральной характеристике исследуемых параметров. Чтобы выяснить, имеют ли место изменения фосфолипидного состава в одиночных возбудимых образованиях, были поставлены опыты на гигантских аксонах кальмара.

Было обнаружено, что в состав ФЛ гигантских аксонов входят 10 индивидуальных ФЛ: ФК, ФС, ФИ, СФМ, ФХ, ФЭА, КЛ, а также лизофосфатидилхолин (ЛФХ), лизофосфатидилэтанолламин (ЛФЭА) и церамидэтилфосфонат (ЦЭФ).

Таблица 1

Содержание индивидуальных фосфолипидов в седалищном нерве лягушки
(в % от общего количества фосфолипидов)

Условия опыта	Фракции фосфолипидов							
	ФК	ФС	ФИ	ЛФХ	СФМ	ФХ	ФЭА	КЛ
Покой Стимуляция (80 имп/с, 1,5 мин)	следы	$13,25 \pm 1,20$	$3,42 \pm 0,22$	следы	$10,68 \pm 0,36$	$37,60 \pm 2,80$	$35,04 \pm 2,13$	следы
	следы	$13,36 \pm 0,10$	$2,76 \pm 0,20^*$	следы	$10,14 \pm 0,75$	$38,70 \pm 2,80$	$35,00 \pm 2,30$	следы

Примечание. * $p < 0,05$; в остальных случаях изменения недостоверны.

Таблица 2

Содержание индивидуальных фосфолипидов в нервном стволе кальмара
(в % от общего количества фосфолипидов)

Условия опыта	Фракции фосфолипидов								
	ФК	ФС	ФИ	ЛФХ	ЛФЭА+ СМФ	ЦАЭФ	ФХ	ФЭА	КЛ
Покой	$1,57 \pm 0,16$	$5,95 \pm 0,23$	$3,31 \pm 0,35$	$1,70 \pm 0,13$	$7,11 \pm 0,54$	$4,61 \pm 0,22$	$47,25 \pm 0,83$	$27,01 \pm 0,45$	$1,30 \pm 0,25$
Стимуляция (30 имп/с, 1,5 мин)	$1,07 \pm 0,12^*$	$5,60 \pm 0,31$	$3,73 \pm 0,40$	$2,14 \pm 0,60$	$6,17 \pm 0,22^*$	$4,75 \pm 0,35$	$46,96 \pm 0,77$	$27,21 \pm 0,47$	$1,97 \pm 0,20^*$
Через 1,5 мин после прекращения стимуляции	$1,43 \pm 0,27$	$6,21 \pm 0,41$	$3,50 \pm 0,37$	$1,93 \pm 0,36$	$6,81 \pm 0,41$	$4,33 \pm 0,55$	$46,57 \pm 0,65$	$27,10 \pm 0,74$	$2,02 \pm 0,20$

Примечание. * $p < 0,05$; в остальных случаях изменения недостоверные

При покое наибольшая доля от всех ФЛ приходилась на ФХ и ФЭА. В наименьшем количестве были представлены КЛ, ЛФХ и ФК. В аксоне кальмара был выявлен ФЛ, который ранее из аксона не выделяли—ЦАЭФ; его количество составляло 4,6%. Предполагается, что его функция, как и функция СФМ, изоляторная [2]. Общее содержание ФЛ, имеющих в своем составе аминогруппы, в аксонах кальмара равнялось 40%, а ФЛ, включающих холин—50%. В данном случае картина оказалась обратной той, которую наблюдали в случае нерва лягушки: у кальмара доля аминоксодержащих ФЛ в нерве ниже, чем холинсодержащих (табл. 2).

При проведении возбуждения достоверные изменения были обнаружены в трех фракциях. Содержание ФК уменьшалось на 32%, а содержание ЛФЭА и СФМ—на 14%. Сфингомиелин является весьма стабильным ФЛ и обновляется очень медленно [2]. Можно полагать, что изменения, обнаруженные во фракциях ЛФЭА и СФМ, происходили лишь за счет лизоформы ФЭА. Затем заметно менялось количество КЛ—превышение над уровнем покоя составляло 46%. Достоверных изменений в индивидуальном составе остальных ФЛ фракций при возбуждении не было выявлено.

Через 1,5 мин после прекращения ритмической стимуляции содержание ФК и фракции ЛФЭА+СФМ в нервном стволе кальмара возвращалось к уровню покоя, а содержание КЛ продолжало незначительно нарастать (табл. 2).

Вопрос о значении полярной части липидов широко обсуждается в литературе. В ряде работ показано, что состояние липидов связано с их химическим составом и зарядом полярной группы [15, 16]. Обнаружение изменений в индивидуальном составе основных ФЛ фракций при проведении возбуждения указало бы на один из возможных путей регуляции работы нонтранспортирующих систем. Но в наших условиях опыта при кратковременной стимуляции, когда по нерву проходило лишь небольшое число импульсов, существенных изменений в количественном распределении основных индивидуальных ФЛ не было выявлено. Очевидно, гидрофильная часть этих ФЛ достаточно стабильна [17]. Возможно, что функциональную роль выполняют ФК и ФИ; об этом свидетельствуют и литературные данные [18, 19].

Очень важным параметром, регулирующим ионную проницаемость мембран, является количество холестерина и, соответственно, молярное соотношение холестерин/ФЛ в мембране [20, 21]. Поэтому мы попытались исследовать также изменения соотношения холестерин/ФЛ в нервных проводниках при возбуждении.

Было установлено, что в нерве лягушки в состоянии покоя содержание холестерина составляло 21%, а ФЛ—57% от общего количества липидов. Молярное соотношение холестерин/ФЛ равнялось 0,70. При стимуляции нервов с частотой 80 имп/с в течение 1,5 мин оно увеличилось до 0,74; при продлении стимуляции до 5 мин соотношение хо-

лестерин/ФЛ возрастало до 0,76. Через 5 мин после прекращения ритмической стимуляции величина отношения составляла 0,74 (табл. 3).

Аналогичная серия опытов была поставлена на нервных стволах кальмара. В гигантских аксонах кальмара при покое содержалось около 20% холестерина и 75% ФЛ. Молярное соотношение холестерина/ФЛ равнялось 0,50. Эти результаты находятся в соответствии с полученными ранее литературными данными [6]. При стимуляции нервных стволов кальмара с частотой 30 имп/с в течение 1,5 мин величина молярного соотношения холестерина/ФЛ становилась равной 0,43. Через 1,5 мин после прекращения стимуляции содержание холестерина и величина отношения холестерина/ФЛ приближалась к уровню покоя (табл. 3).

Таблица 3

Содержание холестерина, ФЛ и величина соотношения холестерина/ФЛ* в нервных стволах лягушки и кальмара

Условия опыта	Исследуемый параметр		
	Содержание холестерина (мкмоль/мг липида)	Содержание ФЛ (мкмоль/мг липида)	Молярное соотношение холестерина/ФЛ
Л я г у ш к а			
Покой	$0,54 \pm 0,01$	$0,77 \pm 0,04$	$0,70 \pm 0,015$
Стимуляция (80 имп/с, 1,5 мин)	$0,59 \pm 0,01$	$0,80 \pm 0,02$	$0,74 \pm 0,006$ ($p < 0,02$)
Стимуляция (80 имп/с, 5 мин)	$0,60 \pm 0,02$	$0,79 \pm 0,02$	$0,76 \pm 0,01$ ($p < 0,02$)
Через 5 мин после прекращения стимуляции	$0,58 \pm 0,02$	$0,78 \pm 0,03$	$0,74 \pm 0,01$ ($p < 0,05$)
К а л ь м а р			
Покой	$0,50 \pm 0,017$	$1,00 \pm 0,05$	$0,50 \pm 0,02$
Стимуляция (30 имп/с, 1,5 мин)	$0,44 \pm 0,02$	$1,02 \pm 0,04$	$0,43 \pm 0,016$ ($p < 0,02$)
Через 1,5 мин после прекращения стимуляции	$0,51 \pm 0,02$	$1,06 \pm 0,03$	$0,48 \pm 0,01$ ($p < 0,05$)

Примечание. * Величину M_r принимали за 386,7; общих ФЛ—750 Д

Сам факт, что после прекращения раздражения содержание холестерина возвращалось к уровню покоя, указывает на существование в нерве механизмов, регулирующих соотношение холестерина и ФЛ.

Учитывая данные о том, что холестерин влияет на активность Na^+ , K^+ -АТФазы и Ca^{2+} -АТФазы и на пассивный транспорт ионов [22—24], можно предположить, что изменение величины отношения холестерина/ФЛ в нервных проводниках при переходе от состояния покоя к возбуждению регулирует системы, ответственные за транспорт ионов, путем поддержания определенного уровня микровязкости. Уменьшение доли холестерина в аксоне свидетельствует, по-видимому, о том, что мембрана становится более жидкой. Это может явиться

фактором, создающим оптимальные условия для работы транспортных АТФаз [25].

Пока еще трудно сказать, какие системы ответственны за изменения молярного соотношения холестерина/ФЛ в нерве лягушки и аксоне кальмара. На данном этапе работы обнаружено, что индивидуальный состав ФЛ в нервных стволах лягушки и кальмара меняется при возбуждении по-разному. Так, в нерве лягушки достоверно сдвигалось (снижалось на 20%) только содержание ФИ; в нервном стволе кальмара достоверно изменялись три фракции—снижалось, соответственно, на 32 и 14% содержание ФК и ЛФЭА+СФМ и возрастало на 46% содержание КЛ. Разнонаправлены были и изменения молярного соотношения холестерина/ФЛ: в нерве лягушки при возбуждении величина этого отношения возрастала, а в нервном стволе кальмара—снижалась.

Полученные результаты позволяют предполагать, что участие ФЛ в процессе распространения ритмического возбуждения в миелиновых и немиелиновых нервных проводниках реализуется различно. Вероятно, наряду с изменениями количества индивидуальных ФЛ, существенным фактором, регулирующим состояние нонтранспортирующих систем в возбудимых мембранах, является и молярное соотношение холестерина/ФЛ.

COMPOSITION OF NERVE CONDUCTORS LIPID PHASE AT REST AND AT STIMULATION

REVIN V. V., KADYMALIEV D. A., LIYASKIN Y. K., KOLESNIKOVA V. N.,
KOLS O. R.

Mordovian ASSR State University, Saransk, M. V. Lomonosov State University,
Moscow

Individual composition of phospholipids and molar cholesterol phospholipid ratio have been studied in frog n. ischiaticus and calmar nervous trunk at rest, at rhythmical stimulation and after it. It has been demonstrated that changes in the amount of charged phospholipids—phosphatidic acid and diphosphonositides—and in the molar cholesterol phospholipid ratio reflect changes in the functional state of nervous conductors.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Антонов В. Ф. Липиды и ионная проницаемость мембран. М., Наука, 1982.
2. Кренс Е. М. Липиды клеточных мембран. Л., Наука, 1981.
3. Boldyrev A. A. Stud. biophys., v. 84, № 3, p. 153—160, 1981.
4. Gould R. M., Pant H., Calner H., Tytell M. J. Neurochem., v. 40, № 5, p. 1293—1299, 1983.
5. Brunetti M., Guittila A., Porcellatti G. J. Neurochem., v. 32, p. 319—324, 1979.
6. Zambrano F., Cellino M., Canesso-Fischer M. J. Membrane Biol., v. 6, p. 289—303, 1971.
7. Bligh E. G., Dyer W. J. Can. J. Biochem. Physiol., v. 37, p. 911—917, 1959.
8. Svetashev V. I., Vaskovsky V. E. J. Chromatogr., v. 67, № 2, p. 376—378, 1972.

9. Rouser G., Kritchevsky G., Yamamoto A.—In: *Lipid Chromatographic analysis*, v. 1, p. 99—162, Dekker Inc., N. Y., 1967.
10. Beiss U. J. *Chromatogr.*, v. 13, № 1, p. 104—110, 1964.
11. Marinetti G. V., *New Biochemical Separations*, D van Nostrand, Princeton; v. 7, p. 339—343, N. J., 1964.
12. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Y., Vasendin I. J. *Chromatogr.*, v. 114, p. 129—141, 1975.
13. Courhaine A. J., Miller W. H., Stein D. B. *J. Clin. Chem.*, v. 5, p. 609—612, 1959.
14. Костецкий Э. Я. *Журн. эволюц. биохимии и физиологии*, т. 18, № 1, с. 35—43, 1982.
15. Hinz J., Sturtevant J. J. *Biol. Chem.*, v. 247, p. 6071—6075, 1972.
16. Ladbroke B. D., Chapman D. *Chem. Phys. Lipids.*, v. 3, p. 304—367, 1969.
17. Четвериков Д. А.—В кн.: *Успехи нейробиологии*, Л., Наука, с. 73—82, 1974.
18. Ohsako S., Degushi T. *J. Biol. Chem.*, v. 21, p. 10945—10948, 1981.
19. Michell R. *Nature.*, v. 296, № 5857, p. 492—493, 1982.
20. Demel R. B., Bruckdorfer K. R., Van Deenen L. L. *Biochim. et biophys. acta.* v. 255, p. 321—352, 1972.
21. Лопухин Ю. М., Арчаков А. Н., Владимиров Ю. А., Коган Э. М. *Холестериноз*, М., Медицина, 1983.
22. Claret M., Garay R., Giraud F. *J. Physiol.*, v. 274, p. 247—263, 1978.
23. Papahadjopoulos D., Kimelberg H. K. *Progr. Surface Sci.*, v. 4, p. 141—232, 1973.
24. Ануховская Л. И., Ивашкевич С. П. *Вопр. мед. химии*, т. 25, с. 548—554, 1979.
25. Jackson B. L., Gotto A. M.—In: *Atherosclerosis Review* (ed. by R. Paoletti., A. M. Gotto) p. 1—21, N. Y., Raven Press, 1976.

Поступила 20. 11 1985

НОВЫЕ КНИГИ

Molecular Mechanisms of Ischemic Brain Damage
(ed. by K. K. Kogure, K. A. Hossmann, B. K. Siesjö and F. A. Welsh),
Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985.

Книга посвящена механизмам ишемического повреждения различных структур мозга.

В книге сосредоточено внимание на широко распространенном, но мало понятном феномене их избирательной ранимости. С целью попытаться объяснить это явление подробно освещается изменение при ишемии метаболизма возбуждающих нейротрансмиттеров, кальция, H^+ , а также таких важных макромолекул, как белки и липиды.



УДК 616.895.8

ОЧИСТКА И НЕКОТОРЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
ИЗОФЕРМЕНТОВ ЕНОЛАЗЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА БЫКА

НАЗАРЯН К. Б., КАЗАРЯН Б. А., КАРАПЕТАН Н. Г.

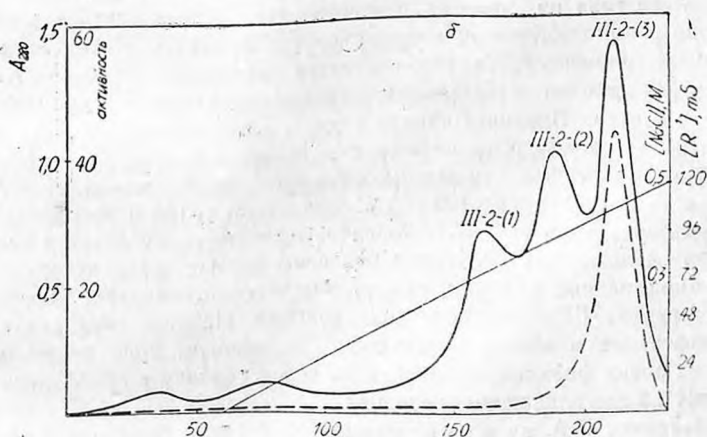
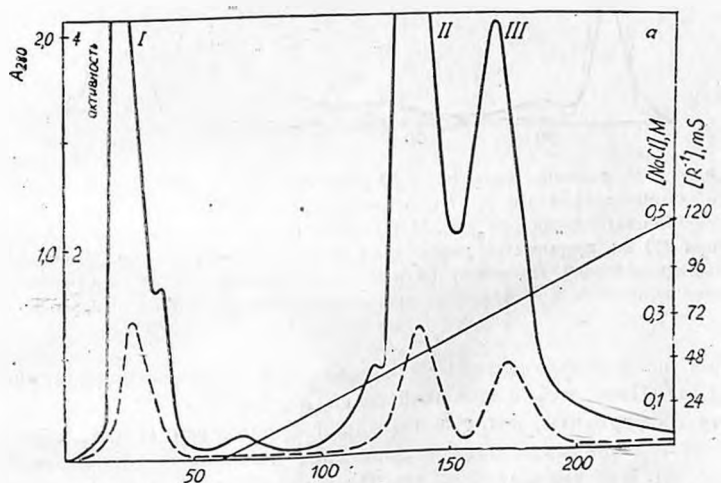
Институт экспериментальной биологии АН Арм ССР, Ереван

Енолаза (КФ. 4.2.1.11) у млекопитающих представлена, в основном, тремя изоферментами. Изофермент с субъединичным составом $\alpha\alpha$ характерен для печеночной ткани, $\beta\beta$ —для мышечной и $\gamma\gamma$ —для нервной [1]. Существование *in vivo* гетеродимеров типа $\alpha\gamma$ или других олигомеров пока нельзя считать окончательно доказанным. Установление тождественности белка 14-3-2 мономеру нейроспецифической енолазы [2] значительно повысило интерес исследователей к этому белку. Это объясняется тем, что белок 14-3-2 теперь изучается не только как специфический маркер нейронов, но и в энзимологическом аспекте при сравнительном анализе механизма функционирования изоферментов енолазы. В связи с этим выделение и очистка препаративных количеств изоферментов енолазы приобретают первостепенное значение.

Целью настоящей работы было получение в высокоочищенном виде $\alpha\alpha$ и $\gamma\gamma$ гомодимеров енолазы головного мозга. Препаративные количества мозговых енолаз получали из ткани головного мозга быка. Их иммунологическая идентичность с енолазами человека [2] позволяет использовать препараты бычьего мозга и антисыворотки к ним для определения сдвигов в содержании мозговых енолаз в биологических жидкостях человека, диагностическая ценность которых может считаться установленной [3, 4].

Гомогенизацию, экстракцию и высаливание сульфатом аммония проводили, как описано ранее [3], в 0,01 М трис-фосфатном буфере pH 7,4 с 5 мМ $MgSO_4$ (буфер А). Фракцию белков (~ 5 г), высаливающих при 60%-ном насыщении сульфатом аммония (фракция Р-60), наносили на колонку размером 4,5×30 см с ДЕАЕ-целлюлозой (ДЕ-32, Англия), уравновешенной буфером А. После промывания колонки двумя объемами буфера А связавшиеся белки элюировали 0—0,5 М линейным градиентом NaCl. Оптическую плотность элюата при 280 нм измеряли в непрерывном режиме, енолазную активность во фракциях определяли по методу Bara jowski, Wolna [6], креатинкиназную—по Ennor, Rosenberg [7].

При фракционировании на колонке с ДЕАЕ-целлюлозой идентифицируется 3 пика енолазной активности (рис. 1, а), которые, по литературным данным, соответствуют $\alpha\alpha$, $\alpha\gamma$ и $\gamma\gamma$ изоферментам [1]. Дальнейшую очистку $\gamma\gamma$ изофермента проводили рехроматографией на колонке $4,5 \times 30$ см с ДЕАЕ-целлюлозой в ацетатном буфере при pH 5,3 с 0—0,5 М линейным градиентом NaCl. Третий белковый пик при этом соответствовал $\gamma\gamma$ енолазе (рис. 1, б). Электрофорез в 7,5%-ном ПААГ с ДДС-На выявил в этом пике единственную белковую фракцию с высокой енолазной активностью (рис. 2). Для возможно более полного использования полученных с первой целлюлозной колонки фракций были подвергнуты рехроматографии на колонке с ДЕАЕ-целлюлозой



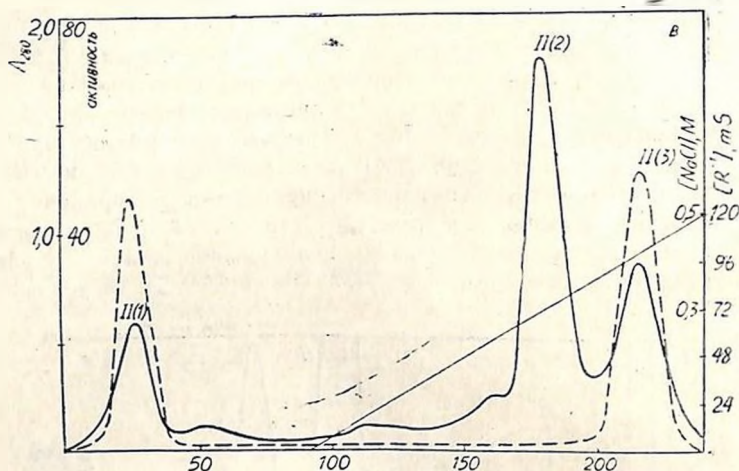


Рис. 1. Разделение фракции Р-60 на колонках с ДЕАЕ-целлюлозой. а—хроматография при pH 7,4; б—рехроматография при pH 5,3 II пика; в—рехроматография при pH 5,3 III пика. Сплошная линия—поглощение при 280 нм, прерывистая линия—енолазная активность. По оси абсцисс—номера фракций. По оси ординат слева—поглощение при 280 нм и енолазная активность в мкМ/мин/мг, справа—концентрация NaCl и электропроводность

при pH 5,3 и белки второго пика енолазной активности (фракция II, рис. 1, а). При этом с колонкой не связывались балластные белки $\alpha\alpha$, $\alpha\gamma$ изоферменты, которые выходили с фракцией II (1), а $\gamma\gamma$ изофермент в гомогенном виде элюировался линейным градиентом NaCl (рис. 1, в). Это указывает на то, что в растворе, видимо, существует равновесие типа $\alpha\gamma \rightleftharpoons \alpha\alpha + \gamma\gamma$, что позволяет использовать в качестве источника гомодимеров и гетеродимерную фракцию. Имеет ли место подобное равновесие *in vivo*—остается неясным. Недавно Kato и соавт. [8] высокочувствительным иммуноферментным методом обнаружили в клетках Пуркинье наряду с γ и α субъединицу енолазы, следовательно, гетеродимер $\alpha\gamma$, видимо, существует и *in vivo*.

Для дальнейшей очистки $\alpha\alpha$ енолазы использовалась гель-фильтрация на колонке (2,5×100 см) с сефадексом G-150 и препаративный электрофорез в блоке ПААГ. Разрабатывая эту схему очистки изоферментов енолазы, для получения большего выхода были использованы как гомодимерные фракции $\alpha\alpha$ и $\gamma\gamma$, так и гетеродимерная, элюированные с первой ДЕАЕ-целлюлозной колонки. Причем, как оказалось, $\gamma\gamma$ -изофермент в электрофоретически гомогенном виде можно получать из обеих фракций, пропуская их через колонку с ДЕАЕ-целлюлозой, pH 5,3 при одинаковых условиях.

Величина У.А. $\alpha\alpha$ и $\gamma\gamma$ изоферментов енолазы быка после очистки



Рис. 2. Электрофорез в ПААГ с ДДС-На препаратов α (а) и γ (б) мономеров изоферментов енолазы

составляла 50 и 45 мкМ/мин/мг белка соответственно. При сравнении этого параметра с результатами других авторов, выделивших изоферменты енoлазы из мозга мыши [9], крысы [10] и человека [11], было выявлено наличие определенных видовых различий. Обращает на себя внимание большой разброс значений активности изоферментов енoлазы человека, обусловленный, видимо, трупными изменениями (20—60 мкМ/мин/мг для $\gamma\gamma$ изофермента) [2]. Исходя из этого, можно сделать вывод, что наиболее удачным объектом для выделения значительных количеств изоферментов енoлазы является мозг быка, так как в этом случае подобного разброса данных не обнаружено.

Гомогенность препаратов $\alpha\alpha$ и $\gamma\gamma$ изоферментов енoлазы сохраняется как при электрофорезе в ПААГ с ДДС-Na, так и при аналитическом изофокусировании с амфолинами—процедурах, при которых разделяются $\gamma\gamma$ енoлаза и креатинкиназа ВВ, имеющие очень близкие физико-химические свойства [11]. С другой стороны, полученные препараты не обладают креатинкиназной активностью. Величина M_r $\alpha\alpha$ и $\gamma\gamma$ изоферментов енoлазы мозга быка приблизительно одинакова и равна 44 кД при электрофорезе с ДДС-Na (мономер) и 85 кД при гель-фильтрации через сефадекс G-150 в буфере А (димер). Изоэлектрическая точка, определенная при аналитическом изофокусировании в ПААГ с амфолинами pH 3—10, равна 7,05 для $\alpha\alpha$ и 5,2— $\gamma\gamma$ изофермента. Здесь также имеются небольшие межвидовые различия.

PURIFICATION AND SOME PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF BOVINE BRAIN ENOLASE ISOZYMES

NAZARYAN K. B., KAZARYAN B. A., KARAPETIAN N. G.

Institute of Experimental Biology, Armenian Academy of Sciences, Yerevan

Bovine brain enolase $\alpha\alpha$ - and $\gamma\gamma$ -isozymes have been purified by a procedure involving extraction and salting out of water-soluble proteins, chromatography on DEAE-cellulose (pH 7,4 and 5,3), Sephadex G-150 and preparative electrophoresis in PAAG.

Preparations of $\alpha\alpha$ - and $\gamma\gamma$ -enolase isozymes obtained are homogeneous on SDS PAAG electrophoresis. M_r of monomer is 40000, isoelectric points are 7,05 and 5,2, specific activity is 50 and 45 μ m of product $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Райдер К., Тейлор К.-В. кн.: Изоферменты, с. 49—52, М., Мир, 1983.
2. Zomzely-Neurath C. E. Scand. J. Immunol., Suppl., v. 9, № 1, p. 1—40, 1982.
3. Carney D. N., Ihde D. C., Cohen M. N., Marangos P. J., Bunn P. A., Mirna J. D., Gazdar A. F. Lancet, № 8272. p. 583—585, 1982.
4. Ishiguro Y., Kato K., Shimizu A., Ito T., Nagaya M.—Clin. Chem. Acta, v. 121, № 2, p. 173—180, 1982.

5. Назарян К. Б., Карапетян Н. Г., Казарян Б. А.—Нейрохимия, т. 1, № 2, с. 174—179, 1982.
6. Baranowski T., Wolna E.—In: Methods Enzymology, v. 42, p. 335—338, N. Y., Acad. Press., 1975.
7. Ennor A. H., Rosenberg H. Biochem. J., v. 51, № 2, p. 606—609, 1952.
8. Kato K., Suzuki F., Umeda J. J. Neurochem., v. 37, № 4, p. 998—1005, 1981.
9. Keller A., Scarna H., Mermet A., Pujot J.—F. J. Neurochem., v. 36, № 4, p. 1389—1397, 1981.
10. Suzuki F., Umeda J., Kato K.—J. Biochem., v. 87, № 6, p. 1587—1594, 1980.
11. Gerbitz K.—D., Deufel T., Summer I., Thallmer I., Wietand O. H. Clin. Chem. Acta, v. 133, № 2, p. 233—239, 1983.

Поступила 1. VI 1985

НОВЫЕ КНИГИ

Gene Expression in brain (ed. by C. Zomzely-Neurath and W. A. Wabker), John Wiley & Sons Ltd, England, 1985.

В книге рассматриваются вопросы использования молекулярно-биологической методологии в решении нейробиологических проблем. Приведен ряд технических приемов очистки мРНК и применения синтетических олигонуклеотидов для получения комплементарной ДНК, включающейся в плазмиды, а также её клонирования и амплификации в бактериальные векторы.

В книге представлены следующие главы:

Рекомбинантные ДНК в изучении генной экспрессии в нервной ткани; Генная экспрессия пептидных гормонов в мозгу; Молекулярная биология мозга млекопитающих; Нейроспецифические фосфопротенины как модель нейрональной генной экспрессии; Экспрессия белков микротубул в мозгу; Модификация генной экспрессии в мозгу млекопитающих после гипотермии; Молекулярная биология миелинизации и генная экспрессия основного белка миеллина; Вазоактивный интестинальный полипептид; от гена до пептида и др.

УДК 577.153

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАСТВОРИМОЙ H^+ -АТРАЗЫ МИТОХОНДРИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА БЫКА

КОРЯГИН А. С.

Кафедра биохимии Горьковского медицинского института

Характерной особенностью мозговой ткани является постоянный и высокий уровень энергетического обмена с интенсивным потреблением глюкозы и кислорода. По активности окислительных процессов мозг занимает ведущее место среди других органов и тканей, потребляя до 20—25% всего кислорода, поступающего в организм [1]. Основное количество АТР мозг получает в процессе окислительного фосфорилирования. Ферментной системой, осуществляющей синтез АТР в этом процессе, является митохондриальная АТР-синтетаза (F_0F_1 -АТРаза или H^+ -АТРаза). Осуществление АТР-синтетазной и АТР-гидролазной реакций связывают с самым высокомолекулярным белковым компонентом H^+ -АТРазного комплекса—растворимой H^+ -АТРазой (сопрягающий фактор F_1 или F_1 -АТРаза) [2]. F_1 -АТРаза различных организмов имеет сложную олигомерную структуру и состоит из пяти типов субъединиц: α , β , γ , δ , ϵ [3].

Большинство работ по изучению физико-химических характеристик, кинетики и регуляторных свойств этого фермента выполнены на препаратах сердца и печени. Данные о сопрягающем факторе F_1 из головного мозга отсутствуют, хотя эти сведения для нервной ткани имеют особое значение.

Целью настоящего исследования явилось изучение физико-химических характеристик растворимой H^+ -АТРАЗы, выделенной из головного мозга.

Растворимую H^+ -АТРазу (КФ 3.6.1.3) выделяли из митохондрий головного мозга быка по методу Horstman, Racker [4] в нашей модификации [5]. Для оценки гомогенности препарата применяли метод электрофореза в 5%-ном ПААГ, приготовленном на буфере трис-НСl, pH 7,5 [6]. Окраску гелей проводили 0,25%-ным раствором Кумасси R-250. Величину M_r субъединиц определяли методом электрофореза по Laemmli [7]. Активность фермента оценивали pH-метрическим методом [8]. Инкубационная смесь содержала (в мм): АТР—2, $MgSO_4$ —2, трис-НСl—3, pH 8,3. В пробу конечным объемом 7 мл вносили 10—15 мкг белка. АТРАЗную реакцию регистрировали в течение 1—2 мин.

При исследовании влияния олигомицина на активность фермента его добавляли в инкубационную среду в конечной концентрации 1,5 мкг/мл. Реакцию регистрировали через 2 мин после введения в ячейку олигомицина. Изучение действия водорастворимого карбоднимид (ЦМКД) проводили методом преникубации фермента в среде следующего состава: 0,25 М сахараза, 0,25 мМ ЦМКД, 10 мМ трис-НСl, pH 7,0 при 20°. Количество инкубируемого белка соответствовало 0,5 мг в объеме 0,5 мл. Активность регистрировали через 20, 40, 60 мин после начала преникубации. Влияние 2,4-динитрофенола (ДНФ) исследовали в инкубационной среде, содержащей (в мМ): ДНФ—2, АТФ—2, $MgSO_4$ —2, трис-НСl—3, pH 7,5.

Оценивая чистоту полученного препарата, определяли его гомогенность по наличию в геле одной полосы. Степень очистки фермента по сравнению с перзичным неочищенным препаратом равна ~ 11 . У.А. фермента составила 16—24 мкмоль P_i /мин на мг белка.

Установлено, что митохондриальная F_1 -АТРаза мозга имеет олигомерную структуру и содержит пять типов субъединиц: α , β , γ , δ , ϵ (рис. 1) с M_r 53, 50, 29, 19, 11,8 кД соответственно. Из данных денситометрии выявлено количественное соотношение субъединиц $\alpha:\beta:\gamma:\delta:\epsilon$ как 3:3:1:1:1. Учитывая полученные данные по величине M_r и стехиометрии субъединиц, рассчитана M_r исследуемого фермента, которая составила 370 кД. Подобная величина приводится для M_r F_1 -АТРаза из митохондрий сердца быка [9].

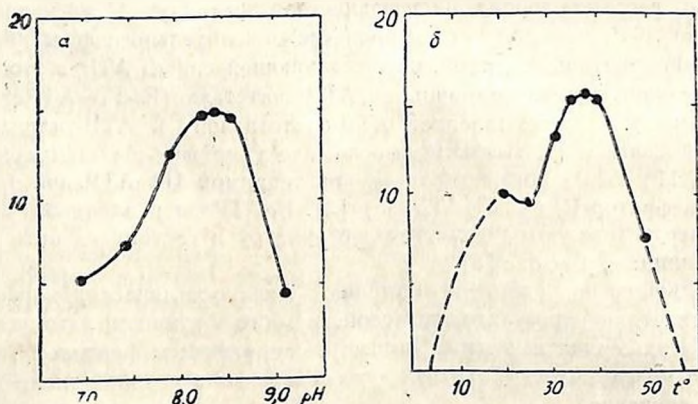


Рис. 2. Зависимость АТРазной активности фактора F_1 от pH среды (а) и температуры среды (б). По оси ординат—активность в мкмоль P_i /мин/мг белка

Проведенные исследования показали, что митохондриальная растворимая H^+ -АТРаза не чувствительна к олигомицину и ингибируется ЦМКД. Водорастворимый карбоднимид вызывает к 60 мин после начала преникубации ингибирование АТРазной активности примерно на 40%. Близкая степень ингибирования ферментативной активности ЦМКД показана для АТРаза из сердца быка [10].

Изучение влияния ДНФ на F_1 -АТразу мозга показало отчетливую (до 67%) стимуляцию начальной скорости АТРазной реакции. До

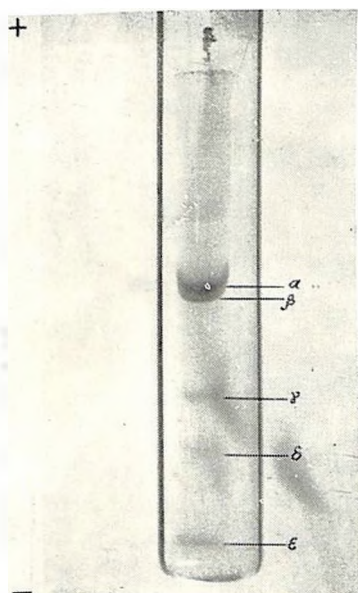


Рис. 1. Электрофорез растворимой H^+ -АТРаза в ПААГ в присутствии $DDC \cdot Na$

сих пор не ясен механизм этого увеличения каталитической активности, обнаруженного также в отношении фермента из других тканей. По мнению Акименко и соавт. [11], стимулирующее действие ДНФ не связано с истинной активацией фермента, а обусловлено снятием торможения, вызываемого ADP—продуктом АТРазной реакции.

Исследование влияния pH среды на активность фермента показало, что смещение pH в щелочную сторону до 8,5 повышает АТРажную активность. Дальнейшее увеличение pH приводит к быстрому снижению активности фермента (рис. 2, а). Полученные результаты соответствуют подобным данным для фактора F_1 из других тканей [12, 13].

При определении зависимости активности фермента от температуры выявлено уменьшение активности в интервале от 20 до 25°. Максимальную активность наблюдали при 37°. Дальнейшее повышение температуры до 50° приводит к уменьшению активности фермента (рис. 2, б). Аналогичную двухфазную температурную зависимость имеет растворимая АТРаза из сердца быка [14].

Приведенная физико-химическая характеристика растворимой митохондриальной H^+ -АТРазы головного мозга быка—олигомерная организация, субъединичный состав, величина M_r , температурный и pH оптимумы ферментативной активности—позволяют сделать заключение о сходстве её свойств с F_1 -АТРазами, выделенными из других тканей.

PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERISTIC OF SOLUBLE H^+ -ATPase FROM BRAIN MITOCHONDRIA

KORYAGIN A. S.

Chair of Biochemistry, Medical School, Gorky

The soluble H^+ -ATPase from bovine brain has been investigated. Judged by SDS-PAAG electrophoresis the purified ATPase contained α , β , γ , δ and ϵ subunits. The dependence of the ATPase activity from pH and temperature is established. The properties of the soluble H^+ -ATPase from bovine brain are similar with those of ATPase from other tissues.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Нейрохимия (под ред. М. И. Прохоровой), Л., ЛГУ, 1979.
2. Козлов Н. А., Черняк Б. В.—В кн.: Успехи биологической химии, т. 24, с. 65—82, М., Наука, 1983.
3. Kagawa Y., Sone N., Hirata H., Yosida M. J. Bioenerg. and Biomembr. 11, № 3/4, p. 39—78, 1979.
4. Horstman L. L., Racker E. J. Biol. Chem., v. 245, p. 1336—1344, 1970.
5. Хаатова Е. М., Новикова Н. А., Корягин А. С. Автор. свид. на изобрет. № 1070479, кл. G 01 N 38/50.
6. Маузер Г. Диск-электрофорез. Теория и практика электрофореза в полиакриламидном геле. М., Мир, 1971.
7. Laemmli U. K. Nature, v. 227, p. 114—125, 1970.

8. Болдырев А. А., Лебедев А. В., Ритов В. Б. Вopr. мед. химии, т. 15, с. 622—626, 1969.
9. Knowles A. F., Ginefsky H. S. J. Biol. Chem., v. 247, p. 6624—6630, 1972.
10. Имедидзе Э. А., Козлов Н. А., Метельская В. А., Мильгрюн Я. М. Биохимия, т. 43, с. 1404—1412, 1978.
11. Акименко В. К., Минков Н. Б., Виноградов А. Д. Биохимия, т. 36, с. 655—658, 1971.
12. Акименко В. К., Минков Н. Б., Бакеева Л. Е., Виноградов А. Д. Биохимия, т. 37, с. 348—359, 1972.
13. Noustek J., Drahota Z. Biochem. et biophys. acta, v. 484, p. 127—139, 1977.
14. Киядзе А. А., Евтодченко Ю. В., Сухомудренко А. Г. Биофизика, т. 25, с. 232—233, 1980.

Поступила 5. IV 1985

Н О В Ы Е К Н И Г И

Neurotransmitters in Action (ed. by David Bausfield), Elsevier Biomedical Press, Amsterdam—New York, Oxford, 1985.

В сборнике представлены статьи, в которых освещены наиболее выдающиеся успехи последних лет в понимании химических основ передачи нервного импульса. Большинство из них охватывает механизмы «существования» различных нейротрансмиттерных систем, действия субстанции Р — первого нейронервотрансмиттера пептидной природы, опиоидных пептидов — семьи нейронервотрансмиттеров и рецепторов. Ряд статей посвящен роли дофамина в патологии нервной системы, функции нейронервотрансмиттеров в поведенческих реакциях в норме и патологии и т. д.

Aging of the Brain (ed. by W. H. Gispen and S. Traber), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1984.

Сборник материалов 1-го Международного симпозиума по проблемам старения мозга, состоявшегося 16—18 ноября 1982 г. в Кologne, ФРГ. Симпозиум освещал вопросы морфологических и нейрохимических коррелятов старения, пластичности и регенерации, циркуляции и метаболитических коррелятов в функции мозга, поведенческих коррелятов у животных и человека, старческих заболеваний.

8. Болдырев А. А., Лебедев А. В., Ритов В. Б. Вспр. мед. химии, т. 15, с. 622—626, 1969.
9. Knowles A. F., Ginefsky H. S. J. Biol. Chem., v. 247, p. 6624—6630, 1972.
10. Имедидзе Э. А., Козлов Н. А., Метельская В. А., Мильгрюн Я. М. Биохимия, т. 43, с. 1404—1412, 1978.
11. Акименко В. К., Минков Н. Б., Виноградов А. Д. Биохимия, т. 36, с. 655—658, 1971.
12. Акименко В. К., Минков Н. Б., Бакеева Л. Е., Виноградов А. Д. Биохимия, т. 37, с. 348—359, 1972.
13. Noustek J., Drahota Z. Biochem. et biophys. acta, v. 484, p. 127—139, 1977.
14. Киядзе А. А., Евтодченко Ю. В., Сухомудренко А. Г. Биофизика, т. 25, с. 232—233, 1980.

Поступила 5. IV 1985

Н О В Ы Е К Н И Г И

Neurotransmitters in Action (ed. by David Bausfield), Elsevier Biomedical Press, Amsterdam—New York, Oxford, 1985.

В сборнике представлены статьи, в которых освещены наиболее выдающиеся успехи последних лет в понимании химических основ передачи нервного импульса. Большинство из них охватывает механизмы «существования» различных нейротрансмиттерных систем, действия субстанции Р — первого нейронервотрансмиттера пептидной природы, опиоидных пептидов — семьи нейронервотрансмиттеров и рецепторов. Ряд статей посвящен роли дофамина в патологии нервной системы, функции нейронервотрансмиттеров в поведенческих реакциях в норме и патологии и т. д.

Aging of the Brain (ed. by W. H. Gispen and S. Traber), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1984.

Сборник материалов 1-го Международного симпозиума по проблемам старения мозга, состоявшегося 16—18 ноября 1982 г. в Кologne, ФРГ. Симпозиум освещал вопросы морфологических и нейрохимических коррелятов старения, пластичности и регенерации, циркуляции и метаболических коррелятов в функции мозга, поведенческих коррелятов у животных и человека, старческих заболеваний.



УДК 577.15+577.3+591.39

К РЕГУЛЯЦИИ ИЗОЦИТРАТДЕГИДРОГЕНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ В ТКАНИ МОЗГА КУР В ХОДЕ ОНТОГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗВИТИЯ

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

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

В обзорах последних лет, посвященных регуляции цикла трикарбоновых кислот, особое внимание уделено механизмам, контролирующим скорость начальных реакций цикла в тканях млекопитающих [1, 2]. В мозговой ткани NAD-зависимая изоцитратдегидрогеназа (NAD-ИЦДГ) включена в функциональный ансамбль, обеспечивающий сопряженное течение лимитирующих этапов цикла; у растущих животных отмечено заметное участие в нем и NADP-зависимой изоцитратдегидрогеназы (NADP-ИЦДГ) [2]. Возрастная эволюция характера окисления изоцитрата различными дегидрогеназами свидетельствует об адаптационных сдвигах в регулирующих системах, ответственных за метаболизм изоцитрата в мозгу млекопитающих. Регуляторные воздействия на активность ИЦДГ большинство авторов связывает с конформационной перестройкой: изменением различных функциональных групп в молекуле фермента [3], сдвигами в его агрегатном состоянии [4]. В предыдущей работе прослежены пути преимущественного окисления изоцитрата NAD- и NADP-ИЦДГ в мозгу кур в онтогенезе [5]. В настоящем сообщении излагаются результаты исследований влияния предшественника и продукта распада изоцитрата (цитрата и α -кетоглутарата) на активность NAD- и NADP-ИЦДГ в ходе дифференциации ткани мозга кур.

Опыты проводили на цитоплазме и митохондриях мозга 20-дневных эмбрионов, 3-дневных цыплят (ранний постэмбриональный период) и зрелых кур. Субклеточные фракции мозга получали описанным ранее методом; активность ИЦДГ определяли спектрофотометрически [5]. В каждой серии опытов предварительно определяли скорость реакции, катализируемой соответствующей ИЦДГ, в присутствии различных концентраций субстратов, после чего использовали концентрации, добавление которых вызывало максимальный и достоверный эффект. О действии использованного эффектора судили по изменению ферментативной активности, выражаемому в процентах относительно контроля.

Изучение влияния цитрата на активность митохондриальной NAD-ИЦДГ, цитоплазматической и митохондриальной NADP-ИЦДГ мозга кур в процессе онтогенетического развития показало, что он вызывает повышение активности обеих ИЦДГ (рис. 1). При этом его активирующее действие на NADP-ИЦДГ в обеих фракциях мозга проявляется уже при концентрации 0,5 мМ, в то время как примерно такое же активирование NAD-ИЦДГ наблюдается при гораздо более высокой (20 мМ) концентрации. Эффект цитрата несколько более выражен на ранних стадиях онтогенеза.

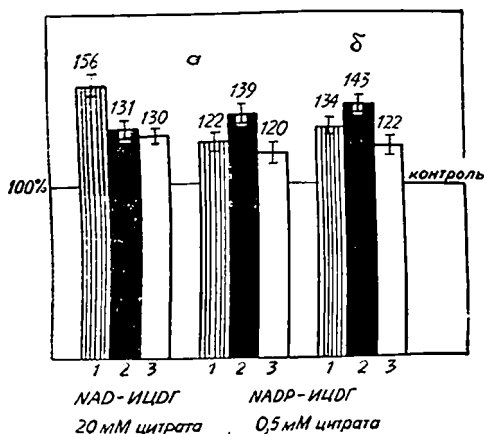


Рис. 1. Влияние цитрата на активность NAD- и NADP-зависимых изоцитратдегидрогеназ в митохондриальной (а) и цитоплазматической (б) фракциях мозга кур в онтогенезе. 1—эмбрионы, 2—цыплята, 3—куры

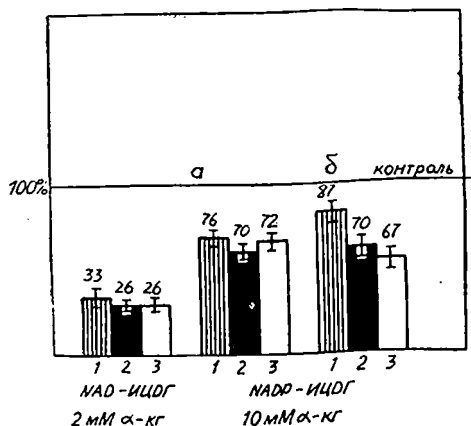


Рис. 2. Влияние α-кетоглутарата на активность NAD- и NADP-зависимых изоцитратдегидрогеназ в митохондриальной (а) и цитоплазматической (б) фракциях мозга кур в онтогенезе. Обозначения те же, что на рис. 1

Далее была исследована скорость окисления изоцитрата по NAD—или NADP-зависимому пути в связи с уровнем содержания α-кетоглутарата в среде и стадией развития кур. Полученные данные показали (рис. 2), что добавление α-кетоглутарата в концентрации

2 мМ вызывает резкое ингибирование NAD-ИЦДГ, не проявляющее существенных онтогенетических сдвигов. В отношении NADP-ИЦДГ подавление активности в пределах 30% наблюдается в онтогенезе в присутствии 10 мМ α -кетоглутарата.

Влияние цитрата на активность NADP-ИЦДГ изучено на дрожжах [6] и цитоплазме мозга крыс [7]; активирование им NAD-ИЦДГ наблюдалось с ферментами бактериального [8], растительного [9] и животного [10] происхождения. При высоком содержании в инкубационной среде Mg^{2+} активирование NAD-ИЦДГ в бычьем [11] и курином мозгу проявляет сходную закономерность. Активация двух форм ИЦДГ разными концентрациями цитрата, возможно, обусловлена значительным различием в K_m для изоцитрата у этих ферментов [12], в частности, тем обстоятельством, что NAD-ИЦДГ функционировует в митохондриях в условиях ненасыщения субстратом [13]. Поэтому в стимулировании NAD-ИЦДГ большими дозами цитрата может играть определенную роль смещение аконитазного равновесия в сторону изоцитрата [14].

В отношении влияния α -кетоглутарата на активность двух ИЦДГ данные, аналогичные с нашими, получены на NADP-ИЦДГ из митохондрий печени и сердца мышей [15], однако NAD-ИЦДГ из растительных и бактериальных источников подавляется очень высоким (выше 20 мМ) концентрациями α -кетоглутарата [4, 16]. Hartman [17] показал, что неметаболизируемый аналог α -кетоглутарата, являющийся специфическим реагентом для α -кетоглутаратсвязывающих участков в молекуле NADP-ИЦДГ, в концентрации 0,1 мМ вызывает резкое ингибирование коммерческого препарата этого фермента. Этот факт свидетельствует о зависимости эффекта ингибирования ИЦДГ α -кетоглутаратом от степени его утилизации. Показано, что скорость окисления изоцитрата в мозгу млекопитающих в значительной степени зависит от утилизации образовавшегося α -кетоглутарата в реакциях трансаминирования с аспаратом при участии D-аспартат- α -кетоглутарат-аминотрансферазы [1, 7]. Неодинаковый по величине эффект α -кетоглутарата на активность двух ИЦДГ мозга кур может быть связан со структурными особенностями ферментов.

Как видно из полученного онтогенеза, низкими концентрациями цитрата, сопоставимыми с его содержанием в тканях в физиологических условиях, может вносить заметный вклад в генерирование NADPH и согласуется с интенсивным биосинтезом белков и липидов в ходе созревания мозга. Высокая скорость синтеза цитрата в мозгу растущих животных [2] создаст реальную основу для осуществления его регуляторного эффекта на активность NADP-ИЦДГ.

REGULATION OF ISOCITRATE DEHYDROGENASE ACTIVITY IN HEN BRAIN DURING DEVELOPMENT

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

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

The effect of citrate and α -oxoglutarate on the activity of NAD- and NADP-dependent isocitrate dehydrogenases was examined in hens brain during ontogenesis. It was shown, that NADP-dependent enzyme is activated by low citrate concentration (0,5 mM), the activation being more pronounced at the end of embryogenesis and at the beginning of postembryogenesis. The low concentration of α -oxoglutarate (2 mM) is inhibitory only for NAD-dependent enzyme, without significant developmental changes.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Williamson J. R., Cooper R. H. FEBS Lett., v. 117, suppl., p. K73—K85, 1980.
2. Ещенко Н. Д. Нейрохимия т. 1, № 2, с. 200—213, 1982.
3. Fan C. C., Lin J. F., Plaut G. W. E. J. Biol. Chem., v. 250, № 6, p. 2022—2027, 1975.
4. LeJohn H. B., McCrea B. E., Suzuki I., Jackson S. J. Biol. Chem., v. 244, № 9, p. 2484—2493, 1969.
5. Арутюнян Л. А., Симонян А. А., Симонян Р. А. Нейрохимия, т. 2, № 4, с. 417—420, 1983.
6. Bernofsky C., Utter M. F. J. Biol. Chem., v. 241, № 22, p. 5461—5466, 1966.
7. Gromeck A., Rafalowska U. J. Neurochem., v. 19, № 11, p. 2687—2695, 1972.
8. Sanwal B. D., Cook R. A. Biochemistry, v. 5, № 3, p. 886—894, 1966.
9. Cox G. F., Davies D. D. Biochem. J., v. 105, № 2, p. 729—734, 1967.
10. Cohen P. F., Colman R. F. Biochemistry, v. 11, № 8, p. 1501—1508, 1972.
11. Willson V. J. C., Tipton K. F. J. Neurochem., v. 34, № 4, p. 793—799, 1980.
12. Plaut G. W. E., Aogaichi T. J. Biol. Chem., v. 243, № 21, p. 5572—5583, 1968.
13. Sies H., Akerboom P. M., Tager J. M. Eur. J. Biochem., v. 247, № 2, p. 209—214, 1972.
14. England P. J., Denton R. M., Randle P. J. Biochem. J., v. 105, № 2, p. 32c—33c, 1967.
15. Fox D. J., Crockett R. V. Biochem. Med., v. 18, № 2, p. 192—205, 1977.
16. Couttate T. P., Dennis D. T. Eur. J. Biochem., v. 7, № 2, 153—158, 1969.
17. Hartman F. C. Biochemistry, v. 20, № 4, p. 894—898, 1981.

Поступила 21. II 1985



УДК 577.7.577.3

ИНТЕНСИВНОСТЬ ОКИСЛЕНИЯ ГЛЮКОЗЫ И ГЛИКОЛИЗА В СИНАПТОСОМАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА БЕЛЫХ КРЫС ПРИ СТАРЕНИИ

АДУНЦ Э. Г., ПАРОНЯН Ж. А., АПРИКЯН Г. В., АХВЕРДЯН Э. С.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Изучение роли различных субстратов в окислительных процессах головного мозга при старении представляет существенный интерес для возрастной нейробиологии. Мозг не в состоянии долго функционировать за счет собственных энергетических ресурсов, запасы глюкозы и других субстратов окисления в нем не велики. Поэтому для нормального функционирования головной мозг постоянно черпает субстраты окисления из крови [1]. При старении количество глюкозы в мозгу уменьшается [2], отмечается также снижение интенсивности окисления глюкозы [3] и гликолитической активности [4]. Имеющиеся исследования проведены в основном на гомогенатах и срезах головного мозга. Изучение окисления глюкозы и гликолиза в синаптосомах головного мозга при старении не явилось предметом систематических исследований. В наших прежних исследованиях было показано, что захват медиаторных аминокислот в синаптической фракции головного мозга при старении значительно снижается [5]. Для выяснения причины указанного явления представляло интерес изучение состояния окисления глюкозы и гликолиза в синаптосомах головного мозга при старении, так как захват нейромедиаторов является энергетически зависимым процессом.

Работа была проведена на белых крысах линии Wistar двух возрастных групп: молодых (5—6 месяцев) и старых (24 месяца). Синаптосомы головного мозга выделяли по методу Natus [6]. Интенсивность окисления глюкозы определяли в K^+ -фосфатном буфере манометрическим методом Варбурга. Образование $^{14}CO_2$ из U- ^{14}C -глюкозы определяли по методу Barker, Summerson [7], белок по Lowry и соавт. [8]. Использовали радиоактивную глюкозу (U- ^{14}C -глюкоза 180 $\mu Ci/mмоль$) фирмы «Amersham» (Великобритания), немеченую глюкозу фирмы «Sigma» (США).

Как видно из данных, приведенных в табл. 1, эндогенное дыхание синапсомной фракции при старении снижается на 16,4%. При добавлении глюкозы к инкубационной среде поглощение кислорода заметно стимулируется. У старых животных по сравнению с молодыми глюкоза приводит к сравнительно меньшему стимулированию поглощения кислорода (20,7 мкмоль поглощенного кислорода у старых животных и 29,12—у молодых). Интенсивность окисления глюкозы в синапсомной фракции определяли и по образованию $^{14}\text{CO}_2$ из U- ^{14}C -глюкозы. Установлено, что у половозрелых животных количество образовавшегося $^{14}\text{CO}_2$ при 37° составляет 37953 распада в мин., тогда как у старых—всего 22380 (табл. 1). Таким образом, интенсивность этого процесса снижается на 41,2%.

Таблица 1

Интенсивность окисления глюкозы в синапсомной фракции головного мозга белых крыс при старении

Условия опыта	Контроль		Глюкоза	
	Молодые	Старые	Молодые	Старые
Поглощение O_2^*	36,77±1,21 (12)	30,75±0,86 (11) *** $p < 0,01$	65,89±1,37 (13)	51,45±1,93 (15) $p < 0,01$
Образование $^{14}\text{CO}_2^{**}$	—	—	37953±3517 (10)	22380±2300 (10) $p < 0,05$

Примечание. * поглощение O_2 в мкмоль $\text{O}_2/100$ мг белка/30 мин, ** образование $^{14}\text{CO}_2$ -распада мин/100γ белка/20 мин, *** p по сравнению с молодым возрастом

Для более целостного представления об эффективности глюкозы как субстрата окисления при старении мы изучили и гликолиз. Проведенные исследования показали (табл. 2), что количество молочной кислоты в синапсомной фракции в старости достоверно снижается. Количество молочной кислоты, образовавшейся в присутствии глюкозы и АТФ у молодых животных составляет 172 мкмоль, а у старых—138 мкмоль ($p < 0,01$). Снижение интенсивности гликолиза составляет 39%. Примечательно, что в растворимой фракции не удалось обнаружить существенных возрастных сдвигов.

Полученные результаты указывают на то, что энергообеспечение синапсомной фракции головного мозга белых крыс за счет глюкозы при старении значительно снижается. Можно полагать, что это обстоятельство является одной из причин снижения интенсивности захвата митохондриальных аминокислот в старости. Представляет существенный интерес выяснение степени окисления других субстратов в различных препаратах головного мозга и, в частности в синапсомной фракции в старости.

Установлено, что окисление глутаминовой кислоты в гомогенатах и грубой митохондриальной фракции головного мозга старых животных выражено снижается, в очищенной митохондриальной фракции стимулируется, а в синапсомной—существенно не изменяется [9]. В указанном возрасте α -кетоглутаровая кислота в очищенной митохондриальной фракции окисляется менее эффективно, а в синапсомной фракции отмечается обратная картина. Янтарная кислота окисляется либо в одинаковой степени, как у молодых, так и у старых животных (очищенная митохондриальная и синапсомная фракции), либо более активно у старых животных (неочищенная митохондриальная фракция). Между тем эффективность янтарной кислоты в качестве субстрата окисления при старении снижается в гомогенатах коры и ствола мозга (неопубликованные данные).

Таблица 2

Образование молочной кислоты (мкмоль/100 мг белка/40 мин) в синапсомной фракции коры мозга крыс при старении

Возраст животных	До инкубации	После инкубации	
		контроль	глюкоза+АТФ
Молодые	92,0 $\pm$ 4,0 (10)	77,0 $\pm$ 4,0 (10)	172,0 $\pm$ 11,0 (10)
Старые	77,5 $\pm$ 3,8 (10) $p < 0,01$	80,0 $\pm$ 3,7 (12) $p > 0,5$	138,0 $\pm$ 2,5 (13) $p < 0,01$

Приведенные данные о степени окисления различных субстратов при старении позволяют допустить, что в указанном возрасте появляются ингибиторы изученных процессов, которые по мере фракционирования мозговой ткани удаляются, вследствие чего в очищенных фракциях не удается выявить возрастных сдвигов. Исключение составляет глюкоза. Снижение интенсивности окисления и гликолитического превращения глюкозы в старости частично можно объяснить ухудшением ее проницаемости [10], уменьшенном количестве синапсом, их качественными изменениями, сводящимися к снижению плотности синаптической поверхности, величины зон контактов и увеличению размеров синапсом [11].

INTENSIVITY OF GLUCOSE OXIDATION AND GLYCOLYSIS RATE IN RAT BRAIN SYNAPTOSOMES ON AGING

ADUNTZ E. G., PARONYAN ZH. A., APRIKYAN G. V., AKHVERDYAN E. S.

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

Rate of glucose oxidation is diminished in rat brain synaptosomes on aging (judged by utilization of oxygen and $^{14}\text{CO}_2$ formation from a

labelled precursor). Similar tendency is detected for glycolytic conversion of glucose.

Since oxidation of glutamic, α -ketoglutaric and succinic acid in synaptosomes does not change on aging, a conclusion is drawn that on aging the role of glucose as energy supplier drops drastically.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Gibbs E. L., Lennox W. G., Nins L. F., Gibbs F. A.* J. Biol. Chem., v. 144, p. 325—332, 1942.
2. *Богацкая Л. Н., Потапенко Р. Н.*—В сб.: Геронтология и гериатрия, с. 148—153, Киев, 1975.
3. *Patel M. S. J.* Gerontol., v. 32, № 6, p. 643—646, 1977.
4. *Потапенко Р. Н.* IX Международный конгресс геронтологов, Киев, т. 3, с. 375, 1972.
5. *Априкян Г. В., Шагинян В. А., Мкртчян Г. А., Паронян Ж. А., Кнарян В. А., Ахвердян Э. С.* Физиол. журн., т. 30, № 1, с. 69—73, 1984.
6. *Hajos F.* Brain Res., v. 93, № 3, p. 485—489, 1975.
7. *Barker J. B., Summerson W. H.* J. Biol. Chem., v. 138, № 2, p. 535—554, 1941.
8. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* J. Biol. Chem., v. 193, № 1, p. 265—275, 1951.
9. *Адуцц Э. Г., Паронян Ж. А., Априкян Г. В.* Биол. журн. Армении, т. 32, № 2, с. 110—114, 1979.
10. *Le Poncin-Laffitte M., Rapin J. R.* Gerontology, v. 26, p. 265—269, 1980.
11. *Klein A. W.* Mech. age develop., v. 21, № 3—4, p. 245—255, 1983.

Поступила 7. V 1985



ОБЗОРЫ

УДК 612.821.1/3—06:616.822.1.014.46:612.452.019

МЕХАНИЗМЫ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ
6-ОКСИДОФАМИНА НА КАТЕХОЛАМИНЕРГИЧЕСКИЕ
СТРУКТУРЫ МОЗГА

ГРОМОВА Е. А., СЕМЕНОВА Т. П., ГРИЩЕНКО Н. И.

Институт биологической физики АН СССР, Пушкино

В обзоре приводится материал, позволяющий разграничить эффекты острой и хронической депривации активности катехоламинов (КА)-ергических систем головного мозга, обусловленных разными способами введения 6-оксидофамина (6-ОДА). Рассмотрены механизмы его специфического токсического действия на центральные нейроны. На основании приведенных данных сделан вывод в пользу существующего представления о целесообразности использования 6-ОДА в качестве «инструмента» при изучении функций КА систем мозга.

В последние годы резко повысился интерес исследователей к функциям КА-ергических систем головного мозга, при изучении которых широко используется нейротоксин—6-ОДА, вызывающий селективную дегенерацию КА структур. В этой связи важно более детальное рассмотрение механизмов действия 6-ОДА на КА-ергические структуры мозга. Целью обзора является обобщение имеющихся в литературе данных по этому вопросу, позволяющих разграничить эффекты острой и хронической депривации активности КА-ергических систем, обусловленной разными способами введения этого нейротоксина.

Впервые 6-ОДА был обнаружен и выделен [1] из гомогенизированных тканей при изучении ферментативного превращения дофамина (ДА) в норадrenalин (НА). Показано, что он является одним из естественных метаболитов ДА [2]. Системное введение 6-ОДА животным приводило к резкому и длительному снижению содержания НА в периферических органах и тканях [3], обусловленному дегенерацией симпатических нервов и их терминалей [4—6]. Установлено, что сам 6-ОДА, являясь близким аналогом ДА, захватывается КА-ергическими терминалями с помощью тех же мембранных механизмов («мембранного насоса»), что и КА, затем транспортируется по аксонам в тела нейронов, где он замещает НА в запасных гранулах, выступая в роли ложного медиатора [7].

Изменений уровня НА в мозгу взрослых животных при системном

427

введении 6-ОДА не было отмечено [2, 8]. Лишь у котят было обнаружено некоторое снижение количества НА в гипоталамусе, что в совокупности указывает на непроницаемость этого вещества через ГЭБ. Эти наблюдения послужили стимулом для исследований центральных эффектов 6-ОДА при внутрижелудочковом (в/ж) или внутримозговом его введении. Результаты таких исследований показали, что 6-ОДА вызывает в мозгу избирательную дегенерацию КА-ергических нейронов, не оказывая существенного влияния на серотонинергические нейроны [9—11]. Дальнейшие исследования были направлены на изучение эффектов и механизмов центрального действия 6-ОДА, что привело к обоснованию возможности получения острой и хронической депривации активности КА-ергических структур мозга с его помощью.

Острая депривация активности КА-ергических систем головного мозга, обусловленная непосредственным введением 6-ОДА в мозг и его желудочки. Первоначальные исследования центрального действия 6-ОДА были проведены преимущественно с его в/ж введением. Результаты этих работ свидетельствуют о значительном снижении содержания НА и ДА в различных структурах мозга под влиянием 6-ОДА, степень которого находится в зависимости от вводимой дозы вещества и времени, прошедшего с момента введения. При этом отмечена более высокая чувствительность к нейротоксину НА-ергических нейронов по сравнению с ДА-ергическими. Так, в/ж введение 5 или 5 мкг 6-ОДА снижало уровень содержания НА в целом мозгу соответственно на 30 и 50%, в то время как содержание ДА оставалось неизменным [10, 11]. Большие дозы 6-ОДА снижали количество обоих аминов, однако уменьшение содержания НА наступало быстрее, чем ДА [12, 13], и только при очень высоких дозах 6-ОДА (500 мкг), граничащих с летальными, снижение содержания обоих аминов мозга выравнивалось, достигая 80%.

Благодаря разной чувствительности ДА и НА нейронов к действию 6-ОДА оказалось возможным получать длительное снижение содержания НА в мозгу крыс без заметного снижения содержания ДА путем 3—4-кратных инъекций нейротоксина в дозе 25 мкг с интервалом в 48 ч [14].

Более детальный анализ региональных изменений содержания КА под влиянием в/ж введений 6-ОДА выявил различную чувствительность структур мозга к его действию: введение препарата в дозах 40—200 мкг сопровождалось снижением НА в неокортексе (на 40—95%) и гипоталамусе (на 50%), в то время как в таламусе уровень НА оставался без изменений. Лишь под влиянием больших доз 6-ОДА (500 мкг, двукратно) было отмечено резкое (на 80%) и длительное (до 142 дней) снижение количества НА во всех указанных структурах [11, 15, 16]. При этом была подтверждена специфичность действия 6-ОДА на КА-ергические нейроны: содержание серотонина и ГАМК в мозгу крыс, получавших этот препарат, оставалось без изменений. Теми же авторами было обнаружено, что наряду со снижением уровня НА и ДА под влиянием 6-ОДА происходило также снижение активно-

сти ферментов, участвующих в их синтезе—тирозингидроксилазы (ТГ) и ДОФА-декарбоксилазы. Одновременно с этим наблюдали нарушение механизма захвата КА-ергических терминалями, свидетельствующее о дегенеративных процессах в последних.

В связи с различием эффектов в/ж введения 6-ОДА на содержание НА и ДА в отдельных структурах мозга возникло предположение, что причиной этого является их топографическое расположение по отношению к желудочкам мозга, что получило подтверждение при гистохимических исследованиях, обнаруживших стадийность эффектов в/ж введения 6-ОДА. Первая стадия характеризовалась снижением НА и ДА в областях, прилежащих к стенкам желудочков (богатых преимущественно НА терминалями), а также дегенеративными изменениями аксонов и некоторых прилежащих нейронов. Вторая стадия выражалась снижением количества НА в терминалях отдаленных областей, включая неокортекс, являющимся, по-видимому, результатом антерогранной дегенерации первично пораженных нейронов [17].

В основе различной восприимчивости мозговых структур к действию 6-ОДА может лежать также неодинаковая чувствительность терминалей, аксонов и клеточных тел КА-ергических нейронов к депривирующему влиянию этого препарата. Метод флуоресцентной микроскопии позволил выявить уменьшение численности и интенсивности свечения флуоресцирующих терминалей в мозгу на фоне введения крысам 6-ОДА при неизменности уровня свечения нейронов [18]. О том же свидетельствуют данные о более высоком поглощении меченых КА синапсами, полученными из переднего мозга по сравнению с синапсами моста у крыс, получавших 6-ОДА [16]. Эти факты подтверждают представление о том, что в структурах, содержащих тела нейронов и их аксоны, изменения под влиянием 6-ОДА выражены слабее, чем в областях, содержащих терминали. Однако перикарионы КА-ергических нейронов не являются полностью нечувствительными к действию 6-ОДА, на что указывает их деструкция, имеющая место при внутриинтестинальном или в/ж введении препарата [12, 19]. Описано даже полное исчезновение клеточных тел синего пятна при в/ж введении больших доз 6-ОДА [20].

Наряду с в/ж инъекцией 6-ОДА широкое распространение получило непосредственное его введение в различные структуры мозга. Наиболее последовательное развитие этих исследований проведено Ungerstedt [12], составившим подробные стереотаксические схемы моноаминергических систем мозга крыс. Используя флуоресцентный метод Falck-Hillarp, он описал дегенеративные явления в этих системах при локальной инъекции минимальных (4—8 мкг) количеств 6-ОДА в различные группы КА нейронов, их проводящие пути и области терминалей. Одним из ранних показателей дегенеративных явлений, обнаруженных в его исследованиях, являлось быстрое появление вместо зеленой флуоресценции интенсивной желтой, возникавшей в нейронах, подвергавшихся действию 6-ОДА. Введение этого нейротоксина

в проводящие пути вызывало эффект, подобный тому, который имеет место при механической перерезке этих путей—накопление медиатора в проксимальной части аксонов; это позволило использовать 6-ОДА для более полного выявления моноаминергических путей в мозгу. В результате серии проведенных им исследований было установлено, что инъекция минимальных доз 6-ОДА в зону КА-ергических нейронов сопровождалась деструкцией не только самих тел клеток, но соответствующих путей и терминалей. Это способствовало изучению роли отдельных ядер моноаминергических систем в регуляции физиологических функций и поведения животных. В частности, Ungerstedt и соавт. [22] описали и феномен моторной асимметрии у крыс, вызванный односторонней инъекцией 6-ОДА в группу ДА-ергических нейронов черной субстанции. Это выражалось ротационным поведением животных в направлении, соответствующем поврежденной стороне, что было обусловлено снижением содержания ДА в мезостриальной системе мозга. Для количественного измерения интенсивности ротационного поведения был предложен специальный прибор—ротометр, позволяющий судить о степени повреждения соответствующей мезостриальной системы [22]. Детальный анализ времени исчезновения в структурах мозга НА и ДА под влиянием локальных инъекций разных доз 6-ОДА позволил выявить различную чувствительность нейронов к его действию. Наиболее чувствительными оказались мезэнцефалические ДА-ергические нейроны, НА аксоны и терминали, в то время как тела НА нейронов оказались более устойчивыми [21].

Имеются указания на то, что в дополнение к специфической деструкции КА-ергических нейронов, внутримозговая инъекция 6-ОДА может вызывать неспецифические разрушения ткани, окружающей кончик канюли [23—25]. Размеры такого повреждения определяются дозой препарата. Было высказано опасение, что неспецифическое разрушение, вызываемое 6-ОДА, затрудняет объяснение эффектов этого препарата лишь избирательным вмешательством его в активность КА структур мозга [26]. Однако более детальный анализ показал, что в случае применения адекватной дозы 6-ОДА поврежденными оказываются только нейроны КА-ергической системы мозга [23, 25]. Дозы препарата, вызывавшие неспецифическое повреждение ткани, были в 5 раз больше [26].

С помощью специальных приемов оказалось возможным получать избирательное повреждение НА или ДА-ергической нейрональной системы. С одной стороны, используя дробное многократное введение малых доз 6-ОДА, можно вызвать избирательное истощение количества НА мозга при неизменном количестве ДА. С другой стороны, можно получить избирательное снижение содержания ДА путем совместного введения 6-ОДА с ингибиторами МАО [27, 28]. Установлено, что трициклические антидепрессанты, такие как дезипрамин, протриптилин и дезметилимирамин, более избирательно ингибируют поглощение катехоламинов в НА-ергических нейронах, чем в ДА-ергических [29, 30].

Поэтому на фоне предварительного их введения происходит преимущественное снижение количества ДА в мозгу, в то время как содержание НА оставалось без изменений [13, 28, 29].

В связи с тем, что внутримозговые инъекции 6-ОДА проводят под наркозом, следует иметь в виду, что некоторые анестезирующие вещества способны ослабить его действие. Показано, что в случае введения 6-ОДА (411 мкг, в/ж) на фоне пентобарбиталовой анестезии количество НА в мозгу понижалось на 25%, в то время как подобная процедура, проводимая на фоне эфирной анестезии, вызывала его 70%-ное снижение [32].

Деструкция КА-содержащих нейронов под влиянием 6-ОДА влечет за собой понижение активности связанных с их функционированием внутриклеточных ферментов. Обнаружено снижение активности тирозингидроксилазы—фермента, участвующего в синтезе КА во всех случаях, когда происходят морфологические изменения КА-ергических нейронов [11, 33, 34]. Показано, что после введения 6-ОДА активность этого фермента в неокортексе, гиппокампе, гипоталамусе и стриатуме понижалась на 70—80%, а в среднем мозгу и мосту—на 50% [11, 33]. На основании результатов этих наблюдений можно сделать вывод, что нейроны ствола мозга менее подвержены действию 6-ОДА, в то время как в других областях они повреждаются примерно в одинаковой степени. Авторы считают, что регенерация аксонов КА-ергических нейронов в мозговом стволе приводит к увеличению уровня активности тирозингидроксилазы и, таким образом, ретроградное накопление фермента, возможно, маскирует сильное повреждение нервных окончаний в этой области. Уровень активности фермента, участвующего в синтезе НА, дофамина- β -гидроксилазы, также снижался в ряде мозговых структур под влиянием 6-ОДА [35]. На фоне введения больших доз препарата (500 мкг, в/ж) наблюдали понижение активности этого фермента во фронтальной коре мозга крысы на 65—70%, в стриатуме и гипоталамусе на 60 и 25% соответственно [11]. Вследствие уменьшения числа КА-содержащих нейронов и падения активности тирозингидроксилазы метаболизм КА в мозгу также был снижен, о чем свидетельствует замедление превращения ^3H -НА на фоне введения 6-ОДА [36, 37]. Выявлено угнетающее влияние 6-ОДА на активность ферментов, вовлеченных в метаболизм КА [38].

Перечисленные наблюдения свидетельствуют о специфическом влиянии 6-ОДА на активность КА-ергических систем мозга, которое сказывается на разных этапах превращений КА. Эта специфичность нашла свое подтверждение также в ряде электронномикроскопических, автордиографических и гистохимических исследований [9, 18, 36, 37, 39]. Доказательства специфичности эффектов 6-ОДА на КА-ергические системы были получены также при биохимическом изучении его влияния на другие нейромедиаторные системы. Определение содержания серотонина в целом мозгу крыс, получавших 6-ОДА в большом диапазоне доз (160—600 мкг) как при системном, так и его в/ж введении

показало, что серотонинергические нейроны слабо реагируют на действие этого препарата. В литературе имеются отдельные сообщения об изменении уровня серотонина в мозгу под влиянием 6-ОДА, в которых отмечено, что эти изменения слабо выражены и являются кратковременными [36]. Региональный анализ содержания серотонина в мозгу позволил обнаружить, что в конечном мозгу [13, 37], коре больших полушарий [37], таламусе и гипоталамусе [40] оно оставалось без изменения, в среднем мозгу регистрировали его незначительное (15%) снижение, а в области моста было отмечено 75%-ное повышение через 7 ч после введения 6-ОДА (250 мкг, в/ж) [40]. Активность триптофангидроксилазы и скорость обмена серотонина не изменяются в мозгу крысы после внутримозговой инъекции 6-ОДА или после системного введения этого препарата новорожденным животным [37]. *In vitro* в культуре ядер шва показано, что 6-ОДА (50 мкг/мл) не влияет на образование 5-оксиндолуксусной кислоты, то есть на метаболизм серотонина [41]. Установлено, что на фоне понижения активности ДОФА-декарбоксилазы, наблюдаемого через 2—15 дней в десяти различных областях мозга, уровень активности 5-окситриптофандекарбоксилазы не снижался [42]. Более того, в мозжечке, гипоталамусе и латеральной области моста было зарегистрировано повышение активности этого фермента. Усиление синтеза серотонина отражает, возможно, образование новых действующих гетеротипических синапсов в местах, лишенных их обычной адренергической иннервации [43].

Имеются отдельные указания на наличие видовых различий действия 6-ОДА на серотонинергические нейроны, в частности, при введении его кошкам. Так, в ряде мозговых структур наряду с понижением количества НА было отмечено и снижение количества серотонина [44]. Дальнейшее исследование этого вопроса может пролить свет на функциональную, интегративную и ассоциативную роль моноаминергических нейронов у различных видов животных.

В литературе имеется небольшое число работ о влиянии 6-ОДА на другие известные и предполагаемые нейромедиаторы в ЦНС, в которых показано, что содержание глутаминовой и аспарагиновой кислот, глицина и других аминокислот, таких как таурин, аланин и серин, оставалось в целом мозгу крысы без изменений после введения животного 6-ОДА (330 мкг, 2 раза, в/ж) [32, 45]. Количество ГАМК и АХ под влиянием 6-ОДА или не менялось совсем [9, 32], или менялось незначительно. Все исследователи отмечают необычно большую продолжительность воздействия 6-ОДА на уровень содержания КА в мозгу, достигающую нескольких месяцев [11, 12, 37, 46, 47].

Таким образом, однократное введение животным 6-ОДА позволяет получить у них избирательное и длительное понижение уровня активности определенных КА систем мозга, что дает возможность использовать этот нейротоксин для анализа роли отдельных КА-ергических структур в регуляции различных форм поведения животных или физиологических систем организма.

Подытоживая результаты приведенных выше исследований, можно следующим образом представить последовательность событий, ведущих в конечном счете к дегенерации КА-ергических структур мозга, обусловленной действием 6-ОДА.

На начальном этапе 6-ОДА, являясь близким аналогом ДА, захватывается КА-ергическими терминалями с помощью специфического для КА-ергического мембранного механизма. Замещая в синаптических пузырьках КА, 6-ОДА транспортируется в тела нейронов, где может аккумулироваться в больших количествах в запасных гранулах, выступая в качестве «ложного медиатора». При небольших дозах 6-ОДА снижение содержания КА в структурах мозга является результатом снижения активности ферментов, участвующих в их синтезе. На этой стадии действия 6-ОДА структурных изменений КА-ергических нейронов не происходит. По достижении критической внутринейрональной концентрации 6-ОДА начинаются деструктивные процессы. На этом этапе первые терминали теряют способность проводить импульсы, однако механизм поглощения ими КА еще сохраняется [48]. На стадии полного разрушения КА-ергических терминалей, обусловленного введением больших доз 6-ОДА, наблюдается не только снижение уровня содержания КА и активности тирозингидроксилазы, но и потеря терминалями способности к захвату КА, что указывает на их дегенерацию [16].

Нарушение механизма захвата КА и снижение ферментативной активности, вызываемые введением 6-ОДА, отличают эффекты действия этого вещества от эффектов резерпина, который снижает лишь уровень содержания КА, не оказывая влияния на нейрональный механизм их захвата и активность ферментов, участвующих в синтезе НА и ДА [49].

Описанная последовательность событий, обусловленных действием 6-ОДА, объясняет механизм снижения количества КА в мозгу, но не проливает свет на механизм разрушения КА-ергических нейронов. Несмотря на изучение этого вопроса рядом исследователей, окончательного ответа на него до настоящего времени не получено. На гомогенатах печени показано, что 6-ОДА является разобщителем окислительного фосфорилирования, подобным и даже более сильным, чем 2,4-динитрофенол [50]. В присутствии такого разобщителя не происходит синтеза АТР, тогда как скорость окисления субстрата и потребления кислорода являются максимальными, что, естественно, может приводить к гибели клеток. Возможно, что и в нейронах 6-ОДА оказывает такое же действие. Имеются также указания на то, что 6-ОДА очень подвержен неферментативному окислению, в результате чего в клетках образуется ряд промежуточных продуктов, которые вовлекаются в процесс клеточной деструкции посредством связывания с нуклеофильными группами нейрональных макромолекул. Среди продуктов окисления 6-ОДА обнаружены о- и п-хиноны [51], вызывающие снижение процесса нейронального захвата КА [52]. Возможно, что одной из

причин, ведущих к клеточной деструкции, является образование в результате самопроизвольного окисления 6-ОДА таких высокореакционноспособных промежуточных продуктов, как супероксид O_2^- , H_2O_2 и гидроксидные радикалы, любой из которых может обуславливать деструкцию нервных терминалей [34, 53]. В этой связи вызывает интерес сравнение эффектов 6-ОДА и его аналога 5-ОДА, который также снижает количество НА в тканях, но не разрушает НА-ергические нейроны. Наряду с этим показано, что 6-ОДА образует H_2O_2 в 12 раз быстрее, чем 5-ОДА [34].

Предположено, что расход кислорода (присутствующего внутри клетки в концентрации до 10^{-3} М) при образовании пероксида водорода из 6-ОДА приводит к гипоксии и отрицательно влияет на целостность клетки [34]. Кроме того, H_2O_2 разрушает нейроны путем взаимодействия с их структурными липидами, мембранными и ферментными SH-группами, белковыми NH_2 -группами и другими структурными соединениями.

Таким образом, можно считать, что 6-ОДА оказывает свое деструктивное влияние на КА-ергические нейроны посредством выделения реакционноспособного кислорода, который присутствует в составе хинонов, пероксида водорода или супероксиданта. Продукты окисления 6-ОДА вступают в ковалентную связь с макромолекулами нейронов, вызывая необратимое их повреждение [52]. Кроме того, высказано предположение, что нейротоксическое действие 6-ОДА обусловлено его способностью вызывать денатурацию белков [54].

Совокупность этих данных проливает свет на механизм токсического действия 6-ОДА на КА-ергические нейроны мозга при внутримозговых его инъекциях, сопровождающихся острой депривацией активности соответствующих нейронных систем.

Хроническая депривация активности катехоламинергических систем мозга, обусловленная постнатальным введением 6-ОДА. Возможность проникновения 6-ОДА из кровяного русла в головной мозг у новорожденных животных до созревания ГЭБ создает условия для получения экспериментальной модели хронической депривации активности КА-ергических систем. При этом, естественно, возникали вопросы о степени и длительности снижения уровня содержания КА мозга у животных, получавших 6-ОДА, а также о зависимости этих сдвигов от сроков, прошедших с момента рождения до получения этого вещества, об оптимальных способах его введения и др. Изучению этих вопросов были посвящены первоначальные исследования с введением 6-ОДА в неонатальном периоде. Показано, что подкожное введение новорожденным крысам 6-ОДА (50—100 мг/кг, 3—4-кратно) вызывало массивные разрушения пара- и превертебральных симпатических ганглиев, сопровождающиеся значительным и длительным (до 6 месяцев и больше) снижением количества НА в различных органах—сердце, селезенке, поджелудочной железе и др. В мозгу также имело место снижение содержания НА, но менее выраженное [55—57].

Постструктурный анализ содержания КА в мозгу животных в разные сроки после введения 6-ОДА показал, что максимальное снижение количества КА было в неокортексе [52, 58, 59], где оно сопровождается также понижением захвата экзогенного ^3H -НА, скорости синтеза КА [60] и активности ферментов, обеспечивающих их синтез [61]. При этом в таламусе, гипоталамусе и стриатуме изменений уровня содержания НА отмечено не было [58, 59, 62]. В то же время в стволовых структурах и мозжечке ряд авторов наблюдал увеличение содержания НА [52, 58, 60, 61], усиление захвата ^3H -НА срезами *in vitro* [60], активности ферментов синтеза КА [61].

При анализе динамики изменений количества НА в онтогенезе обнаружен ряд существенных различий в реакции мозжечка и неокортекса мозга крыс на введение 6-ОДА в неонатальном периоде [61]. Так, на 4-й день жизни у таких животных выявлена интенсивная дегенерация НА-ергических терминалей в обеих структурах, уровень содержания НА и активности дофамин- β -гидроксилазы был уменьшен в них более чем на 80%, активность тирозингидроксилазы — на 50%. К 70-му дню после введения 6-ОДА концентрация НА и активность обоих ферментов в неокортексе оставались сниженными более чем на 90—95%. В отличие от этого в мозжечке на 9-й день содержание НА, величины активности тирозин- и дофамин- β -гидроксилазы восстанавливались до исходных величин, а на 70-й день превышали контрольный уровень на 95,5 и 115% соответственно. Предполагается, что причиной повышения уровня НА и активности ТГ могут служить процессы регенеративного и коллатерального спрутинга, развивающиеся после введения 6-ОДА новорожденным крысам [60], и избирательная регенерация КА структур в определенных областях мозга осуществляется самими нейронами-мишенями [61].

Морфологические исследования мозга животных с введением 6-ОДА в неонатальном периоде, проводившиеся методами гистофлуоресценции, световой и электронной микроскопии, обнаружили разрушения КА-ергических клеток, ретроградную дегенерацию, глиальные реакции, фагоцитоз [63—65]. Методом Falck показано резкое снижение числа варикоз, уменьшение числа флуоресцирующих терминалей и аксонов [66]. На электронограммах выявлено изменение синапсов нео- и палеокортекса [67]. В то же время в стволовых образованиях — первичных чувствительных и ассоциативных ядрах, соматических и висцеральных ядрах черепных нервов, ретикулярной формации и ядрах шва — у взрослых животных, получавших в ранние сроки постнатального онтогенеза 6-ОДА, при гистохимическом анализе отмечен резкий прирост числа волокон с характерной для КА флуоресценцией [68]. Таким образом, данные гистохимического анализа мозга крыс с хронической депривацией активности КА-ергических систем мозга, обусловленной неонатальным введением 6-ОДА новорожденным животным, также указывают на развитие у них процессов регенерации и разрастания нервных отростков в стволовых структурах. Более детально

анализ показал, что эти изменения в области ствола развиваются, начиная с 9-го дня после введения 6-ОДА и сохраняются на протяжении 3—5 месяцев [57, 61, 69]. При этом установлено, что глубина наблюдаемых изменений, как и в случае острой депривации, зависит от вводимой дозы препарата [60]. Изучение регенерации НА-ергической системы в мозжечке в зависимости от срока введения 6-ОДА (1—2-, 3—4-, 6—7-е дни постнатального онтогенеза) позволило обнаружить, что восстановление НА-ергической иннервации является максимальным (145—165% от контроля) у животных, получавших 6-ОДА в первые 2 дня постнатального развития. Введение препарата в более поздние сроки сопровождалось меньшим восстановлением содержания НА и синапсомного захвата ^3H -НА [6].

Описанные выше биохимические и морфологические эффекты 6-ОДА являются наиболее выраженными в дальнейшем онтогенетическом развитии мозга при введении этого токсического агента животным в первые сутки после рождения. Препарат при его введении 7-дневным крысам не оказывал соответствующего действия [57], что, по-видимому, объясняется созреванием к этому сроку ГЭБ [55, 56]. В специальных исследованиях была изучена зависимость эффектов 6-ОДА от степени созревания ГЭБ. С этой целью на срезах животных, получавших подкожно 6-ОДА в разные сроки после рождения, изучали захват ^3H -НА. Препарат вводили на 1—5-, 5—9-, 9—23-и сутки постнатального развития. Было обнаружено, что захват ^3H -НА был наиболее малым, когда 6-ОДА вводили в 1—5-е сутки. У этих животных наблюдали избирательную дегенерацию НА нейронов в ЦНС и падение захвата ^3H -НА на 40—60% в срезах коры больших полушарий гипоталамуса и спинного мозга. По мере созревания ГЭБ происходит ослабление нейротоксического действия 6-ОДА на кору и гипоталамус [56]. Эти наблюдения согласуются с данными о наибольшем снижении содержания НА в неокортексе при введении препарата в первые 5 дней постнатального онтогенеза и незначительном снижении содержания НА (около 15%) при введении 6-ОДА на 11—15-е сутки после рождения. [70]. Гистохимический анализ изменений структуры ДА-ергических нейронов черной субстанции и нигростриатной системы при введении животным 6-ОДА в первые 17 дней постнатального онтогенеза также подтвердил зависимость эффектов препарата от сроков его введения. При этом наиболее выраженное понижение специфической флуоресценции ткани мозга отмечено у крыс, получавших препарат в течение 1-й недели после рождения [66].

Сопоставление эффектов 6-ОДА с разными способами его введения новорожденным животным показало, что внутрибрюшинное и локальное внутримозговое (в область синего пятна) введение этого препарата в первые сутки после рождения приводило к ослаблению НА иннервации в коре и гиппокампе, что находит выражение в понижении концентрации НА в коре на 80—90%, снижении скорости синтеза ^3H -НА из ^3H -тирозина в срезах мозга 40-дневных животных [58, 59].

Однако ДА-ергическая иннервация коры больших полушарий при этом сохранялась, что указывает на большую устойчивость мезокортикальной и нигростриатной ДА-ергических систем мозга к действию 6-ОДА по сравнению с НА-ергическими [58]. В то же время внутрицистернальное введение 6-ОДА вызывало менее специфичный эффект и приводило к понижению в мозгу не только НА, но и ДА [59].

Понижение в структурах переднего мозга количества КА, активности тирозингидроксилазы, захвата экзогенных КА после введения 6-ОДА новорожденным крысам объясняется повреждением КА-ергических терминалей, а возможно, и нейронов [56, 64, 70]. Наряду с этим имеются данные о понижении уровня содержания КА в конечном мозгу, сопровождавшемся повышением их концентрации в стволе после введения малых доз 6-ОДА при неизменности в них уровня активности тирозингидроксилазы. В этой связи высказано предположение, что повреждение КА-ергических терминалей может приводить к ослаблению тормозной обратной связи на уровне клеточных тел, управляющей скоростью синтеза и компенсаторным увеличением синтеза НА в области, содержащей клеточные тела [69].

Раннее пренатальное формирование НА-ергических проекций к структурам переднего мозга указывает на наличие трофической функции со стороны этих нейронов на кору больших полушарий в процессе ее развития [71]. Выключение НА-ергической иннервации в неонатальном периоде, обусловленное введением крысам 6-ОДА и анализ морфологических особенностей развития мозговых структур в постнатальном периоде экспериментально подтверждают это предположение. У взрослых животных с депривацией КА-ергической активности, наряду с понижением содержания в коре НА на 98%, было отмечено уменьшение числа, длины и ветвистости базолатеральных дендритов пирамидных клеток, потеря дендритных шипиков в передней и задней лобной, передней теменной и задней теменно-затылочной и опоясывающей извилинах коры больших полушарий. Описано ослабление ветвления апикальных дендритов [63, 72]. Однако при введении меньших доз 6-ОДА в коре не были отмечены изменения в цитоархитектонике и дендритной плотности. На фоне избирательного разрушения НА-ергической системы, подтвержденного биохимически, у 15-дневных крыс, получавших в первые сутки постнатального онтогенеза 6-ОДА (100 мкг, в/ц), обнаружено уменьшение на 84% плотности клеток во 2- и 3-м слоях височной коры при неизменности общей толщины неокортекса [73]. Последнее обстоятельство указывает на то, что введение 6-ОДА новорожденным крысам сопровождалось не только деструктивными явлениями, но способствует также и каким-то процессам роста. Об этом свидетельствуют результаты исследований, обнаруживших повышение плотности синапсов в зрительной коре крыс с депривацией активности КА систем [74].

Совокупность приведенных данных позволяет заключить, что введение 6-ОДА в раннем постнатальном периоде вызывает у животных

хроническую депривацию активности КА-ергических систем. Такие животные отличаются некоторыми особенностями исследовательского поведения [75—78], несмотря на то, что общая суточная периодика их активности остается без изменений [62]. Имеются наблюдения, свидетельствующие о своеобразном характере их реакций на сенсорные раздражители [79, 80] и даже на некоторые фармакологические воздействия [81, 82]. Эти наблюдения в сочетании с приведенными выше данными о морфологических и биохимических изменениях в головном мозгу под влиянием введения 6-ОДА в неонатальном периоде позволяют рассматривать вызываемую им хроническую депривацию активности КА-ергических систем мозга в качестве экспериментальной модели врожденных форм патологических состояний, связанных с недоразвитием этих систем в эмбриогенезе. Данная экспериментальная модель может служить для изучения возможности компенсации возникающих при этом нарушений поведения. В частности, она успешно используется в опытах с трансплантацией ткани мозга [83].

Приведенные в обзоре материалы свидетельствуют о том, что нейротоксин 6-ОДА является своего рода «инструментом» для изучения функций КА-ергических систем мозга. Однако для правильной оценки полученных при этом результатов необходимо учитывать зависимость эффектов 6-ОДА от разных способов его применения.

MECHANISMS OF TOXIC EFFECT OF 6-HYDROXYDOPAMINE ON CATECHOLAMINERGIC BRAIN STRUCTURES

GROMOVA E. A., SEMENOVA T. P., GRISHCHENKO N. Y.,

Institute of Biological Physics, USSR Academy of Sciences, Poustchino

The results of investigation of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) effects on catecholaminergic (CA) brain structures are discussed. Evidence of different implication of chronic and acute deprivation of brain CA system activity due to various methods of 6-OHDA application are pointed. The mechanisms of its specific toxic action on central CA neurons are discussed. Results of these investigations indicate that 6-OHDA may be used as a specific tool for analysis of function of brain CA systems.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Senoh S., Creveling C. R., Udenfriend S., Witkop B. J. Amer. Chem. Soc., v. 81, p. 6236—6240, 1959.
2. Мецлер Д. Биохимия, т. 3, М., Мир, с. 336, 1980.
3. Porter C. C., Totaro J. A., Stone C. A. J. Pharmacol. Exp. Ther., v. 140, p. 308—316, 1963.
4. Tranzer J. P., Thoenen H. Experientia, v. 24, p. 155—156, 1968.
5. Malmfors T., Sachs Ch. Eur. J. Pharmacol., v. 3, p. 89—92, 1968.
6. Jonsson G.—In: 6-Hydroxydopamine and catecholamine neurons (eds. T. Malmfors, H. Thoenen), p. 243—256, North-Holland Publishing Company—Amsterdam—London, 1971.

7. Tranzer J. P., Richards J. G.—In: 6-Hydroxydopamine and catecholamine neurons (eds. T. Malmfors, H. Thoenen), p. 15—32, 1971.
8. Lavery R., Sharman D. E., Vogt M. Brit. J. Pharmacol., v. 24, p. 549—560, 1965.
9. Ungerstedt U. Eur. J. Pharmacol., v. 5, p. 107—110, 1968.
10. Uretsky N. J., Iversen L. L. Nature, v. 221, p. 557—559, 1969.
11. Uretsky N. J., Iversen L. L. J. Neurochem., v. 17, p. 269—278, 1970.
12. Descarries L., Beaudet, De Champlain J.—In: Chemical Tools in Catecholamine Research. (ed. Jonsson G.), v. 1, p. 101—106, North-Holland. Publ. Comp. Amsterdam—London, 1975.
13. Garattini S., Jori A., Manara L., Samanin R.—In: Chemical Tools in Catecholamine Research, (ed. Jonsson G.), v. 1, p. 303—309, North-Holland Publ. Comp. Amsterdam—London, 1975.
14. Breese G. R., Traylor T. J. Pharmacol. Exp. Ther., v. 174, p. 413—420, 1970.
15. Lavery R., Taylor K. M. Brit. J. Pharmacol., v. 40, p. 836—846, 1970.
16. Iversen L. L., Uretsky N. J.—In: 6-Hydroxydopamine and catecholamine neurons. (eds. T. Malmfors, H. Thoenen), p. 171—186, North-Holland Publ. Comp. Amsterdam—London, 1971.
17. Ungerstedt U.—In: 6-Hydroxydopamine and catecholamine neurons (eds. T. Malmfors, H. Thoenen), p. 101—127, North-Holland Publ. Comp. Amsterdam—London, 1971.
18. Marasco E., Cornwell-Jones C., Sobrian S. K. Pharmacol. Biochem. and Behav., v. 10, № 3, p. 319—323, 1979.
19. Hedreen J. Brain Res., v. 157, № 1, p. 129—135, 1978.
20. Descarries L., Saucier G. D. Brain Res., v. 37, p. 310—316, 1972.
21. Ungerstedt U.—In: 6-Hydroxydopamine and catecholamine neurons (eds. T. Malmfors, H. Thoenen), p. 315—332, North-Holland Publ. Comp. Amsterdam—London, 1971.
22. Ungerstedt U., Arbuthnott G. W. Brain Res., v. 21, p. 485—493, 1970.
23. Hökfelt T., Ungerstedt U. Brain Res., v. 60, p. 269—297, 1973.
24. Javoy F., Sotelo C., Herbert A., Agid Y. Brain Res., v. 102, № 2, p. 201—215, 1976.
25. Sievers J., Klemm H. P., Jenner S., Baumgarten H. G., Berry M. J. Neurochem., v. 34, № 4, p. 765—771, 1980.
26. Poirier L. J., Langeller P., Roberge A., Boucher R., Kitsikis A. J. Neurol. Sci., v. 16, № 4, p. 401—416, 1972.
27. Stricker E. M., Sigmond M. J. J. Comp. and Physiol. Psychol., v. 86, № 6, p. 973—994, 1974.
28. Sigmond M. J., Stricker E. M.—In: Chemical Tools in Catecholamine Research (ed. Jonsson G.), v. 1, p. 319—326, North-Holland Publ. Comp. Amsterdam—London, 1975.
29. Evetts K. D., Iversen L. L. J. Pharm. Pharmacol., v. 22, p. 540—543, 1970.
30. Fuxe K., Ungerstedt U. Eur. J. Pharmacol., v. 4, p. 135—144, 1968.
31. Sigmond M. J., Stricker E. M. Experientia, v. 36, № 4, p. 436—438, 1980.
32. Jacks B. R., De Champlain J., Cordeau J. Eur. J. Pharmacol., v. 18, p. 353—360, 1972.
33. Hattori T., McGeer P. L., Singh V. K., McGeer E. G., Fibiger H. C.—In: Chemical Tools in Catecholamine Research (ed. Jonsson G.), North-Holland Publ. Comp. Amsterdam—London, v. 1, p. 141—148, 1975.
34. Heikkilä R., Cohen G. Experientia, v. 28, p. 1197—1198, 1972.
35. Uprichard D. C., Reisine T. D., Mason S. T., Fibiger H. C., Yamamura H. I. Brain Res., v. 181, № 1, p. 143—154, 1980.
36. Bartholini G., Richards J. G., Pletscher A. Experientia, v. 26, p. 142—144, 1970.
37. Bloom F. E., Algeri S., Gropetti A., Revuelta A., Costa E. Science, v. 166, p. 1284—1286, 1969.

38. Scatton B. *Life Sci.*, v. 31, p. 495--504, 1932.
39. Ljungdahl A., Hofelt T., Jonsson G., Sachs Ch. *Experientia*, v. 27, p. 297--299, 1971.
40. Herman Z. S., Brus R., Drybanski A., Szkilnik R., Stominska-Zurek J. *Psychopharmacology*, v. 50, № 1, p. 73--80, 1976.
41. Halgren E., Varon S. *Brain Res.*, v. 48, p. 438--442, 1972.
42. Sims K. L., Bloom F. E. *Brain Res.*, v. 49, p. 165--175, 1973.
43. Blondaux C., Juge A., Sordet F., Chauvet G., Jouvet M., Pujol J.-F. *Brain Res.*, v. 50, № 1, p. 101--114, 1973.
44. Pettitjean F., Laguzzi R., Sordet F., Jouvet M., Pujol J.-F. *Brain Res.*, v. 48 (complete), p. 281--293, 1972.
45. Nicklas W. J., Bert S. *Brain Res.*, v. 61, p. 343--356, 1973.
46. Hartman B. K., Blehm D. J.—In: *Chemical Tools in Catecholamine Research*, v. 1, p. 125--132, 1975.
47. Moore K. E., Goodale D. B.—In: *Chemical Tools in Catecholamine Research* (ed. Jonsson G.), v. 1, p. 343--347, North-Holland Publ. Comp., Amsterdam—London, 1975.
48. Frausler G. J. *Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 178, p. 49--62, 1971.
49. Glowinski J., Axelrod J. *J. Neurochem.*, v. 12, p. 25--30, 1965.
50. Wagner K.—In: *6-Hydroxydopamine and Catecholamine neurons*, p. 277--278, North-Holland Publ. Comp., Amsterdam—London, 1971.
51. Heikkila R., Mytilineou C., Coté L., Cohen G. J. *Neurochem.*, v. 20, p. 1345--1350, 1973.
52. Jonsson G., Sachs Ch.—In: *Chemical Tools in Catecholamine Research* (ed. Jonsson G.), v. 1, p. 41--50, North-Holland Publ. Comp., Amsterdam—London, 1975.
53. Barchardt R. T., Burgess S. K., Reid J. R., Liang Y.-O., Adams R. N. *Mol. Pharmacol.*, v. 13, № 5, p. 805--818, 1977.
54. Rotman A., Daly J. W., Creveling C. R. *Mol. Pharmacol.*, v. 12, № 6, p. 887--899, 1976.
55. Angelelli P. U. *Neuropharmacology*, v. 10, p. 55--59, 1971.
56. Sachs C., Jonsson G. *Acta Physiol. scand.*, v. 89, Suppl., 396, 53, 1973.
57. Singh B., De Champlain J. *Brain Res.*, v. 48, p. 432--437, 1972.
58. Tassin J. P., Velly L., Stinus L., Blanc G., Glowinski J., Thierry A. M. *Brain Res.*, v. 83, № 1, p. 93--106, 1975.
59. Thierry A. M., Velly L., Stinus L., Tassin J. P., Blanc G., Glowinski J.—In: *Chemical Tools in Catecholamine Research* (ed. Jonsson G.), v. 1, p. 205--210, North-Holland Publ. Comp., Amsterdam—London, 1975.
60. Sachs Ch., Pappas G. *Brain Res.*, v. 99, № 2, p. 277--291, 1975.
61. Schmidt R. H., Bhatnagar R. K. *Brain Res.*, v. 166, № 2, p. 293--308, 1979.
62. Nyakas C., Van Delft A. M. L. *Pharmacol. Biochem. and Behav.*, v. 3, p. 271--277, 1975.
63. Jonsson G., Hallman H., Felten D. L. *Neurosci. Lett.*, v. 13, Suppl. 3, 366, 1979.
64. Konkol R., Eendeich E., Breese G. *Brain Res.*, v. 10, № 1, p. 125--135, 1978.
65. Sievers J., Lovola I. *Acta Anat.*, v. 99, № 3, p. 353, 1977.
66. Matsuura T., Nofyo Y., Inoue T., Iwata Y., Sano Y. *Acta histochem. and cytochem.*, v. 7, № 4, p. 342--352, 1974.
67. Оттелин В. А., Кучеренко Р. П., Федосихина Л. А., Семенов С. П. И Рабочее совещание «Ультраструктурные исследования пластичности нейрона», с. 7, Пушкино, 1982.
68. Levitt P., Moore R. Y. *Anat. and Embriol.*, v. 158, № 2, p. 133--150, 1980.
69. Peters D. A. V., Pappas B. A., Tarb H., Saari M. *Biochem. Pharmacol.*, v. 26, p. 2211--2215, 1977.
70. Kostrzewa R. M., Garey R. E. *Brain Res.*, v. 124, № 2, p. 258--391, 1977.
71. Caviness V. S., Korde M. G. *Brain Res.*, v. 209, № 1, p. 1--9, 1981.

72. Hwang B. H., Hoovler D. W. Develop. Brain Res., v. 5, № 1, p. 104—107, 1982.
73. Onténiente B., König N., Sievers J., Jenner S., Klemm H. P., Marty R. Anat. and Embryol., v. 159, № 3, p. 245—255, 1980.
74. Parnavelas J. G., Blue Mary E. Develop. Brain Res., v. 3, № 1, p. 140—144, 1982.
75. Семенова Т. П. XIV съезд Всесоюзн. физиол. общества им. И. П. Павлова, тезисы научн. сообщ., т. 2, с. 93—94, Л., Наука, 1983.
76. Громова Е. А., Семенова Т. П., Грищенко Н. И. Журн. высш. нерв. деят-сти, т. 35, в. 6, с. 1133—1141, 1985.
77. Семенова Т. П., Третьяк Т. М., Грищенко Н. И., Смирнова Г. И. Журн. ВНД, т. 33, № 1, с. 163—165, 1983.
78. Fucuda T., Yamada K., Suenaga N., Takishita S. Arch. Int. Pharmacodyn. et Theor., v. 230, № 1, p. 100—111, 1977.
79. Mason S. T., Iversen S. D. Nature, v. 248, № 5450, p. 697—698, 1974.
80. Oke A. F., Adams R. N. Pharm., Biochem. and Behav., v. 9, № 4, p. 429—432, 1978.
81. Сташневская А. В., Барсегян Г. Г. Фармакология и токсикология, т. 43, № 5, с. 543—546, 1980.
82. Shaywitz B. A., Klopfer J. H., Yager R. D., Gordon I. W. Nature, v. 261, № 5556, p. 153—155, 1976.
83. Брагин А. Г., Виноградова О. С., Громова Е. А., Грищенко Н. И., Иваницкий Г. Р., Куликов А. В., Семенова Т. П., Смирнова Г. И., Третьяк Т. М. Докл. АН СССР, т. 277, № 5, с. 999—1002, 1984.

Поступила 27. II 1985

НОВЫЕ КНИГИ

Opioids. Past, Present and Future (ed. by I. Hegers, H. O. I. Collier, M. I. Rance and M. B. Tyers), Taylor & Francis, London—Philadelphia, 1984.

В сборнике представлены материалы симпозиума, посвященного 80-летию со дня рождения Ганса Костерлинта (Churchill College, Cambridge, April 1983). Основное внимание уделяется анатомическим, физиологическим и химическим перспективам изучения опиоидных пептидов, их функции и биологического значения. Рассматриваются также вопросы, связанные с исследованием агонистов и антагонистов опиоидных пептидов, влияния опиатов на клеточные мембраны, клеточных аспектов толерантности к опиатам и т. д.



УДК 612.8:547.233

МЕХАНИЗМЫ УЧАСТИЯ КАТЕХОЛАМИНОВ В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ГЕНОМА КЛЕТОК

БОЖКО Г. Х.

НИИ неврологии и психиатрии им. В. П. Протопопова, Харьков

Обобщаются результаты исследований, свидетельствующие об универсальном значении активирования аденилатциклазной системы в действии всех известных нейромедиаторов и гормонов, включая стероиды и тиреоиды. Показано, что некоторые пептидные гормоны и катехоламины взаимодействуют с компонентами хроматина. В отдельных случаях обнаружены специфические участки связывания и рецепторы данного класса биологических регуляторов. Рассматриваются результаты исследований о поступлении катехоламинов в ядра нервных клеток и молекулярные механизмы их взаимодействия с компонентами хроматина. В хроматине норадреналин оказывает влияние преимущественно на уровне ДНК-белковых комплексов. Взаимодействие с ДНК и комплексами гистоны-негистоновые белки не может быть решающим в проявлении эффектов катехоламинов на функцию генома. Предполагается, что ответы клеток на действие катехоламинов включают два этапа: интегральное стимулирование при помощи аденилатциклазной системы и регуляцию активности индивидуальных генов в результате взаимодействия с внутриядерными структурами.

Достижения молекулярно-биологических исследований генома нервных клеток позволили приступить к выяснению молекулярных механизмов действия нейромедиаторов. При этом обнаружилось отсутствие принципиальных отличий в первичных (молекулярных) эффектах на геном регуляторов типа гормонов и нейромедиаторов. Напротив, отмечается их существенное подобие [1]. Это дает возможность при рассмотрении молекулярных механизмов действия нейромедиаторов привлекать экспериментальные данные и выводы, полученные в исследовании эффектов на геном типичных гормонов. Открывается перспектива создания общей теории регуляции генома на основе выявления единых закономерностей в действии гормонов и медиаторов на различные типы нервных и соматических клеток.

Цель настоящего обзора заключается в обобщении результатов, полученных при изучении молекулярных механизмов действия, главным образом, одного из нейромедиаторов—норадреналина. Обсуждается возможность его проникновения в ядра клеток и взаимодействия с компонентами хроматина. Отмеченные вопросы частично за-

трагивались в более ранних обзорах [1, 2]. Одна из недавних статей посвящена обобщению результатов влияния катехоламинов на синтез белков и нуклеиновых кислот [3]. Поэтому в обзоре подобные данные за редким исключением не рассматриваются.

Описание общих закономерностей гормонально-медиаторной регуляции приводится в монографии В. А. Ткачука, которую следует оценить как итог установившихся в этом направлении представлений [4]. Вместе с тем рассматриваемая проблема развивается настолько быстро, что уже ощущается противоречивость или неоднозначность не успевших стабилизироваться взглядов.

После того как была обнаружена роль аденилатциклазы и сАМР в опосредованном действии адреналина на стимулирование катаболизма углеводов и липидов, этот механизм экстраполировался на процессы регуляции генома с участием всех гормонов и нейромедиаторов. До недавнего времени господствовало мнение, что все известные гормоны и нейромедиаторы четко разделяются на два типа по способу регуляции активности генома клеток. Стероиды и тиреоиды проникают в ядра клеток и взаимодействуют с хроматином. Другие регуляторы гормонально-медиаторной группы в клетку не проникают, взаимодействуют с рецепторами плазматической мембраны, а дальнейшие эффекты на геном зависят от посреднической роли циклических нуклеотидов. Между тем выяснилось, что на активность аденилатциклазы способны влиять кортикостероиды и тироксин. Был обнаружен белок с молекулярной массой 54 кД, представляющий собой регуляторную субъединицу протеинкиназы II, фосфорилирование которого зависит от стероидов и сАМР. Это дало основание заключить, что механизм действия как полипептидных гормонов, так и стероидов и тиреоидов связан с функцией аденилатциклазной системы [5]. В клетках гипоталамуса крыс добавление эстрадиола приводило к увеличению уровня сАМР. Теофиллин усиливал этот эффект, а ингибиторы α - и β -адренорецепторов препятствовали действию эстрадиола [6]. В лимбической области мозга обнаружено взаимодействие эстрогенов с рецепторами для норадреналина, сопряженными с аденилатциклазой [7]. Таким образом, универсальное значение сАМР как посредника действия гормонов существенно расширилось.

С другой стороны, можно считать твердо установленным, что для таких гормонов полипептидной природы как инсулин, помимо рецепторов, находящихся в плазматической мембране, присутствуют специфические участки связывания в ядре клетки. Описан механизм транспорта инсулина в ядра гепатоцитов и ядерные рецепторы, специфичные к инсулину в клетках печени. Эти данные настолько убедительны, что вошли в авторитетный учебник по биохимии [8]. Первичное действие пролактина так же, как инсулина, осуществляется не через аденилатциклазную систему. Этот пептидный гормон селективно усиливает транскрипцию казенновой мРНК и время ее полураспада (в 17—25 раз). Число подобных примеров постоянно возрастает. С полной

уверенностью к ним можно отнести эритропоэтин, который сначала способствует дифференцировке стволовых клеток крови по эритроидному пути, а затем индуцирует в эритроблестах синтез глобиновой мРНК. Характерно также действие соматотропина, один из ранних эффектов которого заключается в усилении синтеза рРНК, повышенной активности ядрышковой РНК-полимеразы. Введение гормона роста приводит к уменьшению фосфорилирования негистоновых белков и увеличению фосфатных групп в гистонах. К числу низкомолекулярных гормонов, действующих через генетический аппарат клетки, непосредственно участвующих в регуляции синтеза РНК, относится большая группа гормонов растений—ауксины, гибберелины, цитокинины. Для них, как и для стероидов, показано существование рецепторных белков, ограниченное количество мест связывания на хроматине и прямое влияние на синтез РНК всех классов [9, 10].

Результаты экспериментов по изучению действия гормонов и нейромедиаторов, в том числе катехоламинов, на концентрацию сАМР и направленность изменений метаболизма белков и нуклеиновых кислот, связанную с соответствующим изменением уровня сАМР, весьма противоречивы. Наблюдались все возможные варианты—увеличение, уменьшение и отсутствие эффекта [11, 12]. Также далеко не однозначны данные по исследованию конечного этапа в цепи реакций, обусловленных активацией катехоламинами аденилатциклазы—процесса фосфорилирования белков [14]. Катехоламины способны изменять синтез белков и нуклеиновых кислот в самых различных типах эффекторных клеток, однако конкретные механизмы, точки приложения этих влияний, концентрационные зависимости, особенности эффектов в различных дифференцированных тканях остаются неизвестными.

Между тем можно с уверенностью сказать, что в пролиферирующих клетках стимуляция синтеза специализированных белков, РНК и ДНК не зависит от увеличения содержания сАМР. В пользу этого свидетельствуют следующие убедительные результаты экспериментов, выполненных на культивируемых клетках асцитной карциномы и хрящевой ткани куриных эмбрионов. При введении в инкубационную среду дибутирил-сАМР или сАМР вместе с ингибитором ФДЭ 3-изобутил-1-метилксантином было установлено, что причиной стимулирования белков и нуклеиновых кислот является внутриклеточный АТР из продуктов метаболизма сАМР [13].

Анализ молекулярных механизмов регуляции активности генома клеток катехоламинами с учетом накопленного к настоящему времени экспериментального материала приводит к следующим заключениям. сАМР далеко не единственный второй посредник в действии нейrogормонов. В этом качестве столь же существенна роль олиго-А, кальмодулина и Ca^{2+} . Эти и некоторые другие факторы формируют регуляторные циклы, согласованная работа которых обеспечивает оптимальную специализированную функцию клеток [2, 15]. Вероятно, что недооценка этого обстоятельства служит одной из причин неоднознач-

ности результатов экспериментов при исследовании изолированных циклических нуклеотидов (сАМР, сГМР).

Значение процессов сАМР--зависимого фосфорилирования в ядрах клеток для регуляции активности генома весьма ограничено. Существенную роль играет также сАМР-независимый перенос фосфатных остатков. В отдельных звеньях регуляторных систем, включающих сАМР, стимулирование процесса достигается при дефосфорилировании [16]. Недавно было установлено, что в клетках мозга протенинкиназная активность преимущественно сосредоточена в цитоплазме. В мембранной фракции активность киназ составляла 38%, и лишь 6,3% приходилось на долю клеточных ядер. В ядрах при увеличении содержания сАМР наблюдалось лишь незначительное стимулирование фосфорилирования в отличие от цитозоля, где оно возрастало в несколько раз [17]. Это согласуется с тем фактом, что в ядрах нейронов и других клеток присутствуют преимущественно сАМР-независимые протенинкиназы. сАМР-зависимые протенинкиназы характеризуются низкой субстратной специфичностью и могут фосфорилировать многие белки, в том числе и в хроматине, в состав которого входит около 500 индивидуальных белков. Причем они лучше катализируют фосфорилирование гистонов по сравнению с негистоновыми белками хроматина [16].

Фосфорилирование гистонов хроматина имеет значение для проявления эффектов катехоламинов и сАМР в индукции или ингибировании транскрипции. Известно, что диссоциация гистона Н1 является первым необходимым условием деконденсации хроматина. Этот процесс в свою очередь способствует началу транскрибирования ДНК. Вместе с тем фосфорилирование Н1 снижает его способность вызывать конформационные изменения в ДНК. Модифицированный Н1 связывается со многими или со всеми ДНК в препарате, а кооперативность его взаимодействия с ДНК нарушается. Показана корреляция между конденсацией хромосом в профазе митотического цикла и фосфорилированием Н1. Фосфорилированный при участии специфических киназ гистон более эффективно вызывает поперечные сшивки ДНК и агрегацию полинуклеотида, чем нефосфорилированный, что не согласуется с изменением величины положительного заряда его молекулы [18].

Механизмы регуляции генетического аппарата клеток с участием аденилатциклазной системы характеризуются невысоким уровнем специфичности. Усиление в результате гормонального эффекта функции индивидуальных генов или группы генов, кодирующих синтез белков одной ферментной системы, трудно представить в рамках классической схемы: активирование аденилатциклазы, синтез сАМР, стимулирование протенинкиназ, фосфорилирование хроматиновых белков. Возникает противоречие между относительно низкой специфичностью передаточного звена (сАМР) и высокоспецифическим ответом клетки—активацией определенного набора генов. Сигнал с плазматической мембраны передается на систему низкомолекулярных веществ, которые неспособны нести информацию, необходимую для высокоспецифической актива-

ции генов. В жировых клетках—адипоцитах увеличение концентрации сАМР достигается при действии, по крайней мере, восьми гормонов (АКТГ, глюкагон, адреналин и др.). Все они располагают собственными рецепторами, однако активируется при этом одна и та же аденилатциклаза [10].

Полагают, что катехоламины осуществляют свои специфические эффекты благодаря изменению компартментализации веществ в клетке. Это согласуется с их быстрым (порядка секунд или минут) действием. Однако в этом случае понятие компартментализации подменяется изменением проницаемости клеточных мембран. Катехоламины связываются с рецепторами, расположенными в плазматической мембране и открывают каналы пассивного транспорта ионов. Происходит перераспределение веществ в клетке или между клетками [4]. Синаптические эффекты катехоламинов несомненно сопровождаются изменением работы ионных каналов, в то время как регуляция функций генома не связана непосредственно с изменением проницаемости клеточных мембран. Естественно, при этом действие нейrogормона может лишь опосредованно влиять на синтез белков путем изменения обеспеченности систем белкового синтеза субстратами и энергией. Существенно, что сАМР-зависимое фосфорилирование направлено прежде всего на модификацию мембранных структур [4].

При активировании аденилатциклазной системы ускоряется или замедляется общий белковый синтез. Такая фаза в действии гормонов и нейромедиаторов наблюдалась в многочисленных экспериментах. В большинстве случаев стимулируется или индуцируется синтез *de novo* одновременно значительного количества различных белков, и повышается активность общего метаболизма [19]. Вероятно, что эти процессы обеспечивают подготовку клетки для реализации специфического эффекта нейромедиаторов и гормонов на геном и являются причиной хорошо известного для стероидов латентного периода, предшествующего синтезу индивидуальных мРНК. Вместе с тем следует предположить, что это лишь один из этапов нейrogормональной регуляции, подобный стрессу на клеточном уровне, неспецифической реакции готовности. Однако для клетки наиболее важна специфическая индукция и репрессия синтеза белков, то есть изменение концентрации лишь одного или нескольких белков при неизменной концентрации всех остальных [4]. Эта мысль все больше занимает исследователей. В отношении регуляции синтеза стероидов она формулируется таким образом, что вполне может быть распространена и на синтез белков. «Существует, по-видимому, два одинаково важных и согласованно работающих механизма активации стероидогенеза. Один из них опосредуется реакциями сАМР-зависимого фосфорилирования ферментов, а другой—изменением матричной активности генома» [4].

Одним из главных аргументов при обосновании необходимости вторичных посредников в механизмах действия катехоламинов считается наличие каскадной системы усиления сигнала этих нейrogор-

монов, поскольку физиологические их концентрации ($\sim 10^{-9}$ М) на один-два порядка ниже концентрации субстратов. При этом упускается из виду, по крайней мере, два существенных обстоятельства. Эффективная концентрация катехоламинов может быть значительно больше, чем 10^{-8} М. Например, в процессах проведения нервного импульса концентрация норадреналина в синаптической щели в момент выброса нейромедиатора составляет 10^{-4} — 10^{-3} М [20]. С другой стороны, хорошо известно, что действующие концентрации стероидов равны 10^{-10} — 10^{-8} М, то есть по порядку величин не отличаются от значений, характерных для норадреналина. Получается, что два класса гормонов, которым приписываются альтернативные механизмы регуляции активности генома, обладают одинаково важным качеством—присутствуют в клетках в близких друг другу концентрациях. Следовательно, выбор особенностей регуляции по этому признаку, предусматривающий усиление сигнала для одного вида гормонов и отсутствие такой необходимости для другого, выглядит неубедительно. Рассмотренные результаты дают основание предположить, что первичный ответ клетки на действие стероидов и катехоламинов осуществляется по типу стресс-реакции, вызванной активированием аденилатциклазной системы. Дальнейшие регуляторные эффекты этих биологически активных веществ на геном обуславливаются особенностями их химической структуры и реализуются на уровне хроматина: индуцируется транскрипция структурных генов, активных в данной специализированной клетке.

Как уже упоминалось, в результате сАМР-зависимого активирования протеинкиназ в хроматине фосфорилируются преимущественно гистоны. Эти белки представляют собой неспецифические интегральные ингибиторы транскрипции. Взаимодействие их с ДНК в отличие от негистоновых белков включает или выключает функцию участков генома в целом. Тонкая регуляция активности индивидуальных генов гистонами по многим причинам не может осуществляться. Модификация (фосфорилирование) гистонов должна вызывать сразу крупный генерализованный ответ генетического аппарата клеток. В пользу такого заключения свидетельствуют также данные о том, что введение животным сАМР в широком интервале концентраций вызывает стимуляцию синтеза в ткани головного мозга только рРНК и тРНК, в то время как синтез ядерных РНК АУ-типа даже угнетается. Иными словами, активируется предсуществовавшая программа новообразования макромолекул. Индукция синтеза мРНК отсутствует. Интересно, что противоположный эффект вызывает введение сГМР. В этом случае индуцируется накопление ядерных РНК АУ-типа (пре-мРНК) [14].

Показано, что повсеместно нервные и соматические клетки обладают рецепторами соответственно к различным нейромедиаторам и гормонам, причем, как правило, разнонаправленного действия. Осуществляется независимая регуляция определенных участков хроматина, а не модуляция одного гормона другим [21, 22]. Непонятно в этом случае, как реализуется специфичность регуляторных эффектов на геном от-

дельных катехоламинов, других нейромедиаторов и гормонов, если все они активируют аденилатциклазу. Трудно понять также, как происходит дифференциация физиологических ответов в таких клетках на основе механизмов, ограниченных взаимодействием эффектора с рецепторами плазматической мембраны. Известно, что специфичность определяется соответствующими рецепторами компетентных клеток, то есть гормон или нейромедиатор способен действовать на все ткани, а специфический эффект, проявляется только в клетках, располагающих нужным рецептором. Вместе с тем, поскольку синтез рецептора, как и других белков, кодируется нуклеотидными последовательностями ДНК, надо полагать, что специфичность регуляторных влияний обусловлена в конечном итоге свойствами генома.

Неизбежным следствием представлений о специфической роли сАМР в регуляции является необходимость допущения жесткой детерминированности структуры и функции генома. В какой-то мере, подразумевая дифференцировку тканей в многоклеточных организмах, структура нуклеотидов действительно детерминирована и наследуется по эпигенетическому типу. Однако речь при этом может идти лишь о той структуре, функция которой затем уже будет регулироваться гормонами и нейромедиаторами. В этом случае нет оснований считать геном строго запрограммированным, поскольку в многочисленных экспериментах с эукариотическими клетками наблюдалось явление гормональной индукции [22].

Пронесходят качественные сдвиги в экспрессии генов—показано, например, что до введения эстрадиола в печени птиц специфические мРНК отсутствуют [9]. В эукариотических клетках синтезируется около 10^5 различных молекул ядерных РНК. При этом даже в специализированных секреторных клетках специфические для них мРНК составляют лишь незначительную часть ($\sim 0,1—0,7\%$), то есть для поддержания стационарного состояния (нужды самоуправления) необходимо подавляющее большинство транскрибируемых мРНК. Вместе с тем понятно, что гены внутреннего жизнеобеспечения клетки не могут быть детерминированы, так как должны реагировать на изменение многих факторов внутренней и внешней среды, а не только на один гормон или нейромедиатор. Против детерминированности генома свидетельствуют также данные о том, что разные гормоны в одних и тех же клетках могут активировать синтез различных белков [9, 10, 22]. Не было обнаружено у прокариот специфического связывания рецепторного для сАМР белка с ДНК. Этот белок способен связывать нативные ДНК самого различного происхождения: фаговую, тимуса теленка, спермы лосося, эритроцитов курицы. Наблюдалось также связывание с денатурированной ДНК и с одиночными нитями репликативной формы фаговой ДНК. Следовательно, избирательность в регуляции каких-то определенных генов при активации аденилатциклазы и в этой простой системе отсутствует [23].

Гормональная регуляция не обладает триггерными свойствами.

Наблюдается не включение или выключение определенной функции, а только ее усиление или ослабление [4]. Между тем этот принцип обесценивается, если считать, что специфичность гормонального сигнала определяется набором генов и белков, функционирующих в данных клетках [2, 4]. В этом случае оказывается, что достаточно клетке пройти этапы дифференцировки, а в дальнейшем уже не важно, какой сигнал химической или физической природы активирует геном. Получается, что нет необходимости в разнообразии гормонов, нейромедиаторов и т. д., так как ответ клетки жестко детерминирован. Между тем наблюдается согласованность физиологических эффектов адреналина и норадреналина и противоположно направленное влияние их на процессы трансляции, транскрипции и репликации. Это находит отражение в том, что адреналин угнетает митотическую активность, а норадреналин ее стимулирует. Вместе с тем оба эти катехоламины, способные активировать аденилатциклазу, выступают как агонисты α - и β -адренорецепторов. В присутствии же сАМР деление клеток подавляется [3]. Следовательно, должны быть рецепторы со знаком «+» и «-». Между тем понятно, что регулирующих белков должно быть меньше, чем структурных генов, иначе создается порочный круг, в котором за каждым структурным геном будет стоять бесконечная цепочка регуляторных белков и генов, контролирующих друг друга [10]. Рецепторы, таким образом, выступают в качестве молекул, лишь совершающих гормонально-медиаторную регуляцию. Предшественник синтеза катехоламинов—ДОФА оказывает выраженные эффекты на состояние макромолекулярных синтезов, отличающееся от действия катехоламинов, между тем специальные рецепторы для этой аминокислоты неизвестны [1]. Возбуждение адренергических β -рецепторов, что закономерно связано с повышением уровня сАМР, ингибирует митотическую активность, а возбуждение α -рецепторов стимулирует регенерацию печени [24]. В какой-то мере названные противоречия могут сглаживаться, если допустить, что высокие и низкие концентрации сАМР активируют различные классы протеинкиназ, обуславливающих, в свою очередь, даже противоположные эффекты на процессы пролиферации [5]. Однако объяснить специфичность действия различных гормонов и нейромедиаторов на основе одного и того же механизма (индукция синтеза сАМР) по-прежнему затруднительно. Отмечается неопределенность зависимости функции отдельных нейронов от состояния аденилатциклазной системы. Описаны эксперименты, в которых не удалось подтвердить подобие влияния норадреналина и сАМР на возбудимость нейронов [25].

Таким образом, участие аденилатциклазной системы в опосредовании действия на геном катехоламинов характеризуется в основном интегральными эффектами, что дает основание предполагать возможность регуляции генома клеток нейромедиаторами путем взаимодействия с ядерными структурами. Важным свидетельством этого было бы наблюдение изменения матричной активности хроматина изолиро-

ванных ядер в присутствии катехоламинов. Постановка таких опытов была затруднена тем, что оптимум pH активности РНК-полимераз находится вблизи pH 8,0, а катехоламины в этих условиях окисляются. Методические трудности удалось преодолеть, используя свойство цитозоля ингибировать самоокисление катехоламинов. В результате было установлено, что норадреналин вызывал увеличение синтеза мРНК [26]. Существенно, что изменение матричного ДНК-зависимого синтеза РНК в изолированных ядрах нейронов многократно воспроизводилось под влиянием нейромедиаторов (АХ, серотонин, ГАМК), молекулы которых более устойчивы по сравнению с норадреналином. Актиномицин D устранял эти эффекты нейромедиаторов [20, 27].

При рассмотрении механизмов регуляторного действия катехоламинов, предусматривающих их взаимодействие с внутриядерными структурами, необходимо располагать данными о проникновении нейромедиатора в клетки. В экспериментах с радиоактивно меченым норадреналином было обнаружено, что он легко транспортируется в изолированные ядра нервной ткани и связывается с различными фракциями хроматиновых белков [28]. Катехоламины проникают также в ядра различных типов культивируемых клеток [29—31]. Весьма существенно, что норадреналин способен связываться с белками хроматина и карิโอплазмы *in vivo* после введения в боковые желудочки мозга с интенсивностью, пропорциональной скорости синтеза соответствующих фракций. Получены результаты, указывающие на то, что меченый норадреналин связывается с вновь синтезированными белками хроматина, новообразование которых было индуцировано в результате интракраниального введения нейромедиатора. Исследование кинетики взаимодействия с различными ядерными структурами выявляет последовательность процесса движения нейромедиатора: уменьшение уровня метки в карิโอплазме соответствует ее увеличению в хроматине [28].

Практически весь норадреналин, содержащийся в карิโอплазме, находится в связанном состоянии с высокомолекулярными ее компонентами. В остаточном ДНК-протениновом комплексе, белки которого наиболее вероятные претенденты на роль специфических регуляторов активности хроматина, норадреналин связывается с полипептидными компонентами, а не с ДНК.

Известно, что при рассмотрении специфичности взаимодействия нейромедиатора или гормона с рецепторами, учитывается блокирование связывания нейrogормона его химическими аналогами. Лучшими в этом смысле аналогами по сравнению с любыми агонистами или антагонистами являются стереоизомеры. Как выяснилось, значение величины связывания dl- и l-норадреналина с различными белковыми фракциями хроматина не было одинаковым. С ДНК-белковым комплексом l-изомер взаимодействовал в два раза интенсивнее, чем dl-препарат, то есть можно полагать, что величина связывания dl-норадреналина определялась количеством l-изомера в рацемической смеси. С белками карิโอплазмы l-изомер взаимодействовал в 7 раз интенсивнее, чем dl-но-

радреналин. Это, по-видимому, не зависело от различной проницаемости стереоизомеров норадреналина, так как величина связывания dI-препарата с гистонами и негистоновыми белками отличалась незначительно по сравнению с ДНК-белковым комплексом и материалом карноплазмы.

При изучении механизмов регуляции процессов транскрипции и репликации ДНК стероидными гормонами было обнаружено, что ингибиторы РНК- и ДНК-полимераз, действующие путем блокирования связывания этих ферментов с ДНК, препятствуют также взаимодействию гормон-рецепторных комплексов с хроматином [4]. Интересно, что взаимодействие I-норадреналина с ДНК-белковым комплексом и белками карноплазмы в отличие от гистонов и фракции негистоновых белков полностью блокировалось актиномицином D при интракраниальном введении его вместе с нейромедиатором. Таким образом, эффект актиномицина D на взаимодействие норадреналина с хроматином подобен действию на связывание стероидных гормонов. Эти факты косвенно указывают на присутствие в ядрах клеток мозга рецепторов норадреналина и служат обоснованием для их поисков и выделения в виде индивидуальных белков [32].

Результаты молекулярно-биологических исследований свидетельствуют, что биологически активные вещества участвуют в регуляции активности генома, оказывая влияние на структуру ДНК, ДНК-белковые и белок-белковые взаимодействия в хроматине. В связи с этим при исследовании молекулярных механизмов действия норадреналина на генетический аппарат клеток изучали его эффекты на ДНК, комплексы ДНК-белок и гистоны-негистоновые белки. Было установлено, что норадреналин связывается с очищенными молекулами ДНК в результате ионных, водородных и гидрофобных взаимодействий. Данные ЯМР-спектроскопии свидетельствовали, что ковалентные связи или интеркаляция норадреналина между плоскостями оснований ДНК не наблюдаются [33, 34]. Избирательность взаимодействия норадреналина по отношению к различным классам очищенных поли- или мононуклеотидов отсутствовала, то есть реакция с ДНК была не специфической [35].

Макромолекулярная структура ДНК в присутствии норадреналина изменялась незначительно. Вместе с тем следует подчеркнуть, что при соблюдении условий, препятствующих окислению нейромедиатора, дефекты двойной спирали не возникают. Какие-либо признаки деградации ДНК не наблюдались [36, 37]. Отсюда следует, что реакция связывания норадреналина и ДНК не имеет сколько-нибудь существенного биологического значения [38]. Структура комплексов гистоны-негистоновые белки под влиянием норадреналина не изменялась. Таким образом, на уровне белок-белковых взаимодействий в хроматине норадреналин также не действует [39].

Результаты спектроскопии в оптическом и радиодиапазонах, а

также удаление радиоактивно меченного норадреналина после обработки нуклеопротеидов проназой, указывали на преимущественное взаимодействие нейромедиатора с белковыми компонентами хроматина. Изучение параметров тепловой денатурации ДНК-белковых комплексов показало, что норадреналин в концентрации 10^{-9} — 10^{-8} М вызывал нарушение связи ДНК-белок. В пользу этого свидетельствовали также эксперименты по гель-хроматографии, в результате которых удалось наблюдать частичную депротенинизацию этого комплекса в присутствии норадреналина. Существенно, что эффект обладал кооперативностью: одна молекула нейромедиатора была способна оказывать влияние на участок ДНК, лишь немногим уступающий по величине средним размерам генов. Возможно, что физиологические концентрации норадреналина достаточны для возникновения серьезных изменений в структуре хроматина [40, 41].

Было установлено, что необходимым условием для этого является наличие фенильных атомов кислорода в 3- и 4-ом положении бензольного кольца норадреналина, способных к образованию хелатных связей [42, 43]. На этом основании можно заключить, что в составе комплекса ДНК-белок норадреналин взаимодействовал не собственно с белками, а с двухвалентными катионами, при помощи которых белки связаны с ДНК, что согласуется с данными, свидетельствующими о большом значении этих катионов в формировании структуры хроматина. Связь гистонов с ДНК стабилизируется двухвалентными катионами, и при этом фиксируется определенная конформация двойной спирали [44]. Наблюдали связывание с ДНК индивидуальных негистоновых белков, опосредованное Me^{2+} [45]. Обработка хроматина комплексами приводит к его деконденсации [46]. ЭДТА—классический комплексон—подобно норадреналину изменял величину параметров тепловой денатурации ДНК и вызывал диссоциацию части белков в составе их комплекса с ДНК [40, 47]. Определение в нем содержания многовалентных катионов металлов показало, что эффективная концентрация катехоламинов и ЭДТА соответствует суммарному содержанию Mg^{2+} и Ca^{2+} [42]. Все это позволяет считать, что молекулярный механизм взаимодействия норадреналина с хроматином может включать изменение его свойств после нейтрализации названных катионов, что вызывает освобождение части белков, деконденсацию определенных участков хроматина, подготавливающих таким образом к началу транскрипции. Этот механизм согласуется с данными о том, что при умеренной транскрипции структурной области генов происходит удаление гистона H1 и части коровых гистонов, а при интенсивной—всех гистонов. Важно, что удаление H1—процесс кооперативный [48].

* * *

Изложенный в статье материал можно рассматривать как элементы теории гормонально-медиаторной регуляции катехоламинами активности генома эффекторных клеток. Катехоламины, связавшиеся с пост-

синаптической мембраной, активируют аденилатциклазу и стимулируют все последующие процессы интегральной стимуляции систем эффекторной клетки. Часть молекул реутилизируется путем обратного захвата. Одновременно норадреналин проникает внутрь иннервированной клетки и действует на хроматин по механизму, обеспечиваемому его хелатными свойствами. В этом важная роль принадлежит гидроксилсам в 3- и 4-ом положении ароматической части молекулы катехоламинов, при участии которых происходит также взаимодействие с адренорецепторами [43]. Установлено, что обработка ДНК-протениновых комплексов катехоламинами и эстрогенами вызывала качественно идентичные изменения в их кривых плавления [49]. Обнаружено, что повторные инъекции катехоламинов так же, как стероидов, вызывают обычно более выраженные эффекты, чем первые [50]. Катехоламины, наряду со стероидными и тиреоидными гормонами, выступают в качестве регуляторов роста, развития, дифференцировки клеток [4, 51]. В отличие от быстрых эффектов указанных гормонов в процессах синаптической передачи, время развития этого их действия измеряется часами. Следует обратить также внимание на то обстоятельство, что тиреоидные гормоны и катехоламины являются производными одной и той же аминокислоты—тирозина. Все перечисленное свидетельствует в пользу предположения о наличии общих закономерностей в действии катехоламинов, стероидных и тиреоидных гормонов... Возможно, эти регуляторы действуют на клетки в два этапа, активируя вначале аденилатциклазную систему, а затем проникают в ядро и взаимодействуют с хроматином.

Выявленные закономерности и сформулированные представления не исчерпывают проблему изучения молекулярных механизмов действия катехоламинов, а являются лишь предпосылкой для дальнейших исследований в этом направлении.

MECHANISMS OF CATECHOLAMINE INVOLVEMENT IN THE REGULATION OF CELL GENOME ACTIVITY

BOZHKO G. KH.

Kharkov Research Institute for Neurology and Psychiatry, Ministry of Health, UkrSSR

The universal role of adenylate cyclase-cAMP system activation in the effect of all known classes of neuromediators and hormones is summarized. It has been established that some peptide hormones and catecholamines interact with chromatin. In some cases specific binding sites and receptors for biological regulators are described. Data concerning catecholamine penetration into nuclei of neurons and the molecular mechanisms of CA interaction with chromatin components are considered. It is shown that norepinephrine mainly affects DNA-protein complexes of chromatin. The catecholamine interaction with DNA and histone-

nonhistone complexes cannot be a decisive factor in the realization of ca effect on genome function. Cells response to CA action is supposed to include two steps: a general stimulation through cyclase system and the regulation of individual genes due to interaction with intranuclear structures.

ЛИТЕРАТУРА

1. Третьяк Т. М. Успехи физиол. наук, т. 9, № 4, с. 103—114, 1978.
2. Кометиани П. А. Нейрохимия, т. 1, № 4, с. 394—405, 1982.
3. Божко Г. Х. Пробл. эндокринологии, т. 30, № 2, с. 3—9, 1984.
4. Ткачук В. А. Введение в молекулярную эндокринологию, М., МГУ, 1983.
5. Феденко Е. П., Доман Н. Г. Успехи соврем. биол., т. 96, № 3 (6), с. 323—328, 1983.
6. Ganaga K. P., Menon K. M. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 54, № 1, p. 440—448, 1973.
7. Mishra R., Sulger F. Biochem. Pharmacol., v. 30, № 22, p. 3126—3128, 1981.
8. Уайт Л., Хендлер Ф., Смит Э., Хилл Р. Основы биохимии, т. 3, М., Мир, 1981.
9. Газарян К. Г., Тарантул В. З. Геном эукариот. Молекулярная организация и экспрессия, М., МГУ, 1983.
10. Нейфах А. А., Тимофеева М. Я. Проблемы регуляции в молекулярной биологии развития, М., Наука, 1978.
11. Дорофеев Г. И., Кожемякин Л. А., Ивашкин В. Т. Циклические нуклеотиды и адаптация организма, Л., Наука, 1978.
12. Bloxman D. P., Klaipongpan A. Int. J. Biochem., v. 10, № 1, p. 1—5, 1979.
13. Симхович Б. З., Селина А. В. Бюл. экперим. биол. и мед., т. 90, № 9, с. 320—322, 1980.
14. Хачатрян Г. С. Биохимия нуклеиновых кислот и высшие функции головного мозга, Ереван, Айастан, 1981.
15. Северин Е. С., Иткес А. В., Туницкая В. Л.—В кн.: Биохимические механизмы регуляции генетической активности, Киев, с. 119, 1984.
16. Kwiatkowska J. Post. Hig. Med. Dosv., v. 34, № 3, p. 169—187, 1980.
17. Кочетков С. Н., Северин Е. С. Биохимия, т. 49, № 2, с. 344—348, 1984.
18. Кучеренко Н. Е., Цудзевич Б. А., Блюм Я. Б., Бабенюк Ю. Д. Биохимическая модель регуляции активности хроматина, Киев, Наукова думка, 1983.
19. Хесин Р. Б. Успехи соврем. биол., т. 74, № 2(5), с. 171—197, 1972.
20. Глебов Р. Н., Крыжановский Г. Н. Функциональная биохимия синансов, М., Медицина, 1978.
21. Сахаров Д. Л. Генеалогия нейронов, М., Наука, 1974.
22. Покровский Б. В. Успехи соврем. биол., т. 95, № 2, с. 194—208, 1983.
23. Nissley P., Anderson W. B., Gallo M. J. Biol. Chem., v. 247, № 13, p. 4264—4269, 1972.
24. Юдаев Н. А., Афиногенова С. А., Покровский Б. В. Успехи соврем. биол., т. 80, № 3(6), с. 351—369, 1975.
25. Lacey N., Gordon L. M., Phillis J. W. Nature. New. Biol., v. 240, № 103, p. 248—250, 1972.
26. Елаев Н. Р. Пробл. эндокринологии, т. 27, № 1, с. 56—62, 1981.
27. Елаев Н. Р. Цитология, т. 20, № 10, с. 1173—1179, 1978.
28. Божко Г. Х., Краева В. С., Чурсина В. С. Докл. АН УССР, сер. Б, № 9, с. 58—60, 1983.
29. Axelsson S., Elofsson R., Falek B. Acta dermatovenerol., v. 58, № 78, p. 31—35, 1978.
30. Csaba G., Sudar F., Pados R. Endocrinologi, v. 76, № 3, p. 340—344, 1980.

31. *Murakami H., Yamada K., Shirachata S.* Agr. and Biol. Chem., v. 42, № 1, p. 45—49, 1978.
32. Божко Г. Х., Краева В. С.— В кн.: Биохимические механизмы регуляции генетической активности, с. 11—12. Киев, 1984.
33. Божко Г. Х., Веркин Б. И., Панишева Р. Н. Докл. АН УССР, сер. Б, № 6, с. 554—557, 1971.
34. Божко Г. Х., Веркин Б. И., Переверзев Н. П. Укр. біохім. журн., т. 44, № 4, с. 468—472, 1972.
35. Божко Г. Х., Веркин Б. И., Переверзев Н. П. Пробл. эндокринологии, т. 19, № 1, с. 76—78, 1973.
36. Божко Г. Х., Веркин Б. И., Емец Б. Г. Докл. АН УССР, сер. Б, № 4, с. 446—448, 1973.
37. Божко Г. Х., Бондиренко И. Б. Докл. АН УССР, сер. Б, № 4, с. 330—332, 1977.
38. Божко Г. Х. Вопр. мед. химии, т. 30, № 4, с. 12—16, 1984.
39. Божко Г. Х.—В кн.: Структура и функция клеточного ядра, с. 108—109, Пушчино, 1984.
40. Благой Ю. П., Сорокин В. А., Божко Г. Х. Молекул. биология, т. 9, № 6, с. 812—819, 1975.
41. Божко Г. Х., Сорокин В. А., Каренина Т. И. Укр. біохім. журн., т. 50, № 2, с. 202—205, 1978.
42. Благой Ю. П., Сорокин В. А., Божко Г. Х. Молекул. биология, т. 10, № 5, с. 1011—1017, 1976.
43. Альберт Э. Избирательная токсичность, М., Мир, 1971.
44. *Helene C.* Nucl. Acids Res. v. 2, № 6, p. 961—969, 1975.
45. *Kawasima K., Izawa M.* Mol. Biol. Repts., v. 3, № 2, p. 113—119, 1976.
46. *Vengerov Yu., Popenko V.* Nucl. Acids. Res., v. 4, № 9, p. 3017—3027, 1977.
47. Божко Г. Х., Доманский Н. Н., Пуйда Н. Г. Докл. АН УССР, сер. Б, № 6, с. 533—536, 1977.
48. Преображенская О. В., Карпов В. Л., Мирзабеков А. Д. Молекуляр. биология, т. 18, № 1, с. 8—20, 1984.
49. *Choi M., Abramson M. B.* Biochim. et biophys. acta, v. 540, № 2, p. 337—345, 1978.
50. Комиссаров И. В. Лекарственная регуляция адренергических процессов, Киев. Здоровье, 1976.
51. *Aberer W., Kostron H., Huber E.* Biochem. J., v. 72, № 3, p. 353—360, 1978.
52. *Kirpekar S. M., Jarlia A. A., Prat J. C.* Biochem. Pharmacol., v. 29, № 12, p. 3029—3031, 1980.
53. Стефанович Л. Е., Елисеева Л. С., Попова В. С. Биохимия, т. 47, № 8, с. 1370—1374, 1982.
54. Португалов С. Н. Бюл. экперим. биол. и мед., т. 85, № 4, с. 416—419, 1978.
55. *Serota F., Baserga R.* Science, v. 167, № 3923, p. 1018—1020, 1970.
56. Бузников Г. А. Низкомолекулярные регуляторы зародышевого развития. М., 1967.

Поступила 20. II 1985

CONTENTS

<i>E. M. Kreps</i> (Obituary)	349
<i>Parfenova E. V.</i> Action of 6-hydroxydopamine on GABA-receptors in rat brain cortex	351
<i>Armenian A. R., Arakeljan I. N., Galoyan A. A.</i> Presynaptic regulation of serotonin release in rat brain mesodiencephalic region	359
<i>Merezhinskaya N. V., Okun I. M., Rakovich A. A., Lyskova T. I., Aksentsev S. I., Orlov S. N., Konev S. V.</i> Effect of ketamine on the functional state of rat brain synaptosomes	365
<i>Kuchmerovskaya T. M., Parkhomets P. K., Chichkovskaya G. V., Khalmuradov A. G., Rozhanskaya O. P.</i> Nature of NAD-binding sites in brain cortex synaptic membranes	373
<i>Bedjanyan K. D., Badalyan L. L., Oganesyan V. C.</i> Phosphate-dependent soluble glutaminase from rat brain. Role of different agents in the modulation of its activity	379
<i>Gasparov V. S., Nalbandyan R. M.</i> Water in the active site of neurocuprein	388
<i>Flerov M. A.</i> Metabolic activity of phospholipids in neurons and neuroglia	393
<i>Revin V. V., Kadyallev D. A., Liyashin Y. K., Kolesnikova V. N., Kols O. R.</i> Composition of nerve conductors lipid phase at rest and at stimulation	402

Short communications

<i>Nazaryan K. B., Kazaryan B. A., Karapettan N. G.</i> Purification and some physico-chemical properties of bovine brain enolase isozymes	410
<i>Koryagin A. S.</i> Physico-chemical characteristics of soluble H ⁺ -ATPase from bovine brain mitochondria	415
<i>Haroutjunian L. A., Simontan R. A., Simonian A. A.</i> Regulation of isocitrate dehydrogenase activity in hen brain during development	419
<i>Aduntz E. G., Paronyan Zh. A., Aprikyan G. V., Akhverdyan E. S.</i> Intensity of glucose oxidation and glycolysis rate in rat brain synaptosomes on aging	423

Reviews

<i>Gromova E. A., Semenova T. P., Grishchenko N. Y.</i> Mechanisms of toxic effect of 6-hydroxydopamine on catecholaminergic brain structures	427
<i>Bozhko G. Kh.</i> Mechanisms of catecholamine involvement in the regulation of cell genome activity	442

СО Д Е Р Ж А Н И Е

<i>Евгений Михайлович Крепс</i> (Некролог)	349
<i>Парфёнова Е. В.</i> Действие 6-оксидофамина на ГАМК-рецепторы коры мозга крыс	351
<i>Армениян А. Р., Аракелян Л. Н., Галоян А. А.</i> О пресинаптической регуляции высвобождения серотонина в мезодiencephальной области мозга крыс	359
<i>Мережинская Н. В., Окунь И. М., Рикович А. А., Лыскова Т. И., Аксентев С. Л., Орлов С. Н., Конев С. В.</i> Влияние кетамина на функциональное состояние синапсом мозга крыс	365
<i>Кучмеровская Т. М., Пархомец П. К., Чичковская Г. В., Халмуратов А. Г., Рожанская О. П.</i> О природе участков синаптических мембран коры головного мозга, связывающих никотинамидденидинуклеотид	373
<i>Беджанян К. Д., Бадалян Л. Л., Оганесян В. С.</i> Растворимая фосфатзависимая глутаминидаза мозга крыс и роль различных модуляторов в регуляции её активности	379
<i>Госпаров В. С., Налбандян Р. М.</i> Вода в активном центре нейрокуперина	388
<i>Флёров М. А.</i> Метаболическая активность фосфолипидов в нейронах и нейроглии	393
<i>Ревин В.В., Кадималиев Д. А., Лияськин Ю. К., Колесникова В. Н., Кольс О. Р.</i> Состав липидной фазы нервных проводников в покое и изменение его при проведении возбуждения	402

Краткие сообщения

<i>Назарян К. Б., Қазарян Б. А., Карапетян Н. Г.</i> Очистка и некоторые физико-химические свойства изоферментов енолазы головного мозга быка	410
<i>Корягин А. С.</i> Физико-химическая характеристика растворимой H^+ -АТРаза митохондрий головного мозга быка	415
<i>Арутюнян Л. А., Симонян Р. А., Симонян А. А.</i> К регуляции лизотриглицеридогеназной активности в ткани мозга кур в ходе онтогенетического развития	419
<i>Адуниц Э. Г., Паронян Ж. А., Априкян Г. В., Ахвердян Э. С.</i> Интенсивность окисления глюкозы и гликолиза в синапсомах головного мозга белых крыс при старении	423

Обзоры

<i>Громова Е. А., Семенова Т. П., Грищенко Н. И.</i> Механизмы токсического действия 6-оксидофамина на катехоламинергические структуры мозга	427
<i>Божко Г. Х.</i> Механизмы участия катехоламинов в регуляции активности генома клеток	442

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

8. Корректуру авторам редакция не высылает.

СОДЕРЖАНИЕ

журнала «Нейрохимия», том 4, 1985 г.

Выпуск I

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

Краткие сообщения

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

Обзоры

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

Некролог

Игорь Александрович Сытинский (1926—1984)	96
---	----

Хроника

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

Рефераты статей, направленных на депонирование в ВИНТИ

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

Выпуск 2

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

Краткие сообщения

- Каранова М. В., Кузнецов В. И., Тонких А. К. Выделение рецептора ГАМК из мозга крыс аффинной хроматографией с использованием феногенама 177
- Кузнецов В. И., Тонких А. К., Каранова М. В., Ким О. Н., Таканаев А. А., Садыков А. С. Апами-конкурентный ингибитор связывания 3H -ГАМК с рецептором ГАМК 181
- Головина Т. Н., Маликов У. М., Рубинская Н. Л. Белки и РНК в клетках супраолигического ядра и дорзального ядра шва головного мозга сусликов, впавших в зимнюю спячку в октябре-марте 185
- Фураев В. В., Суворов С. А. О локализации кальмодулина в обонятельной выстилке 190

Замуруев О. Н. Содержание фосфолипидов и малонилдиальдегида в коре больших полушарий при ишемии мозга крыс	193
--	-----

Обзоры

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

Хроника

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

Рецензии

Ланченко Л. Ф., Промыслов М. Ш. Обмен веществ в мозге и его регуляция при черепно-мозговой травме	231
---	-----

Выпуск 3

К 100-летию со дня рождения академика А. В. Палладина (1885—1972)	237
Полетаев А. Б., Грудень М. А. Изучение эндогенных белковых лигандов мозго-специфических белков группы S-100	245
Коган А. Б., Каминский 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 мышц саранчи	260
Панушева Н. Н., Доведова Е. Л. Метаболизм биогенных аминов в субклеточных структурах двигательной системы головного мозга крыс при длительной гипоксии	268
Калинина С. Н., Этингер Р. Н. Характеристика антител к GTP-связывающим белкам наружных сегментов палочек сетчатки	276
Микеладзе Д. Г., Качарави Д. Г., Гвалия Н. В. Активация кальциевых каналов синапсом некоторыми фосфонептидами нервной ткани	284
Горбунов Н. В., Аннанесов Х. Н. Продукты перекисного окисления липидов и состав жирных кислот липидов синапсом головного мозга мышей «Quking» и мышей с острой вирусной демиелинизацией	290

Краткие сообщения

Свами М., Прасад М. С. К., Садасивуду Б. Влияние амниака на некоторые ферменты цикла мочевины и орнитин-аминотрансферазу головного мозга	296
Карагезян К. Г., Самаялян В. М., Овсепян 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 полифосфонуксидов мозга при его ишемии	306
Зинченко В. А., Сытинский И. А. Активность γ -глутамилтрансферазы в спинномозговой жидкости больных с острыми нарушениями мозгового кровообращения	310

Обзоры

Кричевская А. А., Бондаренко Т. И., Миклецова М. Г. Гомокарбонин: метаболизм и функции	314
Голаненко А. В. Захват аденозина нервными окончаниями и его регуляция	327

Рецензии

Глебов Р. Н., Болдырев А. А. Биологические мембраны и транспорт ионов . 337

Рефераты статей, направленных на депонирование в ВИННИТИ

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 активности митохондриальной МАО головного мозга норки и крысы	341
Алиев Н. А. Нейромедиаторные аминокислоты в регуляции иммунных реакций у больных шизофренией	342
Хаватова Е. М., Семенова Т. С., Савельева С. Н., Шуматова Е. Н., Образцова Н. Г. Кинетические свойства изоферментов креатинкиназы мозга	343

Выпуск 4

Евгений Михайлович Крекс (Некролог)	349
Парфёнова Е. В. Действие 6-оксидофамина на ГАМК-рецепторы коры мозга крыс	351
Армянян А. Р., Аракелян Л. Н., Галоян А. А. О пресинаптической регуляции высвобождения серотонина в мезодiencephальной области мозга крыс	359
Мережинская Н. В., Окунь Н. М., Ракович А. А., Лыскова Т. И., Аксентьев С. Л., Орлов С. Н., Конева С. В. Влияние кетамина на функциональное состояние синапсом мозга крыс	365
Кучеровская Т. М., Пархомец П. К., Чичковская Г. В., Халмуратов А. Г., Рожанская О. П. О природе участков синаптических мембран коры головного мозга, связывающих никотинамидадениндинуклеотид	373
Беджанян К. Д., Бадалян Л. Л., Оганесян В. С. Растворимая фосфатзависимая глутаминаза мозга крыс и роль различных модуляторов в регуляции её активности	379
Госпаров В. С., Налбандян Р. М. Вода в активном центре нейрокуперина	388
Флёров М. А. Метаболическая активность фосфолипидов в нейронах и нейроглии	393
Ревин В. В., Кадималиев Д. А., Лияськин Ю. К., Колесникова В. Н., Кольс О. Р. Состав липидной фазы нервных проводников в покое и изменение его при проведении возбуждения	402

Краткие сообщения

Назарян К. Б., Казарян Б. А., Карапетян Н. Г. Очистка и некоторые физико-химические свойства изоферментов ендолазы головного мозга быка	410
Корякин А. С. Физико-химическая характеристика растворимой H^+ -АТФазы митохондрий головного мозга быка	415
Арутюнян Л. А., Симонян Р. А., Симонян А. А. К регуляции изоцитратдегидрогеназной активности в ткани мозга кур в ходе онтогенетического развития	419
Адуниц Э. Г., Паронян Ж. А., Априкян Г. В., Ахвердян Э. С. Интенсивность окисления глюкозы и гликолиза в синапсоммах головного мозга белых крыс при старении	423

Обзоры

Громова Е. А., Семенова Т. П., Грищенко Н. И. Механизмы токсического действия 6-оксидофамина на катехоламинергические структуры мозга	427
Божко Г. Х. Механизмы участия катехоламинов в регуляции активности генома клеток	442

УКАЗАТЕЛЬ АВТОРОВ, ОПУБЛИКОВАННЫХ В ТОМЕ 4, 1985 г.

- Абрамян К. С. 172 (2)
 Адуни Э. Г. 423 (4)
 Азарян А. В. 227 (2)
 Айвазянвили И. М. 141 (2)
 Аксентьев С. Л. 365 (4)
 Алиев Н. А. 342 (3)
 Андросова Л. В. 10 (1)
 Аннанесов Х. Н. 290 (3)
 Антипов А. Д. 341 (3)
 Априкян Г. В. 423 (4)
 Аракелян Л. Н. 359 (4)
 Армян А. Р. 359 (4)
 Арутюнян А. М. 102 (1)
 Арутюнян Л. А. 419 (4)
 Арямова Ж. М. 148 (2)
 Ахвердян Э. С. 423 (4)
- Бадалян Л. Л. 379 (4)
 Балков Д. И. 23 (1)
 Беджаниян К. Д. 379 (4)
 Белик Я. В. 23 (1)
 Белявцева Л. М. 3 (1)
 Божко Г. Х. 442 (4)
 Болдырев А. А. 80 (1)
 Бондаренко Т. И. 314 (3)
 Бородкин Ю. С. 3 (1)
 Бурбасва Г. Ш. 10 (1)
- Воробьев Ю. В. 65 (1)
- Галоян А. А. 56 (1), 227 (2), 359 (4)
 Гасанов Г. Г. 100 (1)
 Гаспаров В. С. 388 (4)
 Гвалля Н. В. 16 (1), 284 (3)
 Генгин М. Т. 117 (2)
 Гецова В. М. 101 (1)
 Глебов Р. Н. 337 (3)
 Голикова Ю. И. 48 (1)
 Головина Т. Н. 185 (2)
 Горбунов Н. В. 290 (3)
 Горкин В. З. 68 (1), 340 (3)
 Горошинская И. А. 134 (2)
 Грищенко Н. И. 427 (4)
 Громова Е. А. 427 (4)
 Грудень М. А. 245 (3)
 Гурвич Б. Я. 56 (1)
 Гусатинский В. И. 254 (3)
- Дмитриев А. Д. 48 (1)
 Доведова Е. Л. 268 (3)
- Замуруев О. И. 193 (2)
 Захарян Э. К. 301 (3)
 Зинченко В. А. 310 (3)
- Исманлов И. А. 104 (1)
 Иорданишвили Г. С. 141 (2)
- Кадималиев Д. А. 402 (4)
 Казарян Б. А. 410 (4)
 Калинин С. Н. 276 (3)
 Каминский И. И. 254 (3)
 Каранова М. В. 177 (2), 181 (2), 260 (3)
 Карганов М. Ю. 197 (2)
 Камышанская Н. С. 340 (3)
 Капралов А. А. 23 (1)
 Карагезян К. Г. 301 (3)
 Карапетян Н. Г. 410 (4)
 Каркищенко Н. Н. 35 (1)
 Качарава Д. Г. 284 (3)
 Кизим Е. А. 48 (1)
 Ким О. Н. 181 (2)
 Клейн Е. Э. 16 (1)
 Кобылянский А. Г. 48 (1)
 Коган А. Б. 254 (3)
 Колесникова В. Н. 402 (4)
 Кольс О. Р. 402 (4)
 Конев С. В. 365 (4)
 Корягин А. С. 30 (1), 415 (4)
 Кравцов А. В. 148 (2)
 Кравцова В. В. 148 (2)
 Кричевская А. А. 314 (3)
 Кузнецов В. И. 177 (2), 181 (2), 260 (3)
 Куликова О. Г. 3 (1)
 Куликова О. Н. 35 (1)
 Кучмеровская Т. М. 373 (4)
 Кцоян Ж. А. 105 (1)
- Лияськин Ю. К. 402 (4)
 Лопина О. Д. 80 (1)
 Лосева Е. В. 103 (1)
 Луценко В. К. 197 (2)
 Лыскова Т. И. 365 (4)

Майоров В. Н. 163 (2)
Маклецова М. Г. 314 (3)
Маликов У. М. 185 (2)
Малоз А. М. 341 (3)
Мамаджанян Л. З. 301 (3)
Манукян К. Л. 105 (1)
Мелешко В. И. 117 (2)
Мельников Э. М. 100 (1)
Мережипская Н. В. 365 (4)
Микеладзе Д. Г. 284 (3)
Мовсумов Г. Д. 100 (1)
Москвитина Т. А. 340 (3)
Мурти В. 52 (1)

Назарян К. Б. 410 (4)
Назарян О. А. 102 (1)
Налбандян Р. М. 388 (4)
Никитин В. П. 163 (2)
Николаншвили М. Н. 141 (2)
Новикова Н. А. 30 (1)

Образцова Н. Г. 343 (3)
Овсепян Л. М. 301 (3)
Оганесян В. С. 379 (4)
Окунь Н. М. 365 (4)
Орлова Н. В. 101 (1)
Орлов С. Н. 365 (4)
Остапенко Н. А. 126 (2)
Отеллиа В. А. 98 (1)

Павлинова Л. И. 306 (3)
Панушева Н. Н. 268 (3)
Панченко Л. Ф. 231 (2)
Паронян Ж. А. 423 (4)
Парфенова Е. В. 351 (4)
Пархомец И. К. 373 (4)
Позднев В. Ф. 340 (3)
Полетаев А. Б. 245 (3)
Попова Г. М. 157 (2)
Пракаш Г. С. 52 (1)
Прасад М. С. К. 52 (1), 296 (3)
Прокопьева В. Д. 80 (1)
Промыслов М. Ш. 65 (1), 157 (2)

Разумовская Н. И. 3 (1)
Ракович А. А. 365 (4)
Рева А. Д. 117 (2)
Ревин В. В. 402 (1)
Рожанская О. П. 373 (4)
Розенгарт В. П. 214 (2)
Романенко А. В. 327 (3)
Ростомян М. А. 172 (2)
Рубинская Н. Л. 185 (2)

Савельева С. Н. 343 (3)
Садасивуду Б. 52 (1), 296 (3)
Садыков А. А. 260 (3)
Садыков А. С. 181 (2)
Самвелян В. М. 301 (3)
Самовилова Н. Н. 48 (1)
Самойлов М. О. 163 (2)
Свами М. 296 (3)
Семенова Т. П. 97 (1), 427 (4)
Семенова Т. С. 343 (3)
Симомян А. А. 419 (4)
Симомян Р. А. 419 (4)
Страдомский Б. В. 35 (1)
Субраманиям К. 52 (1)
Суворов С. А. 190 (2)
Суджян Ц. М. 43 (1)
Сытинский И. А. 310 (3)

Таканаев А. А. 181 (2)
Теннов А. В. 48 (1)
Тонких А. К. (2), 181 (2), 260 (3)
Туровский В. С. 339 (3)
Тюленев В. Н. 23 (1)
Тюлькова Е. Н. 306 (3)

Федоренко Г. М. 134 (2)
Флеров М. А. 393 (4)
Фураев В. В. 190 (2)

Халмурадов А. Г. 373 (4)
Ханбабян М. В. 102 (1)
Хватова Е. М. 30 (1), 343 (3)
Хованских А. Е. 340 (3)
Ходалова А. А. 134 (2)

Цветненко Е. З. 61 (1)

Чернышевская Н. А. 103 (1)
Чичковская Г. В. 373 (4)

Шарова Н. П. 56 (1)
Шерстнев В. В. 163 (2)
Шерстобитов О. Е. 214 (2)
Шрипасту К. Р. 52 (1)
Штильман Н. И. 101 (1)
Шуматова Е. Н. 343 (3)

Эмирбеков Э. З. 104 (1)
Этингоф Р. Н. 276 (3)

Юркина Н. А. 157 (2)

Ярошенко Н. А. 148 (2)

Майоров В. Н. 163 (2)
Маклецова М. Г. 314 (3)
Маликов У. М. 185 (2)
Малоз А. М. 341 (3)
Мамаджанян Л. З. 301 (3)
Манукян К. Л. 105 (1)
Мелешко В. Н. 117 (2)
Меликов Э. М. 100 (1)
Мережнинская Н. В. 365 (4)
Микеладзе Д. Г. 284 (3)
Мовсумов Г. Д. 100 (1)
Москвитина Т. А. 340 (3)
Мурти В. 52 (1)

Назарян К. Б. 410 (4)
Назарян О. А. 102 (1)
Налбандян Р. М. 388 (4)
Никитин В. П. 163 (2)
Николаншвили М. Н. 141 (2)
Новикова Н. А. 30 (1)

Образцова Н. Г. 343 (3)
Овсепян Л. М. 301 (3)
Оганесян В. С. 379 (4)
Окунь И. М. 365 (4)
Орлова Н. В. 101 (1)
Орлов С. Н. 365 (4)
Осталенко Н. А. 126 (2)
Отеллиа В. А. 98 (1)

Павлинова Л. И. 306 (3)
Папушева Н. Н. 268 (3)
Панченко Л. Ф. 231 (2)
Паронян Ж. А. 423 (4)
Парфенова Е. В. 351 (4)
Пархомец П. К. 373 (4)
Позднеев В. Ф. 340 (3)
Полетаев А. Б. 245 (3)
Попова Г. М. 157 (2)
Пракаш Г. С. 52 (1)
Прасад М. С. К. 52 (1), 296 (3)
Прокопьева В. Д. 80 (1)
Промыслов М. Ш. 65 (1), 157 (2)

Разумовская Н. И. 3 (1)
Ракович А. А. 365 (4)
Рева А. Д. 117 (2)
Решин В. В. 402 (4)
Рожанская О. П. 373 (4)
Розенгарт В. Н. 214 (2)
Романенко А. В. 327 (3)
Ростомян М. А. 172 (2)
Рубинская Н. Л. 185 (2)

Савельева С. Н. 343 (3)
Садасивуду Б. 52 (1), 296 (3)
Садыков А. А. 260 (3)
Садыков А. С. 181 (2)
Самвелян В. М. 301 (3)
Самовилова Н. Н. 48 (1)
Самойлов М. О. 163 (2)
Свами М. 296 (3)
Семенова Т. П. 97 (1), 427 (4)
Семенова Т. С. 343 (3)
Симомян А. А. 419 (4)
Симомян Р. А. 419 (4)
Страдомский Б. В. 35 (1)
Субраманиям К. 52 (1)
Суворов С. А. 190 (2)
Суджян Ц. М. 43 (1)
Сытинский Н. А. 310 (3)

Таканаев А. А. 181 (2)
Теннов А. В. 48 (1)
Тонких А. К. (2), 181 (2), 260 (3)
Туровский В. С. 339 (3)
Тюленев В. И. 23 (1)
Тюлькова Е. И. 306 (3)

Федоренко Г. М. 134 (2)
Флеров М. А. 393 (4)
Фураев В. В. 190 (2)

Халмурадов А. Г. 373 (4)
Ханбабян М. В. 102 (1)
Хватова Е. М. 30 (1), 343 (3)
Хованских А. Е. 340 (3)
Ходакова А. А. 134 (2)

Цветненко Е. З. 61 (1)

Чернышевская И. А. 103 (1)
Чичковская Г. В. 373 (4)

Шарова Н. П. 56 (1)
Шерстнев В. В. 163 (2)
Шерстобитов О. Е. 214 (2)
Шривасту К. Р. 52 (1)
Штильман И. Н. 101 (1)
Шуматова Е. И. 343 (3)

Эмирбеков Э. З. 104 (1)
Эттингер Р. Н. 276 (3)

Юркина Н. А. 157 (2)
Ярошенко Н. А. 148 (2)