

том 5, № 1, 1986

ISSN 0203-493X

НЕЙРОХИМИЯ

ՆԵՅՐՈՔԻՄԻԱ



АКАДЕМИЯ НАУК СССР
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

НЕЙРОХИМИЯ ՆԵՅՐՈՔԻՄԻԱ

ТОМ 5, ВЫП. 1.
Январь—март

Журнал основан в 1982 году
Выходит 4 раза в год

ИЗДАТЕЛЬСТВО АН АРМЯНСКОЙ ССР
ЕРЕВАН 1986

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, А. А. КРИ-
ЧЕВСКАЯ, Р. М. НАЛБАНДЯН, М. Ш. ПРОМЫСЛОВ, В. И. РОЗЕН-
ГАРТ, 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 OPA Ltd.

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

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

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



УДК 612.8.015

ИЗМЕНЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ
СИНАПТИЧЕСКИХ МЕМБРАН ПОД ДЕЙСТВИЕМ
ФОСФОЛИПАЗ A_2 , C и D

*БРУСОВАНИК В. И., ***ЕРИН А. Н., *СЕЛИЩЕВА А. А.

ГОРБУНОВ Н. В., **ТЮРИН В. А., *ПРИЛИПКО Л. Л., *КАГАН В. Е.

*Биологический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова, **Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова АН СССР, Ленинград, ***Всероссийский центр психического здоровья АМН СССР, Москва

Методом флуоресцентного и спинного зондирования показано изменение физико-химических параметров мембран синапсом из мозга крыс под действием различных фосфолипаз. Установлено, что обработка фосфолипазами A_2 , C и D приводит к деполяризации мембран синапсом и увеличению их отрицательного поверхностного потенциала. Действие фосфолипаз A_2 и C вызывает снижение микровязкости липидного бислоя синаптических мембран. Обнаруженные изменения физико-химических характеристик синаптических мембран под действием фосфолипаз рассматриваются с точки зрения возможной регуляторной роли фосфолипидов и продуктов их метаболизма в трансмембранной передаче химических сигналов.

В настоящее время установлено, что фосфолипазы играют важную роль в функционировании синаптических мембран [1]. В частности, постулировано, что активация фосфолипазы A_2 является одним из ключевых звеньев трансмембранной передачи химических сигналов [2, 3]. Фосфолипаза C принимает участие в метаболизме фосфатидилинозитидов, сопряженном с регуляцией тока Ca^{2+} внутрь нервной клетки [4]. Наконец, фосфолипаза D участвует в метаболизме церамидов—важных компонентов липидов мозга [5]. В определенных условиях активация фосфолипаз является функционально необходимым звеном и обеспечивает не только протекание необходимых метаболических процессов, но и модификацию структурной организации липидного бислоя мембран нервных окончаний.

Уже не приходится сомневаться, что липидный бислой, наряду с белковыми компонентами, определяет структурно-функциональную организацию биологических мембран в целом и, в частности, мембран нервных окончаний [1]. поэтому модификация липидного бислоя под действием фосфолипаз может приводить к существенным изменениям

структурно-функциональной организации нервных окончаний. В то же время действие фосфолипаз на физико-химические характеристики синаптических мембран практически не изучено.

Настоящая работа посвящена исследованию изменений трансмембранного потенциала (ТМП), поверхностного потенциала и микровязкости липидного бислоя мембран синапсом под действием фосфолипаз A_2 , C и D .

Материалы и методы

Синапсомы из серого вещества мозга крыс линии Wistar получали по методу Hajos [6]. Концентрацию белка определяли как описано в работе Markwell и соавт. [7]. Липиды из мембран синапсом экстрагировали по методу Folch и соавт. [8]. Разделение фосфолипидных классов проводили с помощью двумерной тонкослойной хроматографии в микроварианте [9]. Липидный фосфор определяли методом Vaskovsky и соавт. [10]. О микровязкости липидного бислоя мембран синапсом судили по времени вращательной корреляции τ_c спинного зонда—спин-меченного эфира стеариновой кислоты (ЭСК)* [11]. Изменения трансмембранного потенциала (ТМП) синапсом регистрировали с помощью флуоресцентного зонда 3,3-дипропил-2, 2-тиокарбоната: $diS-C_3-(5)**$ [12], а поверхностного—с помощью флуоресцентного зонда 1-анилинонафталин-8-сульфоната (АНС) [13]. Зонды $diS-C_3(5)$, АНС и ЭСК в суспензию синапсом вводили в этанольном растворе за 3-5 мин до измерений. Флуориметрические измерения проводили на спектрофлуориметре Hitachi-850 (Япония) в термостатируемой кювете при $37 \pm 1^\circ$. Спектральная ширина излучения возбуждающего и регистрируемого света составляла 5 нм. ЭПР спектры регистрировали на малогабаритном ЭПР-спектрометре в капиллярах диаметром 1 мм.

Обработку мембран синапсом фосфолипазами проводили в средах слетущего состава (в мМ): среда 1—HEPES—20, NaCl—145, KCl—5, $NaHCO_3$ —5, $MgCl_2$ —1,3, глюкозы—10; среда 2 отличалась от среды 1 тем, что содержала 5 мМ NaCl и 145 мМ KCl. Величина ТМП мембран синапсом в средах 1 и 2 равна соответственно 70—80 и 0 мВ [14]. Гидролиз фосфолипидов фосфолипазами проводили в присутствии экзогенного Ca^{2+} . В случае фосфолипаз A_2 и C реакцию останавливали добавлением 5 мМ ЭДТА, а в случае фосфолипазы D —добавлением 5-кратного объема смеси хлороформ-метанол (2:1 по объему). О степени гидролиза судили по накоплению лизофосфолипидов, фосфатидной кислоты и водорастворимого фосфора как продуктов гидролиза в случае фосфолипаз A_2 , D и C соответственно.

В работе использовали фосфолипазы A_2 и C («Boehringer», ФРГ), олеиновую кислоту, HEPES и сахарозу («Serva», ФРГ), АНС («Sigma», США), фосфатидную кислоту («Koch-Light», Англия), $diS-C_3-(5)$ (США), фосфолипазу $D***$. Остальные реактивы—отечественного производства квалификации не ниже «хч».

Результаты и обсуждение

Известно, что синапсомы, выделенные из нервной ткани, сохраняют электрические, осмотические и рецепторные свойства интактных нервных окончаний [15] и способны при деполяризации мембран секретировать медиатор. В настоящей работе исследовали действие различных фосфолипаз на изменение таких физико-химических пара-

Препараты для проведения исследований были любезно предоставлены:

* ЭСК—В. И. Швецом (МИТХТ им. М. В. Ломоносова);

** $diS-C_3-(5)$ —Е. В. Никушкиным (Институт общей патологии и патофизиологии, АМН СССР);

*** фосфолипаза D —В. И. Кулеце (Институт прикладной энзимологии, Вильнюс).

метров синапсом, как ТМП, поверхностный потенциал и микровязкость липидного бислоя. При выборе исследуемых физико-химических параметров руководствовались следующими соображениями: ТМП определяет каналную проводимость синаптических мембран и обеспечивает проведение возбуждения по первому окончанию, регулируя секрецию медиатора в синаптическую щель. Поверхностный потенциал участвует в обеспечении регуляции воротных механизмов транспорта ионов. Микровязкость липидного бислоя определяет, по-видимому, подвижность мембранных рецепторов и поэтому может сказываться на процессе взаимодействия лигандов с рецепторами.

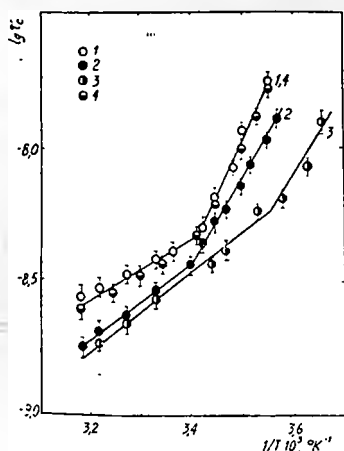


Рис. 1.

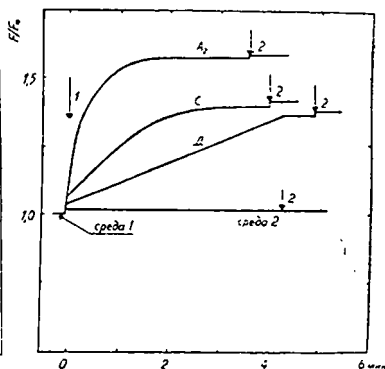


Рис. 2.

Рис. 1. Температурная зависимость в координатах Арренюса подвижности зонда ЭСК ($2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) в мембранах синапсом (30 мкг белка/мл) (1) и в мембранах синапсом, обработанных фосфолипазой A_2 (2), фосфолипазой C (3) и фосфолипазой D (4). Объем образца—30 мкл, степень обработки фосфолипазами составляет 20—25% гидролизованных фосфолипидов

Рис. 2. Кинетика изменения флуоресценции diS-C_3 (5) (10^{-7} M), введенного в суспензию синапсом (300 мкг белка/мл) в средах 1 и 2 под действием фосфолипазы A_2 (10 мкг/мл), фосфолипазы C (1 мкг/мл) и фосфолипазы D (0,1 мкг/мл). Среда инкубации содержит 1 мМ CaCl_2 . Длина волны возбуждения—650 нм, длина волны флуоресценции—638 нм. Стрелками указаны моменты введения фосфолипаз (1) и валиномицина (2). По оси ординат F/F_0 —отношение интенсивности флуоресценции зонда в суспензии синапсом при соответствующих добавках к интенсивности его флуоресценции без каких-либо воздействий

Таким образом, ясно, что выбранные для исследования физико-химические характеристики определяют эффективность трансмембранной передачи химического сигнала и синаптической передачи в целом.

Влияние фосфолипаз A_2 , C и D на микровязкость мембран синапсом. В качестве зонда, чувствительного к микровязкости синап-

тических мембран, использовали спин-меченый ЭСК. Поскольку нитроксильный радикал ЭСК ковалентно связан с 7-м атомом жирнокислотной цепи, он локализован непосредственно в гидрофобной области липидного бислоя, и время вращательной корреляции τ_c ЭСК отражает микровязкость липидного бислоя мембран синапсом [11]. Как видно из данных, представленных на рис. 1, обработка синапсом фосфолипазами A_2 , C и D влияет на микровязкость мембран различным образом: фосфолипазы A_2 и C снижают время вращательной корреляции τ_c ЭСК во всем исследуемом интервале температур (от 0 до 40°). В то же время фосфолипаза D практически не меняет время вращательной корреляции. Представленные данные позволяют сделать заключение о том, что действие фосфолипаз A_2 и C вызывает снижение микровязкости фосфолипидного бислоя синапсом, а действие фосфолипазы D не сказывается на микровязкости. Аналогичные результаты—снижение микровязкости мембран синапсом под действием фосфолипазы A_2 —наблюдали и ранее при измерении поляризации флуоресценции 1,6-дифенил-1,3,5-гексатриена. При этом было установлено, что снижение микровязкости вызвано, в основном, образованием свободных жирных кислот, а не лизофосфолипидов [16]. Последний факт находится в хорошем соответствии с многочисленными данными о том, что свободные жирные кислоты вызывают снижение микровязкости различных модельных и природных мембран [17]. Снижение микровязкости мембран синапсом под действием фосфолипазы C может быть, по-видимому, следствием формирования внутримембранных частиц в результате образования диацилглицерина [18]. С другой стороны, хотя под действием фосфолипазы D образуется фосфатидная кислота, также обладающая модифицирующим действием на фосфолипидный бислой [19], в мембранах синапсом не удастся зарегистрировать изменение микровязкости методом спинного зондирования.

Влияние фосфолипаз A_2 , C и D на ТМП синапсом. Изменение ТМП синапсом оценивали с помощью флуоресцентного зонда diS-C₃-(5) [12]. На рис. 2 представлены изменения ТМП синапсом во времени после добавления фосфолипаз A_2 , C и D . В среде 1 обработка синапсом фосфолипазами приводит к увеличению флуоресценции зонда diS-C₃-(5), связанного с мембранами, что может соответствовать деполяризации мембран синапсом. В среде 2 указанные фосфолипазы не изменяют ТМП синапсом. Это закономерно, поскольку ТМП в среде 2 равен нулю, и обработка фосфолипазами не может сопровождаться перераспределением ионов, то есть изменением ТМП.

Естественно предположить, что наблюдаемые изменения ТМП синапсом под действием фосфолипаз вызваны образованием продуктов гидролиза фосфолипидов. Действительно, как следует из рис. 3, введение олеиновой и фосфатидной кислот приводит к деполяризации мембран синапсом, в то время как введение лизофосфатидилхолина

и лизофосфатидилэтаноламина в концентрации 50 мкМ не изменяет ТМП. Действие продуктов гидролиза фосфолипазой *C* не удалось промоделировать введением диацилглицерина в связи с тем, что это соединение не растворимо в этаноле.

Полученные данные позволяют сделать заключение, что обработка синапсом различными фосфолипазами приводит к деполаризации мембран синапсом, обусловленной, по-видимому, изменением пассивной проницаемости мембран для K^+ . В пользу этого предпо-

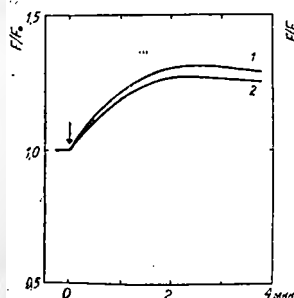


Рис. 3.

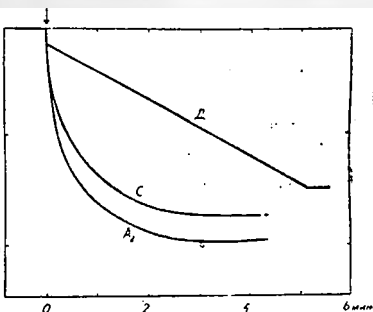


Рис. 4.

Рис. 3. Кинетика изменения флуоресценции diS-C₃-(5) в суспензии синапсом (300 мкг белка/мл) в среде 1 при введении олеиновой (0,1 мМ) (1) и фосфатидной кислот (0,05 мМ) (2). Обозначения те же, что и на рис. 2
Рис. 4. Кинетика изменения флуоресценции АНС (10⁻⁷М) в суспензии синапсом (100 мкг белка/мл) в среде 1 под действием фосфолипазы А₂, фосфолипазы *C* и фосфолипазы *D*. Концентрации фосфолипаз те же, что и на рис. 2. Длина волны возбуждения—360 нм, длина волны флуоресценции—430 нм. Обозначения те же, что и на рис. 2

ложения говорит тот факт, что при добавлении валиномицина (10⁻²М) к синапсомам, обработанным фосфолипазами, не наблюдалось изменений флуоресценции diS-C₃-(5) (рис. 2). В то же время гидролиз фосфолипидов мембран синапсом фосфолипазами не приводит к нарушению целостности мембран. Это заключение сделано на основании того, что обработанные фосфолипазами синапсомы не способны к ферментативному окислению экзогенного пирувата лактатдегидрогеназой синапсомом, содержащейся в цитозоле (графические данные не приводятся). В то же время, судя по нашим данным, ультразвуковая обработка или добавление 0,1%-ного тритона X-100 приводит к резкому увеличению скорости окисления экзогенного пирувата.

Влияние фосфолипаз А₂, C и D на поверхностный потенциал синапсомом. В качестве зонда, чувствительного к поверхностному потенциалу, использовали отрицательно заряженный флуоресцентный зонд АНС. При работе с этим зондом часто возникают определенные методические трудности, вызванные различной проникающей способностью зонда в различных модельных и биологических мембранах. В случае

мембран синапсом АНС тем не менее может быть использован как зонд, чувствительный к поверхностному потенциалу, поскольку АНС не проникает через мембрану синапсом [20].

Обработка фосфолипазами A_2 , C и D вызывает существенное снижение флуоресценции АНС, добавленного к суспензии синапсом как в среде 1, так и в среде 2 (рис. 4). Поскольку в обеих средах в отсутствие синапсом не наблюдается флуоресценции АНС, все регистрируемые изменения флуоресценции отражают флуоресценцию зонда, связанного с мембранами. Этот факт, а также практически полное совпадение изменений флуоресценции АНС в средах 1 и 2 позволяет заключить, что наблюдаемое снижение флуоресценции АНС при обработке синапсом фосфолипазами A_2 , C и D отражает увеличение отрицательного поверхностного потенциала мембран синапсом. Такое изменение поверхностного потенциала при действии фосфолипазы A_2 вполне понятно, если учесть, что образующиеся при гидролизе фосфолипидов свободные жирные кислоты несут в полярной части отрицательный заряд. При действии фосфолипазы C из мембран удаляется полярная группа, локальный положительный заряд которой является, по-видимому, местом адсорбции АНС. Наконец, при гидролизе фосфолипидов фосфолипазой D образуется фосфатидная кислота, несущая отрицательный заряд.

Приведенные результаты позволяют сделать заключение о том, что действие фосфолипаз на мембраны синапсом сопровождается существенными изменениями их физико-химических характеристик. Необходимо отметить, что степень обработки фосфолипазами в наших экспериментах существенно превышает интенсивность протекания реакций гидролиза фосфолипидов под действием фосфолипаз *in vivo*. Это вызвано тем, что чувствительность современных физико-химических методов не позволяет исследовать менее интенсивные воздействия. В то же время, по-видимому, в отдельных кластерах фосфолипидного бислоя синаптических мембран модификация липидов под действием фосфолипаз может быть столь же значительной. Следовательно, обнаруженные изменения физико-химических параметров синапсомных мембран могут сопровождать активацию фосфолипаз в таких процессах, как, например, секреция медиаторов, в котором принимает участие эндогенная фосфолипаза A_2 [20]. Аналогичные изменения могут происходить при активации фосфолипазы C , запускающей метаболизм фосфоинозитидов, сопряженный с током Ca^{2+} [21].

Изменение ТМП, поверхностного потенциала и микровязкости липидного бислоя синаптических мембран должно приводить к модификации таких функционально важных процессов, как транспорт Ca^{2+} , подвижность мембранных рецепторов, непосредственно не связанных с аденилатциклазой, то есть влиять на весь каскадный механизм передачи сигнала через мембрану внутрь клетки. Поэтому совокупность полученных данных можно рассматривать как еще одно до-

казательство того, что наряду с ролью структурного матрикса липиды могут играть также регуляторную роль в функционировании мембран нервных окончаний.

EFFECT OF PHOSPHOLIPASES A_2 , C AND D ON THE PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERISTICS OF SYNAPTIC MEMBRANES

*BRUSOVANIK V. Y., ***ERIN A. N., *SELISHEVA A. A., **GORBUNOV N. V.,
TYURIN V. A., *PRILIPKO L. L., *KAGAN V. E.

*Department of Biology, Moscow State University; **Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, USSR Academy of Sciences, Leningrad;

***All-Union Center of Psychic Health, USSR Academy of Medical Sciences, Moscow

Phospholipases alter physico-chemical characteristics of rat brain synaptosomal membranes (fluorescent and spin probe data). Treatment with phospholipases A_2 , C and D leads to depolarization of synaptosomal membranes and to increase of negative surface potential of the membrane. Phospholipases A_2 and C decrease the microviscosity of synaptic membranes lipid bilayer. Data obtained are discussed in the view of the possible regulatory role of phospholipides and products of their metabolism in the transmission of chemical signals through membrane.

ЛИТЕРАТУРА

1. Креч Е. М. Липиды биологических мембран, Л., Наука, 1981.
2. Hirata F., Axelrod J. Science, v. 209, № 5, p. 1082—1090, 1980.
3. Leprohon C. E., Blusztaji J. H., Wurtman R. J. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, v. 80, № 7, p. 2063—2066, 1983.
4. Michell R. H. Biochim. et biophys. acta, v. 415, № 1, p. 81—147, 1975.
5. Брокенхоф Х., Дженсен Д., Липолитические ферменты, М., 1978.
6. Hajos F. Brain Res., v. 93, № 3, p. 485—489, 1975.
7. Markwell M. A., Haas S. M., Bieber L. L., Tolbert N. E. Anal. Biochem., v. 87, № 1, p. 206—210, 1978.
8. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. J. Biol. Chem., v. 226, № 2, p. 497—509, 1957.
9. Vaskovsky V., Lutyshov N. J. Chromatogr., v. 115, № 1, p. 246—249, 1975.
10. Vaskovsky V., Kostetsky E. Ja., Vasendin I. V. J. Chromatogr., v. 114, № 1, p. 129—141, 1975.
11. Pontus M., Delmelle M. Experientia, v. 31, № 7, p. 799—801, 1975.
12. Ерин А. Н., Тюрин В. А., Брусованик В. И., Горбунов Н. В., Селищева А. А. Прилипко Л. Л., Коган В. Е. Биохимия, т. 50, № 3, с. 507—513, 1985.
13. Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран, М., Наука, 1980.
14. Никушкин Е. В., Крыжановский Г. Н., Глебов Р. Н., Малолетнева О. Ю., Каплун А. П., Майсов Н. И., Ганкина Е. М., Сюткин Е. А., Бюлл. эксперим. биол. и мед., т. 96, № 9, с. 51—55, 1983.
15. Глебов Р. Н., Крыжановский Г. Н. Функциональная биохимия синапсов, М., Медицина, 1978.

16. Прилипко Л. Л., Казан В. Е., Тюрин В. А., Горбунов Н. В., Богданова Е. Д. Докл. АН СССР, т. 269, № 5, с. 1260—1263, 1983.
17. Karnovsky M. J., Kleinfeld A. M., Hoover R. L., Klauser R. D. J. Cell. Biol., v. 24, № 1, p. 1—6, 1982.
18. Сорокоумова Г. М., Василенко И. А., Швец В. Н., Селищева А. А., Боровагин В. Л. Биоорг. химия, т. 9, № 8, с. 1106—1112, 1983.
19. Farrén S. B., Hope M. J., Cullis P. K. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 111, № 3, p. 675—679, 1983.
20. Bradford H. F., Marinetti G. V., Abood L. G. J. Neurochem., v. 41, № 6, p. 1684—1689, 1983.
21. Michell R. H., Kirk C. J. Trends Pharmacol. Sci., v. 2, № 1, p. 86—88, 1981.

Поступила 19. IX 1985



УДК 543.8.612.822.1.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРЕПАРАТОВ ЛИОФИЛИЗОВАННЫХ МЕМБРАН ДЛЯ РАДИОРЕЦЕПТОРНОГО АНАЛИЗА ОПИАТОВ И ОПИОИДНЫХ ПЕПТИДОВ

СЕРГЕЕВА М. Г., КУРОЧКИН И. Н., СКЛЯНКИНА О. А., ЗАЙЦЕВ С. В.,
ВАРФОЛОМЕЕВ С. Д.

Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория молекулярной биологии и биорганической химии им. А. Н. Белозерского, МГУ, Москва

Исследовано влияние условий лиофилизации мембранных препаратов головного мозга крыс на свойства опиатных рецепторов. Найден способ восстановления свойств опиатных рецепторов, изменяющихся при лиофилизации в обычных условиях до уровня свойств рецепторов свежeweделенных мембран. Определены условия приготовления лиофилизированных препаратов с неизменными по сравнению со свежeweделенными мембранами характеристиками. Рассматриваются пути оптимизации радиорецепторного анализа опиатов и опиоидных пептидов с применением лиофилизированных мембран: выбор среды изучения связывания (использование ионов, селективно влияющих на связывание лигандов с различными опиатными рецепторами), подбор концентрации меченого лиганда.

В исследовании свойств опиатов, выделении новых опиоидных пептидов, скрининге синтезированных на их основе препаратов важную роль играет радиорецепторный анализ [1—3]. Этот метод основан на использовании препаратов свежeweделенных или замороженных мембран головного мозга животных, содержащих опиатные рецепторы. Существенным недостатком метода является низкая стабильность и нестандартность препаратов мембран [4]. Нами было показано, что лиофилизация мембран головного мозга крыс позволяет получать препараты, сохраняющие высокую способность к специфическому связыванию лигандов опиатных рецепторов и обладающие высокой стабильностью [4, 5]. Однако проведенные ранее исследования показали, что в процессе получения лиофилизированных мембранных препаратов мембраны претерпевают некоторые изменения, что приводит, в частности, к уменьшению сродства лигандов к их высокоаффинным рецепторам [4]. В настоящей работе исследуется влияние условий лиофилизации мембран на свойства опиатных рецепторов, рассматриваются пути оптимизации радиорецепторного анализа опиатов и опиоидных пептидов с применением лиофилизированных мембран.

Материалы и методы

Получение препарата мембран клеток головного мозга крыс проводили методом, описанным ранее [4]: мозг без мозжечка гомогенизировали в 50 мМ трис-НСl-буфере («Merck», ФРГ), pH 7,4 при 4° из расчета 80 мл буфера на 1 мозг в гомогенизаторе типа стекло-тефлон. Полученную суспензию центрифугировали при 20000 g в течение 20 мин при 4°. Надосадочную жидкость удаляли, а осадок ресуспендировали в буфере А, близком по составу к физиологической среде, содержащей 120 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂, 0,5 мМ NaH₂PO₄, 5 мМ HEPES («Sigma», США), pH 7,4 при 37°, и выдерживали 30 мин при 37°. Суспензию вновь центрифугировали при 20000 g в течение 20 мин. Осадок ресуспендировали в буфере А (свежевыделенный препарат мембран). Для получения препарата лиофилизированных мембран осадок ресуспендировали в требуемом объеме бидистиллированной воды (25—30 мл на 1 мозг). Полученную суспензию мембран помещали в круглодонные колбы емкостью 1 л так, чтобы объем суспензии не превышал 1/20 части объема колбы. Колбы с суспензией мембран быстро замораживали в жидком азоте и помещали на лиофильную установку HETO CD-52 (вакуум 10⁻³ мм рт. ст.). Процесс лиофилизации продолжался 10-12 ч. Непосредственно перед экспериментом лиофилизированные мембраны суспендировали в требуемом объеме среды инкубации. При исследовании влияния среды, в которой происходит лиофилизация на свойства получаемых мембран, осадок после второго центрифугирования ресуспендировали в следующих средах: 0,2 М сахарозе, аммонийбикарбонатном буфере—10 мМ NH₄HCO₃, pH 7,4, буфере А и воде. Далее препарат лиофилизированных мембран получали и исследовали обычным способом.

Равновесное связывание меченых соединений с препаратами мембран мозга изучали при 37° в буфере А или в «безнатриевой» среде, получающейся из буфера А при замене в нем 120 мМ NaCl на 120 мМ KCl. Реакционная смесь содержала 60 мкл суспензии препарата мембран, 50 мкл 1,4—2800 нМ ³H-морфина, 0,8—2800 нМ ³H-D-Ala²-D-Leu⁵-энкефалина, 50 мкл раствора немеченого лиганда или буферного раствора. Время инкубации лиганда с препаратом мембран составляло 30 мин. Разделение связанного и свободного лиганда проводили методом вакуумного фильтрования через фильтры фирмы «Whatman GF/B» [4]. Для этого реакционную смесь разбавляли 3 мл холодной среды инкубации и полученную суспензию переносили на фильтры. Фильтр трижды промывали 3 мл холодной среды инкубации. Количество связанного лиганда определяли по уровню радиоактивности фильтров, используя толуол-феноксольный сцинтиллятор [4]. За величину специфического связывания принимали разницу между уровнем связывания в отсутствие и в присутствии 1 мМ немеченого лиганда.

Определение содержания опиадных лигандов в крови собаки проводили следующим способом. Кровь собирали в гепаринизированные пробирки и центрифугировали. 100 мкл полученной плазмы добавляли к 500 мкл препарата лиофилизированных мембран (концентрация белка 1,2 мг/мл), ресуспендированных в буфере 10 мМ HEPES (N-2-оксэтилпиперазин-N-этансульфоновая кислота) pH 7,4 при 25° и добавляли 50 мкл 7 нМ ³H-налоксона и 50 мкл морфина (концентрация 0—1,4 · 10⁻⁵М). Смесь инкубировали 30 мин при 25° и изучали равновесное связывание обычным способом.

В работе использовали меченые лиганды ³H-налоксон с У. А. 59 Ки/ммоль и ³H-D-Ala²-D-Leu⁵-энкефалин с У. А. 22 Ки/ммоль («Amersham», Англия).

Чистоту меченных тритием соединений проверяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Обработку экспериментальных данных проводили с использованием ЭВМ РДР 1:45 по разработанной нами программе [6] в соответствии с моделями комплексобразования лигандов с одним или двумя независимыми типами центров связывания.

Результаты и обсуждение

Влияние условий лиофилизации на свойства мембран. При изучении влияния состава среды лиофилизации на способность лиофилизированных мембран специфически связывать лиганды одинаковое количество свежевыделенного препарата мембран суспендировали в сахарозе, аммонийбикарбонатном буфере, буфере А или воде, замораживали в жидком азоте и лиофилизовали. Полученные лиофилизированные

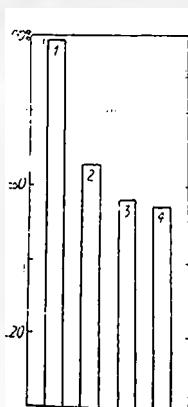


Рис. 1.

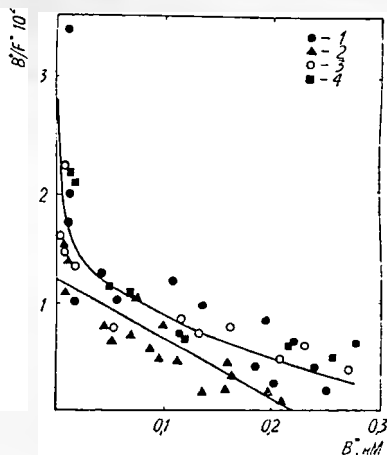


Рис. 2.

Рис. 1. Влияние состава среды лиофилизации на связывание 0.12 нМ $^3\text{H-D-Ala}^2\text{-D-Leu}^5$ -энкефалина с лиофилизированными мембранами головного мозга крыс (в %). Концентрация белка 2 мг/мл. 1—свежевыделенные мембраны, 2—лиофилизированные в воде, 3—лиофилизированные в аммоний-карбонатном буфере, 4—лиофилизированные в сахарозе

Рис. 2. Влияние инкубации ресуспендированного препарата лиофилизированных мембран (концентрация белка 1.8 мг/мл) при 0° на специфическое связывание $^3\text{H-D-Ala}^2\text{-D-Leu}^5$ -энкефалина. 1—свежевыделенные мембраны, 2—4—лиофилизированные мембраны после 0-часовой, 3-часовой, 7-часовой инкубации соответственно (данные представлены в координатах Скэтчарда: по оси абсцисс—концентрация специфически связанного с мембранами лиганда, по оси ординат—отношение этой концентрации к концентрации лиганда в растворе)

ные препараты ресуспендировали в стандартной среде (буфер А) и изучали способность к связыванию пептида. При лиофилизации в буфере А получались трудно ресуспендируемые хлопья, что исключало возможность стандартизации процесса связывания лиганда и использования буфера А в качестве среды лиофилизации. Данные, полученные с другими средами, представлены на рис. 1, из которого видно, что вне зависимости от состава среды лиофилизации специфическое связывание мембран с $^3\text{H-D-Ala}^2\text{-D-Leu}^5$ -энкефалином снижается во всех случаях в 1.5—2 раза по сравнению со свежевыделенным пре-

паратом мембран. Это позволяет сделать вывод о том, что лиофилизация мембран в растворе сахарозы и аммоний-бикарбонатном буфере не имеет преимуществ перед лиофилизацией их в воде.

Для выяснения обратимости изменения опийной активности при лиофилизации изучено влияние инкубации ресуспендированного лиофилизованного препарата мембран на специфическое связывание опийных лигандов. Данные по влиянию инкубации суспензии лиофилизированных мембран головного мозга крыс в буфере А. при 0° на связывание D-Ala²-D-Leu⁵-энкефалина приведены на рис. 2. Установ-

Таблица 1

Влияние длительности инкубации препарата мембран (1,2 мг белка/мл) на параметры связывания 3H-морфина в буфере А.

Препараты	K ₁ , нМ	R ₁₀ пмоль/ мг белка	K ₂ , нМ	R ₂₀ пмоль/ мг белка
Свежевыделенные мембраны	4,1±1,4	0,09±0,01	122±31	0,25±31
Препарат лиофилизированных мембран инкубированный в воде не более 1 мин	5,0±1,0	0,08±0,01	100±28	0,23±0,06
Препарат лиофилизированных мембран, инкубированный в воде 7 мин	—	—	44±15	0,22±0,08

Примечание. K₁, K₂—константы диссоциации высокоаффинного и низкоаффинного центров связывания лиганда, R₁₀, R₂₀—концентрации центров

лено, что специфическое связывание энкефалина лиофилизированными мембранами становилось через 3 ч таким же, как и специфическое связывание свежевыделенных препаратов мембран. Аналогично энкефалину регенерация имеет место и в случае с морфином. Следует отметить, что дальнейшая инкубация лиофилизованного препарата мембран после регенерации 4—7 ч не приводила к существенным изменениям параметров специфического связывания. Такая же стабильность описана и для инкубации в тех же условиях свежевыделенных препаратов мембран [4]. Таким образом, полученные результаты показывают, что изменения опийной активности у лиофилизированных препаратов мембран обратимы и измененные мембраны могут быть регенерированы.

Чтобы выяснить, с каким из этапов процесса получения лиофилизованного препарата связаны наблюдаемые изменения опийной активности мембран, исследовано влияние продолжительности инкубации препарата мембран в воде перед лиофилизацией на свойства опийных рецепторов. Соответствующие результаты, приведенные в табл. 1, показывают, что свойства лиофилизированных мембранных препаратов зависят от длительности инкубации их в воде предшествующей лиофилизации. В то время как инкубация в воде не более 1 мин позволяла получать неизмененные лиофилизированные препараты, продол-

жительное выдерживание мембран в воде (7 мин) приводило к изменению их характеристик. Следовательно, наблюдаемые в процессе получения лиофилизованного препарата изменения опийной активности мембран связаны не с замораживанием и обезвоживанием препарата, а с инкубацией мембран в воде.

Таким образом, проводя процесс суспендирования мембран в воде и замораживания в течение 1 мин можно получить лиофилизованные мембраны с неизмененными характеристиками. К сожалению, далеко не всегда удается провести этот процесс за столь короткие сроки, особенно при выделении больших порций мембран. В этом случае при необходимости можно проводить регенерацию полученного мембранного препарата.

Получение лиофилизованного препарата мембран, содержащих опийные рецепторы с неизмененными характеристиками связывания, открывает широкие возможности в использовании радиорецепторно-

Таблица 2

Характеристики связывания опийных лигандов с лиофилизованными мембранами (1,2 мг белка/мл) в безнатриевой среде (радиорецепторный анализ)

Параметры	D-Ala ² -D-Leu ⁵ -энкефалин		Морфин		Налоксон	
	регенерированные мембраны	нерегенерированные мембраны	регенерированные мембраны	нерегенерированные мембраны	регенерированные мембраны	нерегенерированные мембраны
K _D , нМ	2,5	—	1,7	—	0,7	1
R ₁₀ , нМ	0,1	—	0,08	—	0,07	0,1
K ₂ , нМ	30	10	62	12	17	18
R ₂₀ , нМ	0,2	0,2	0,23	0,25	0,3	0,3
Константа неспецифического связывания	0,004	0,005	0,007	0,006	0,006	0,007
Минимально определяемая концентрация лиганда (чувствительность L _{мин}), нМ	0,35	1,5	0,25	1,7	0,11	0,15
Максимально определяемая концентрация L _{макс} , нМ	674	320	240	680	1050	540
Точность при L=K _D (%)	19	21	20	18	23	16

Примечание. 120 мМ KCl, 1 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂, 0,5 мМ NaH₂PO₄, 5 мМ HEPES (pH 7,4; 37°). Расчеты проводились по формулам, предложенным в работе [7] исходя из того, что для определения концентрации меченого лиганда может быть использован меченый лиганд той же структуры; относительная ошибка определения концентрации связанного лиганда—7%.

го метода анализа для определения опиатов и опиоидных пептидов. В табл. 2 приведены характеристики радиорецепторного анализа, полученные для налоксона, морфина и энкефалина, указывающие на

то, что количественное определение опионных пептидов и опиатов радиорецепторным методом с использованием препарата лиофилизированных мембран позволяет с наибольшей точностью определять наномольные концентрации исследуемых лигандов.

При проведении радиорецепторного анализа важную роль играет среда, в которой он проводится. В табл. 3 представлены данные по влиянию Na^+ , Mn^{2+} и Ni^{2+} на чувствительность определения морфина, энкефалина и налоксона радиорецепторным методом. Используемые ионы, изменяя сродство опиатных лигандов к рецепторам, влияют и на чувствительность анализа, причем их эффект зависит от типа определяемого лиганда. Так, например, в присутствии Na^+ чувствительность определения μ -агониста морфина уменьшилась в 2,8 раза, δ -агониста D-Ala²-D-Leu⁵-энкефалина—в 1,6 раза, в то время как чувствительность определения антагониста налоксона возросла в 1,4 раза. В свою очередь, добавление в среду 1 мМ Mn^{2+} или 25 мкМ Ni^{2+} приводило к более чем 2-кратному увеличению чувствительности определения μ -агониста морфина, не влияя на чувстви-

Таблица 3

Влияние ионов металлов на чувствительность радиорецепторного определения морфина, налоксона и D-Ala²-D-Leu⁵-энкефалина

Лиганд	Ионы	Параметры связывания лиганда					Чувствительность $\text{L}_{\text{мин}}$, пМ
		K_1 пМ	K_2 пМ	R_{10} пМ	R_{20} пМ	константа неспецифического связывания	
D-Ala ² -D-Leu ⁵ -энкефалин	—NaCl	2,5	30	0,1	0,2	0,004	0,35
	+NaCl	3,8	55	0,1	0,2	0,004	0,56
Морфин	+NaCl+1 мМ MnCl_2	3,2	16	0,1	0,2	0,004	0,57
	+NaCl+25 мкМ NiCl_2	3,1	15	0,1	0,2	0,004	0,56
	—NaCl	1,7	62	0,08	0,23	0,007	0,25
	+NaCl	5,0	100	0,08	0,23	0,007	0,70
	+NaCl+1 мМ MnCl_2	2,5	50	0,08	0,23	0,007	0,32
	+NaCl+25 мкМ NiCl_2	2,4	100	0,008	0,23	0,007	0,29
Налоксон	—NaCl	0,7	17	0,07	0,3	0,006	0,11
	+NaCl	0,5	20	0,07	0,3	0,006	0,08

Примечание. Рассчитано по Зайцеву и соавт. [7] исходя из того, что для измерения концентрации немеченого лиганда может быть использован меченый лиганд той же структуры; относительная ошибка определения концентрации связанного лиганда 7%; концентрация белка—1,2 мг/мл.

ность радиорецепторного определения энкефалина. Все это необходимо учитывать при выборе среды для анализа того или иного опиатного лиганда.

Чувствительность радиорецепторного анализа зависит не только от условий среды, но и концентрации меченого лиганда. На рис. 3 представлена зависимость чувствительности анализа (L мин) от величины отношения концентрации меченых $^3\text{H-D-Ala}^2\text{-D-Leu}^5\text{-энкефалина}$, палоксона, морфина (L^*) к константам связывания (K^*) этих лигандов с рецепторами лиофилизированных мембран. Чувствительность анализа повышалась с уменьшением L^* , имея максимальное значение при $L^* \ll K^*$, но практически уменьшение концентрации меченого лиганда имеет свои границы, что связано с увеличением времени счета радиоактивной метки при сохранении заданной точности счета. В табл. 4 представлена зависимость времени счета пробы от концентрации меченого лиганда. Из анализа таблицы видно, что выбор концентраций меньше 0,2 K^* не имеет практического смысла, так как резко увеличивается время, необходимое для просчета образца с требуемой точностью.

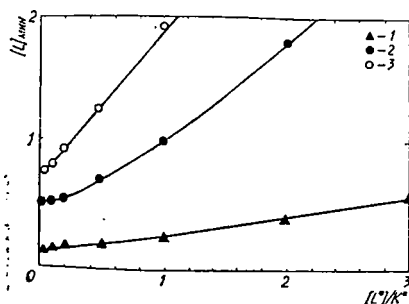


Рис. 3.

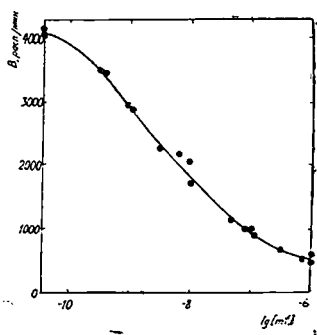


Рис. 4.

Рис. 3. Зависимость чувствительности радиорецепторного анализа от концентрации меченого лиганда. 1— ^3H -налоксон, 2— $^3\text{H-D-Ala}^2\text{-D-Leu}^5\text{-энкефалин}$, 3— ^3H -морфин

Рис. 4. Калибровочная кривая определения морфина (мг) в плазме крови собаки. Меченый лиганд— ^3H -налоксон (0,5 нМ)

Высокая стабильность и стандартность лиофилизованного препарата позволяет предложить метод радиорецепторного анализа с использованием лиофилизированных мембран для определения опиатов и опионидных пептидов в крови животных и человека [9], который позволяет определять наномолярные концентрации морфина. На рис. 4 приведена калибровочная кривая определения морфина в плазме крови собаки.

Таким образом, лиофилизированные мембраны могут быть с успехом применены для радиорецепторного анализа. Оптимальными условиями проведения анализа являются низкая концентрация мечено-

го лиганда ($0,2K^* < L^* \ll K^*$), использование безнатриевой среды для определения μ - и δ -агонистов среды, содержащей Na^+ для определения антагонистов, присутствие в среде анализа Mn^{2+} или Ni^{2+}

Таблица 4

Зависимость времени счета пробы от концентрации меченого лиганда

Удельная активность лиганда	Концентрация	Общее связывание			Неспецифическое связывание		
		имп/мин	время счета образца, мин	время счета фона, мин	имп/мин	время счета образца, мин	время счета фона, мин
22 Кп/ммоль	0,01 К	26,9	74	60	—	—	—
	0,05 К	135	4,8	2,0	27	74	60
	0,1 К	269	2,0	0,6	54	16	8
	0,2 К	538	0,9	—	108	6	2
	0,5 К	1342	0,3	—	269	1,8	0,6
59 Кп/ммоль	0,01 К	39	3,9	9	—	—	—
	0,05 К	78	7,8	3	16	250	200
	0,1 К	786	79	—	157	3,8	1
	0,2 К	1572	0,3	—	314	1,7	—
	0,5 К	3929	0,1	—	786	0,6	—

Примечание. Рассчитано по Donald и соавт. [8]. Условия эксперимента: связывается 5% от добавленной метки, неспецифическое связывание составляет 20% от общего (неспецифическое связывание определяется в присутствии 10^{-6} М немеченого лиганда); $K=5$ нМ (константа связывания меченого лиганда). Уровень радиоактивности посчитали с 5% ошибкой, эффективность счета 40%, фон уровня радиоактивности составляет 10 имп/мин

при определении μ -агонистов. Оптимальными условиями получения лиофилизированных препаратов мембран являются лиофилизация в воде, короткое время инкубации в воде перед лиофилизацией, регенерация мембран в буфере А при получении модифицированного препарата.

LYOPHILIZED MEMBRANES: USE FOR RADIORECEPTOR ASSAY OF OPIATES AND OPIOID PEPTIDES

SERGEEVA M. G., KUROCHKIN I. N., SKLYANKINA O. A.,
ZAITSEV S. V., VARFOLOMEEV S. D.

A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic Chemistry, Moscow State University, Moscow, USSR

The effect of lyophilization conditions of rat brain membrane preparations on the properties of opiate receptors has been studied. The procedure has been found to restore the opiate receptor properties, altered by lyophilization in routine conditions, to the state of freshly prepared membranes. The conditions have been developed to prepare lyophilized preparations with unaltered parameters compared to freshly prepared

red membranes. The ways of optimization of radioreceptor assay for opiate and opioid peptides based on lyophilized membranes are considered: the choice of ligand binding medium (use of ions selectively affecting the ligand binding to various opiate receptors) and the choice of the tracer concentration.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Zajac J. M., Gacel G., Petit F., Dodey P., Rossignol P., Roques B. P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 111, № 2, p. 390—397, 1983.
2. Simantov R., Kuhar M. Y., Pasternak G. W., Snyder S. H. *Brain Res.*, v. 106, № 1, p. 189—197, 1976.
3. Hammonds R. G., Nicolas P., Li C. H. *Int. J. Peptide and Protein Res.*, v. 19, № 2, p. 556—561, 1982.
4. Зайцев С. В., Курочкин И. Н., Сергеева М. Г., Варфоломеев С. Д. *Биохимия*, т. 49, № 7, с. 1127—1133, 1984.
5. Зайцев С. В., Курочкин И. Н., Сергеева М. Г., Молокозедов А. С., Титов М. Н., Варфоломеев С. Д. *Докл. АН СССР*, т. 272, № 4, с. 982—984, 1983.
6. Громов А. И., Курочкин И. Н., Зайцев С. В., Пороженко Н. В. Тезисы докл. IV Всесоюз. симпозиума «Инженерная энзимология», Киев, с. 93, М., Наука, 1983.
7. Зайцев С. В., Сергеева М. Г., Варфоломеев С. Д. *Биоорг. химия*, т. 11, № 3, с. 370—380, 1985.
8. Donald L. H. *Application of liquid scintillation counting*, p. 306—331, Academic Press, N. Y., 1974.
9. Сергеева М. Г. Тезисы IX Всесоюз. конф. по биохимии нервной системы, с. 85, Ереван, Изд. АН АрмССР, с. 85, 1983.

Поступила 4 IX. 1985-

ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ
СВОЙСТВА АМИНОТРИПЕПТИДАЗЫ МОЗГА КОШЕК

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

Кафедра биофизики и биохимии Днепрпетровского госуниверситета

Из головного мозга кошек выделена и очищена в 643 раза растворимая аминотрипептидаза (субстрат Leu-Gly-Gly). Фермент гомогенен при разделении в 7,5%-ном ПААГ. Величина M_r равна 70—72 кД, рН оптимум—7,6. Очищенный препарат фермента не гидролизует дипептиды, не действует на энкефалины. Активность фермента не зависит от ионов двухвалентных металлов, не чувствительна к ЭДТА, п-хлормеркурибензоат подавляет активность аминотрипептидазы.

В последнее время значительно возрос интерес к протеолитическим ферментам нервной ткани. Обусловлено это прежде всего тем, что ферменты протеолиза рассматриваются как важный фактор регуляции внутриклеточного метаболизма благодаря их участию в посттранскрипционной модификации белков [1]. Некоторые пептидгидролазы мозга выступают в качестве компонентов систем, обеспечивающих функционирование пептидергических синапсов, катализируя реакции образования и распада пептидов (медиаторов, модуляторов) [2, 3].

Важная роль в обмене нейропептидов отводится ферментам с аминопептидазной специфичностью действия. Так, например, инактивация энкефалинов в мозгу осуществляется преимущественно под действием энкефалинаминопептидазы [4]. Показано, что катаболизм Arg-вазопрессина и окситоцина также связан с действием аминопептидаз [5].

В мозгу обнаружены несколько различающихся по свойствам, внутриклеточной локализации и специфичности действия аминопептидаз [6—10]. Среди них идентифицированы аминотрипептидазы—ферменты, специфически гидролизующие только трипептидные субстраты [11—13]. Были выделены и очищены аминотрипептидазы до гомогенного состояния из мозга быка [11], обезьяны [12] и крыс [13]. В то же время в нервной ткани животных обнаружены и идентифицированы трипептиды, обладающие гормональными и модуляторными свойст-

сами [13]. В гипофизе и в некоторых других тканях выявлен специфический фермент (трипептидиламинопептидаза), отщепляющий N-концевые трипептиды от бычьего гормона роста [14].

В этой связи определенный интерес представляет изучение ферментов, принимающих участие в деградации трипептидных субстратов.

Целью настоящей работы было выделение из головного мозга кошек растворимой аминопептидазы, гидролизующей Leu-Gly-Gly, и изучение её физико-химических свойств.

Материалы и методы

Фермент выделяли из больших полушарий головного мозга половозрелых кошек. Животных декапировали, быстро извлекали головной мозг и помещали в охлажденный (0—4°) раствор 0,25 М сахарозы, затем очищали его от оболочек и кровеносных сосудов, промывали от остатков крови в 0,25 М сахарозе и гомогенизировали в 0,01 М калий-фосфатном буфере pH 7,6, в соотношении 1:9 (масса/объем). Центрифугированием гомогената при 30000 g в течение 60 мин отделяли субклеточные структуры. Белки надосадочной жидкости фракционировали сериюкислым аммонием. Фракцию 0,4—0,7 насыщения, обладающую максимальной величиной U. A. фермента, растворяли в 0,1 М K⁺-фосфатном буфере, pH 7,6, диализовали против этого же буфера и наносили на колонку с ДЭАЭ-сефадексом A-50 (1,8×18 см). Колонку с гелем предварительно уравнивали калий-фосфатным буфером (0,01 М, pH 7,6) и элюировали им несвязавшиеся с ионообменником белки. Фракционирование связавшихся белков проводили в линейном градиенте K⁺-фосфатного буфера pH 7,6 (0,01—0,2 М). Фракции с аминотрипептидазной активностью объединяли, диализовали против 0,01 М фосфатного буфера pH 6,5 и наносили на колонку с гидроксилапатитом (2,5×3 см), уравниваемую этим же буфером. Промыванием колонки стартовым буфером удаляли несвязавшиеся белки, а сорбированные белки фракционировали линейным градиентом (0,01—0,2 М) фосфатного буфера, pH 6,5. Последняя стадия очистки фермента включала фракционирование на колонке (1,5××68 см) с сефадексом G-200.

Очищенный препарат исследовали на гомогенность, субстратную специфичность, влияние ингибиторов, различных реагентов и другие свойства.

Активность фермента определяли, как описано ранее [15], белок—спектрофотометрически и по методу Lowry [16]. Ферментативную активность выражали в мкмоль аминогрупп, освобожденных при гидролизе Leu-Gly-Gly за 60 мин инкубации при 37° в расчете на 1 мг белка.

Результаты и обсуждение

Выделение и очистка аминотрипептидазы. При подобранных условиях фракционирования белков на ионообменнике (рис. 1, табл. 1) достигается высокая степень очистки фермента. Величина U. A. аминотрипептидазы во фракциях, полученных на этой стадии, составляет 46,6 мкмоль, что соответствует 173-кратной очистке по отношению к гомогенату. Фракции с ферментативной активностью объединяли и наносили на колонку с гидроксилапатитом. На рис. 2 представлена типичная хроматограмма белков и профиль элюции фермента при очистке на гидроксилапатите. Фракции, содержащие аминотрипептидазу, объединяли, концентрировали на ультрафильтре УАМ-150 и на-

носили на колонку с сефадексом G-200 (рис. 3). На стадии гель-фильтрации получен препарат фермента с очисткой в 643 раза. Выход аминотрипептидазы по отношению к суммарной активности в гомогенате составил 9%.

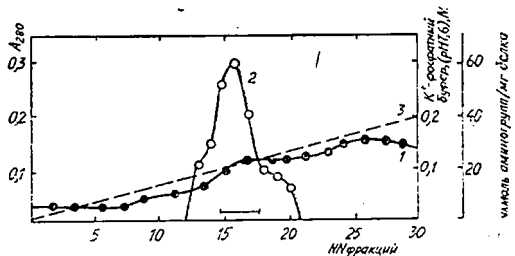


Рис. 1. Очистка аминотрипептидазы из головного мозга кошек на ионообменнике ДЭАЭ-сефадексе А-50: 1—белок, 2—активность фермента, 3—градиент буфера

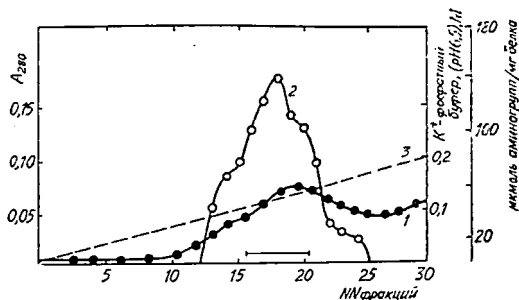


Рис. 2. Профиль элюции аминотрипептидазы при хроматографии на колонке с гидроксиплатитом: 1—белок, 2—активность фермента, 3—градиент буфера

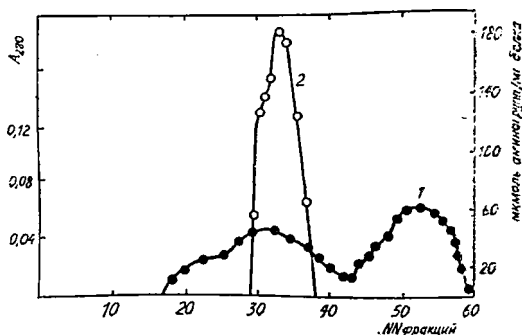


Рис. 3. Гель-фильтрация на колонке с сефадексом G-200 препарата аминотрипептидазы, полученного после очистки на гидроксиплатите: 1—белок, 2—активность фермента

Определение величины M_r очищенного препарата аминотрипептидазы. M_r фермента определяли двумя методами—гель-фильтрацией и диск-электрофорезом в ПААГ с ДДС-На. В первом случае колонку калибровали белками с известной величиной M_r (цитохром С—12,3 кД, овальбумин—45 кД, бычий сывороточный альбумин—68 кД,

Таблица 1

Выделение и очистка аминотрипептидазы из головного мозга кошек

Стадии очистки	Объем, мл	Содержание белка		Активность		Выход, %	Степень очистки
		общее	мг/мл	общая	удельная		
Гомогенат	180	1440	8	388,8	0,27	100	1
Супернатант	140	262,5	1,9	238,1	1,08	72,8	4
Фракция 0,4—0,7 насыщения ДЭАЭ-сефалекс	40	121,6	3,04	211,5	1,74	54,4	6,4
А-50	30	3,43	0,114	159,6	46,60	41,1	173
Гидроксилапатит	15	0,93	0,062	107,22	115,30	27,6	427
Сефалекс G-200	5	0,20	0,040	34,83	174,15	9,0	643

щелочная фосфатаза—80 кД и гексокиназа—100 кД). Результаты опытов представлены на рис. 4. Величина M_r очищенного препарата аминотрипептидазы из мозга кошек по данным гель-фильтрации составляет 70 кД. Методом диск-электрофореза с ДДС-На была получена единственная белковая зона со значением относительной подвижности, соответствующей M_r 72 кД (рис. 4). Данные диск-электрофореза

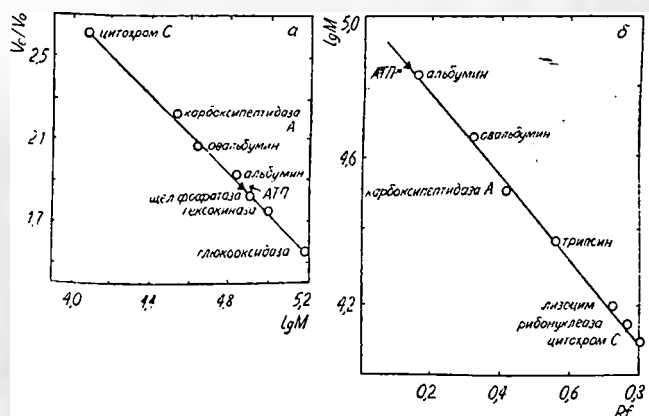


Рис. 4. Определение величины M_r аминотрипептидазы методами гель-фильтрации (а) и диск-электрофореза (б)

тического анализа свидетельствуют о гомогенности очищенного препарата аминотрипептидазы и указывают на то, что аминотрипептидаза является простым белком, состоящим из одной полипептидной цепи.

Выделенный фермент из мозга кошек по величине M_r близок к одной из форм аминоксипептидаз, выделенных из мозга быка [11]. Авторы упомянутой работы изолировали три формы фермента, две из которых имели M_r , равные 61,5 и 85,7 кД. Очищенная аминоксипептидаза из мозга обезьяны, по данным гель-фильтрации, имела M_r 65 кД, а по данным диск-электрофореза—70 кД [12]. Возможно, что существуют различия в размерах молекул аминоксипептидазы мозга в зависимости от вида животных. Однозначное заключение, по-видимому, будет преждевременным из-за недостатка сведений и, кроме того, не исключено, что разные значения величины M_r фермента обусловлены методическими погрешностями.

Влияние различных концентраций субстрата (Leu-Gly-Gly) на активность аминоксипептидазы. На рис. 5, а представлены результаты опытов по исследованию зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата. График зависимости скорости реак-

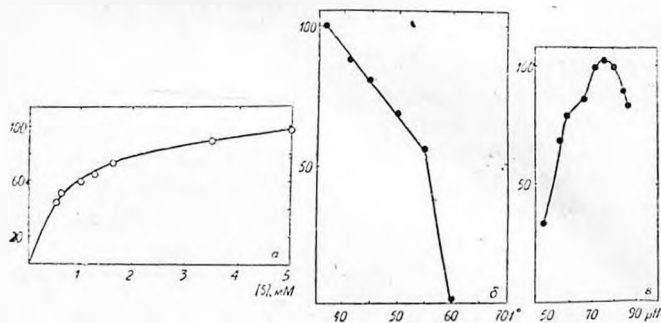


Рис. 5. Зависимость активности аминоксипептидазы мозга от насыщения субстратом (а), температуры (б) и рН инкубационной среды (в)

ции от концентрации субстрата представляет собой равнобочную гиперболу. Величина K_m , рассчитанная по Корнш-Боудену [17], равна 0.69 мМ. Значение K_m , полученное в наших опытах, сопоставимо со значениями K_m для аминоксипептидаз из мозга и других органов животных [8, 11—13, 18].

Влияние температуры на активность фермента. Аликвоты очищенного белка аминоксипептидазы предварительно нагревали в течение 15 мин при различных значениях температуры в интервале от 37 до 70°, затем охлаждали на ледяной бане, добавляли субстрат и инкубировали, как обычно при определении активности фермента. Результаты этой серии опытов представлены на рис. 5, б. Остаточную активность фермента после его нагревания при 37° принимали за 100%. Установлено, что аминоксипептидаза постепенно инактивируется при нагревании от 37 до 55°. Предварительное нагрева-

ние при температуре 55° приводит к полной инактивации аминотрипептидазы. При аналогичных условиях также наступает полная инактивация аминотрипептидазы, выделенной из мозга обезьяны [12].

Влияние pH среды на активность аминотрипептидазы. На рис. 5, в приведены данные опытов по определению активности фермента при различных значениях pH инкубационной среды. Видно, что высокоочищенная форма аминотрипептидазы мозга кошек имеет четко выраженный оптимум действия при pH 7,6. Высокоспецифичная аминотрипептидаза цитозоля мозга крыс проявляет максимальную активность к трипептидному субстрату при pH 7,8 [13]. Аминотрипептидаза из мозга обезьяны с наибольшей скоростью гидролизует Leu-Gly-Gly при pH 7,5 [12]. Таким образом, выделенная из мозга кошек аминотрипептидаза имеет практически такое же значение pH оптимума действия, как и соответствующие ферменты из мозга крыс [13] и обезьяны [12].

Влияние ионов металлов и других реагентов на активность аминотрипептидазы. Исследование влияния ионов металлов и других реагентов на активность ферментов дает возможность получить информацию об активных функциональных группах каталитического центра и в некоторой степени о механизме катализа. Было изучено влияние ионов двухвалентных металлов и ряда ингибиторов пептидгидролаз. Результаты проведенных опытов суммированы в табл. 2.

Таблица 2

Влияние ионов металлов и других реагентов на активность аминотрипептидазы головного мозга кошек

Реагент	Концентрация, ммоль	Скорость гидролиза, %
Контроль	—	100
Mn ²⁺	1	124
Mg ²⁺	1	110
Co ²⁺	1	106
Ca ²⁺	1	93
Zn ²⁺	1	0
ЭДТА	1	93
ЭДТА	5	86
p-ХМБ	1	0
Иодацетат	1	14
β-меркаптоэтанол	1	110
Пуромицин	1	93
Бацитрацин	1	100

По-видимому, исследуемый фермент для проявления каталитической активности не требует ионов металлов, поскольку их присутствие в инкубационной среде не сказывается на его активности. Активирование аминотрипептидазы Mg²⁺ не столь существенно, в то время как металлзависимые аминопептидазы активируются металлами в несколько раз [19]. Полученные данные по влиянию ЭДТА также свидетельствуют в пользу предположения о независимости ферментативного катализа от ионов металлов. SH-реагенты полностью

подавляют активность аминотрипептидазы, что указывает на существенную роль сульфгидрильных групп аминокислотных остатков фермента в механизме катализа. Модификация S-S-связей путем добавления в инкубационную среду β -меркаптоэтанола не оказывает заметного влияния на активность фермента, то есть роль этих связей в молекуле аминопептидазы не существенна для катализа. Микробные антибиотики пуромидин и бацитрацин не оказывают значительного влияния на активность аминотрипептидазы. Пуромидин является специфическим ингибитором ариламидаз—ферментов, гидролизующих β -нафтиламидные и п-нитроанилидные производные аминокислот [20]. Бацитрацин менее специфичен и подавляет активность аминопептидаз, различающихся по свойствам и специфичности действия. Отсутствие ингибирующего эффекта пуромидина и бацитрацина свидетельствует о том, что исследуемый фермент не является ариламидазой, а относится к особой группе аминопептидаз, действующих на трипептидные субстраты.

Исследование субстратной специфичности аминопептидазы мозга: Субстратную специфичность изучали, используя синтетические субстраты. Исследовали только те из них, которые содержат гидрофобные аминокислоты с N-конца, так как известно, что другие ди- и трипептидные субстраты практически не гидролизуются изученными аминотрипептидазами из нервной ткани [11—13]. Конечная концентрация того или иного субстрата в реакционной смеси составляла $5 \cdot 10^{-3}$ М. Скорость гидролиза Leu-Gly-Gly принимали за 100%. Результаты опытов обобщены в табл. 3.

Таблица 3

Субстратная специфичность аминопептидазы мозга кошек

Субстрат	Активность, %	Субстрат	Активность, %
Leu-Gly-Gly	100	Gly-Gly	0
Ala-Gly-Gly	70	Gly-Gly + Co^{2+} (1 мМ)	0
Gly-Gly-Gly	13	бенз-Ala	0
Ala-Ala	0	бенз-Met	0
Ala-Gly	0	2,4-ДНФ-Leu	0
Ala-Trp	0	2,4-ДНФ-Gly	0
Ala-Asn	0	Ala-p-нитроанилид	0
Gly-Phe	0	Leu- β -нафтиламид	0
Gly-Ala	0	Leu-энкефалин	0
Gly-Val	0	Met-энкефалин	0
Val-Gly	0		

Как установлено, аминопептидаза мозга кошек гидролизует лишь трипептиды, однако и они гидролизуются с различной скоростью. Лимитирующим фактором в скорости гидролиза трипептидов является строение N-концевой аминокислоты. Учитывая предполагаемый механизм ферментативного катализа, где, как показано выше, гидролиз субстрата осуществляется без участия ионов металлов, следует отметить, что ферменты с подобным механизмом действия имеют «карман» активного центра, строго соответствующий по конформа-

ции специфическому субстрату [21]. Остаток N-концевого аланина и тем более глицина значительно меньше лейцинового. Этим, по-видимому, и можно объяснить различие в скоростях гидролиза близких по строению трипептидов, отличающихся лишь по N-концевой аминокислоте. Фермент не гидролизует дипептиды, не проявляет карбокси-пептидазной, ариламидазной активности и не действует на энкефалины.

Суммируя данные по изучению свойств и специфичности действия фермента, можно сказать, что аминотрипептидаза из мозга кошек является типичной аминотрипептидазой. Исследуемый фермент по физико-химическим свойствам и специфичности действия близок к ферменту, выделенному из мозга обезьяны [12] и цитозоля мозга крыс [13].

Физиологическая роль аминотрипептидазы в мозгу остается неясной. Возможно, что этот фермент принимает участие в деградации нейропептидов трипептидной природы [22]. Не исключена и роль аминотрипептидазы в разрушении «сигнальных» пептидов, которые в большинстве случаев состоят из 20—30 аминокислот, содержат большое число нейтральных гидрофобных аминокислот и имеют сходное строение [23]. Учитывая строгую субстратную специфичность фермента к Leu-Gly-Gly, можно предположить, что изучаемая аминотрипептидаза ответственна и за регулирование пула лейцина, являющегося типичной «кетогенной» аминокислотой [24]. Преимущественная локализация фермента в цитозоле, а также относительно высокая активность этого фермента по сравнению с другими пептидгидролазами мозга [25] дают основание полагать, что аминотрипептидаза принадлежит важная роль в катаболизме внутриклеточных белков на заключительных стадиях.

PURIFICATION AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF AMINOTRIPEPTIDASE FROM CAT BRAIN

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

Chair of Biophysics and Biochemistry, Dnepropetrovsk State University

Soluble aminotripeptidase has been purified 643-fold from cat brain. The enzyme appeared to be homogeneous on disc PAAQ electrophoresis. Its molecular weight is about 70—72 kDa. The pH optimum is 7.6 (Leu-Gly-Gly as substrate). The purified enzyme did not hydrolyze dipeptides and enkephalins. Enzyme activity is not affected by divalent metal ions and EDTA. The aminotripeptidase activity was completely inhibited by p-CMB (10^{-3} M).

ЛИТЕРАТУРА

1. Schimke R. T., Bradrey M. O.—In: *Proteases and Biological Control* (Reich E., Rifkin D. B., Shaw E., eds.). New York, Cold Spring Harbor Laboratory, v. 2, p. 515—530, 1975.
2. Ерошкин М. Ю. Успехи соврем. биол., т. 95, № 1, с. 65—83, 1983.
3. Edwardson J. A. J. *Inher. Metal. Dis.*, v. 5, № 1, p. 82—88, 1982.
4. Meek J. L., Yang H.—Y. T., Costa E. *Neuropharmacology*, v. 16, № 1, p. 151—156, 1977.
5. Burbach J. P. H., Lebouille J. L. M. *J. Biol. Chem.*, v. 258, № 4, p. 1487—1494, 1983.
6. Ellis S. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, v. 12, № 2, p. 452—456, 1963.
7. Brecher A. S., Sobel R. E. *Biochem. J.*, v. 105, № 2, p. 641—646, 1967.
8. Marks N., Lajtha A. *Methods in Enzymology*, v. 19, № 2, p. 531—543, 1970.
9. Serra S., Grynbaum A., Lajtha A., Marks N. *Brain Res.*, v. 44, № 2, p. 579—592, 1972.
10. Hazato T., Inagaki-Shimamura M., Katajama T., Yamamoto T. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, v. 105, № 2, p. 470—475, 1982.
11. Sobel R. E., Brecher A. S. *Can. J. Biochem.*, v. 49, № 6, p. 677—685, 1971.
12. Hayashi M., Oshima K. *J. Biochem.*, v. 87, № 5, p. 1403—1411, 1980.
13. Sachs L., Marks N. *Biochim. et biophys. acta*, v. 796, № 2, p. 229—238, 1982.
14. Doebber T. W., Divor A. R., Ellis S. *Endocrinology*, v. 103, № 5, p. 1794—1804, 1978.
15. Мелешко В. И., Генгин М. Т., Рева А. Д. Докл. АН УССР, Б, № 11, с. 73—75, 1983.
16. Lowry O. N., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. H. *J. Biol. Chem.*, v. 193, № 1, p. 265—275, 1951.
17. Корниш-Бовден Э. Основы ферментативной кинетики (под ред. Б. И. Курганова). М., Мир, 1979.
18. Doumenc C., Maroux S. *Biochem. J.*, v. 177, № 3, p. 801—808, 1979.
19. Колодзейская М. В., Пилявская М. В. Пептидазы, Киев, Наукова думка, 1981.
20. Hersh L. B. *J. Neurochem.*, v. 36, № 4, p. 1594—1596, 1981.
21. Фёршт Э. Структура и механизм действия ферментов (под ред. Б. И. Курганова). М., Мир, 1980.
22. Рева А. Д., Мелешко В. И., Генгин М. Т., Жерносеков Д. Д.—В кн.: Тезисы девятой всесоюзной конференции по биохимии нервной системы, Ереван, 1983, с. 81—82, 1983.
23. Локушина Л. А. Молекуляр. биология, т. 13, № 6, с. 1205—1229, 1979.
24. Millward D. J., Bates P. C., Benoist B. de, Brown J. S., Cox M., Halliday D., Oderda B., Rennie M. J. „Colloq. INRA”, № 16/1, p. 68—96, 1983.
25. Marks N., Galojan A., Grynbaum A., Lajtha A. *J. Neurochem.*, v. 22, № 5, p. 735—739, 1974.

Поступила 12. VI 1985



УДК 577.156+612.8.015.

О ГЕТЕРОГЕННОСТИ ЭНКЕФАЛИНГИДРОЛИЗУЮЩЕЙ МЕМБРАНОСВЯЗАННОЙ АМИНОПЕПТИДАЗЫ МОЗГА ЧЕЛОВЕКА

ЖЕРНОСЕКОВ Д. Д.

Кафедра биохимии и биофизики Днепропетровского госуниверситета

Изучалась гетерогенность энкефалингидролизующей мембраносвязанной аминоксептидазы мозга человека с использованием хроматографии на ДЭАЭ-сефарозе CL-6B и группоспецифических сорбентах фенил-сефарозе и конканавалин-А-сефарозе. При хроматографии триптонового экстракта мембранной фракции мозга на ДЭАЭ-сефарозе CL-6B выявлены три фракции. Фракция, элюирующаяся без задержки, осуществляет полный гидролиз Met-энкефалина. Две другие фракции обладают сходной специфичностью действия по отношению к Met-энкефалину. Одна из них элюируется с колонки повышением ионной силы буфера, другая — добавлением в него 2%-ного триптона X-100. Результаты хроматографии исходного препарата фермента на конканавалин-А-сефарозе позволяют предположить гликопротеидную структуру по крайней мере одной из форм фермента.

Как и другие тканевые экзопептидазы аминоксептидазы мозга осуществляют деградацию белков и пептидов и, в частности, биологически активных пептидов-энкефалинов, которые могут выступать в роли нейромедаторов или нейромодуляторов [1]. Опубликованы исследования по изучению цитозольных аминоксептидаз [2—4]. Аминоксептидазы, выделенные из мозга различных животных, имеют общие свойства, характерные для группы ариламидаз: ингибирование пуромидином, ЭДТА, активация SH-реагентами.

В связи с трудностью выделения и очистки мембраносвязанные аминоксептидазы оказались менее изученными. Первые попытки очистки мембранных аминоксептидаз включали солилизацию фермента из мембран детергентом и ионообменную хроматографию на ДЭАЭ-ионообменнике [5, 6].

В настоящее время описаны методы получения высокоочищенных препаратов мембранных аминоксептидаз мозга различных животных [7—9]. Несмотря на то, что встречаются данные о существовании двух форм фермента, разделяемых методом диск-электрофореза [10], до сих пор основное внимание было уделено лишь одной из них. В

целом. вопрос о множественных молекулярных формах энкефалингидролизующей аминопептидазы и их свойствах недостаточно изучен. В отношении другого фермента, расщепляющего энкефалин,—дипептидилкарбоксипептидазы («энкефалиназы»), показано наличие нескольких молекулярных форм [11].

Задачей настоящей работы являлось изучение специфичности различных фракций мембраносвязанной энкефалингидролизующей аминопептидазы мозга человека.

Материалы и методы

В работе использованы ДЭАЭ-сепароза CL-6B, фенол-сепароза, конканавалин-A-сепароза, аминогексилсепароза («Pharmacia», Швеция); биогель НТР («Bio-Rad», США), дитиотрентол, ЭГТА («Sigma», США), аланил-п-нитроанилид («Serva», ФРГ). Met-энкефалин был любезно предоставлен М. И. Титовым (Всесоюзный кардиологический научный центр АМН СССР).

Аминопептидазу выделяли из серого вещества головного мозга человека. При определении оптимальных условий солюбилизации мембраносвязанного фермента препарат мембран готовили по следующей схеме: 10%-ный гомогенат мозга в 0,05 М трис-HCl буфере pH 7,5, центрифугировали при 30000 g в течение 40 мин. Осадок ресуспендировали в исходном буфере в соотношении 1:2 (вес:объем). Из полученной мембранной суспензии готовили пробы с различным содержанием детергента (0; 0,5; 1 и 2%-ный тритон X-100 в конечной концентрации). После 40-минутной инкубации пробы центрифугировали при 30000 g в течение часа. В полученных надосадочных растворах и осадках определяли аминопептидазную активность.

Для колоночной хроматографии во всех случаях в качестве исходного препарата применяли тритоновый солюбилизат, полученный по схеме, описанной в работе Нии и соавт. [7]. Число промывок было увеличено до 3-х с добавлением в среду 0,5 М NaCl. При этих условиях исключалась возможная сорбция растворимой аминопептидазы препаратами мембран.

Активность аминопептидазы определяли спектрофотометрически и методом тонкослойной хроматографии. Спектрофотометрическое определение активности фермента проводили при длине волны 405 нм. В качестве субстрата использовался аланил-п-нитроанилид, конечная концентрация которого в инкубационной пробе составляла $5 \cdot 10^{-4}$ М. Инкубационная смесь содержала 0,12 М фосфатный буфер, pH 7,0 и 0,12 мМ дитиотрентола. После 45-минутной инкубации при 37° пробы подвергались 2-минутному кипячению с последующим центрифугированием с целью достижения прозрачности исследуемых проб. Величину У. А. фермента выражали в мкмоль отщепленного от аланил-п-нитроанилидного субстрата п-нитроанилина (п-НА) за 1 мин инкубации в расчете на 1 мг белка.

Энкефалингидролизующую активность мембраносвязанной аминопептидазы определяли при помощи тонкослойной хроматографии на силикагелевых пластинках («Silufol», СССР). Инкубационная смесь имела следующий состав: 50 мкл препарата фермента, 20 мкл 0,05 М трис-HCl буфера, pH 7,5, 50 мкл раствора Met-энкефалина (2 мг в 1 мл). Контрольные пробы содержали 20 мкл раствора Met-энкефалина и 20 мкл буфера. Кроме того, для идентификации аминокислот, отщепляемых от Met-энкефалина, готовили растворы аминокислот-свидетелей в 0,05 М трис-HCl буфере, pH 7,5—глицина (2 мг/мл) и тирозина (2 мг/мл). Опытные и контрольную пробы помещали в термостат при 37°. После часовой инкубации от опытных и контрольной проб, а также от растворов-свидетелей отбирали аликвоты по 20 мкл и наносили на силикагелевую пластинку в виде пятна, диаметр которого не превышал 1 мм. После нанесения проб пластинку погружали в систему этилацетат—изопропанол—5%-ная уксусная кислота (2:2:1). По окончании хроматографии

пластинку высушивали и окрашивали 2%-ным раствором нингидрина на этаноле. Затем пластинку снова высушивали и по появлению пятен аминокислот, отщепляемых от энкефалингидролизующей активности ферментативных реакций.

Хроматографию на микроколонке с ДЭАЭ-сефарозой CL-6B (объем геля 1 мл) проводили следующим образом: колонку уравнивали буфером А (25 мМ трис-НСl, рН 7,5; 2 мМ, ЭГТА; 0,2 мМ дитиотреитол), затем наносили 200 мкл исходного препарата фермента. Промывку колонки осуществляли вышеуказанным буфером А (4 объема колонки). Элюцию фермента проводили в два этапа: исходным буфером, содержащим 0,3 М NaCl и буфером такого же состава, содержащим 2%-ный тритон X-100. Объем собираемых фракций составил 1 мл, скорость элюции—18 мл/ч.

Колонку с фенил-сефарозой (объем геля 1 мл) уравнивали буфером А (25 мМ трис-НСl буфером, рН 7,5. После нанесения исходного препарата фермента (200 мкл) колонку промывали вышеуказанным буфером. Элюцию проводили буфером, содержащим 2%-ный тритон X-100. Объем собираемых фракций составлял 1 мл, скорость элюции—25 мл/ч.

Колонку с коканавалин-А-сефарозой (объем геля—1 мл) уравнивали 0,025 М трис-НСl буфером, рН 7,4, содержащим $MgCl_2$, $MnCl_2$ и $CaCl_2$ (по 1 мМ) и 0,1%-ный тритон X-100. Элюцию гликопротеинов проводили 10%-ным раствором метил- α -D-глюкопиранозиды, приготавленном на том же буфере. Объем элюата составлял 1 мл, скорость элюции—25 мл/ч.

Получение очищенного препарата мембраносвязанной аминопептидазы проводили последовательно хроматографией исходного препарата фермента на ДЭАЭ-сефарозе CL-6B, биоэле НТР и АН-сефарозе 4В.

Колонку с ДЭАЭ-сефарозой CL-6B (1,7×21 см) уравнивали буфером А. После нанесения ферментного препарата колонку промывали указанным буфером. Элюцию осуществляли линейным градиентом NaCl (0—0,4 М) общим объемом 400 мл (объем фракций—8 мл, скорость элюции—18 мл/ч). Пробы, содержащие аминопептидазную активность, объединяли и наносили на колонку с биоэле НТР (1,1×8,4 см), предварительно уравновешенную буфером А. Фермент элюировали, используя линейный градиент фосфата (0—0,2 М), общим объемом 300 мл (объем фракций—5 мл, скорость элюции—12 мл/ч).

Объединенную фракцию после хроматографии на биоэле НТР наносили на колонку с АН-сефарозой 4В (0,9×5,5 см). Фермент элюировали градиентом NaCl (0—1 М). Объем элюата составлял 3 мл, скорость элюции—18 мл/ч.

Белок во фракциях определяли по Bradford [12], Lowry и соавт. [13].

Результаты и обсуждение

Исследование зависимости выхода активности фермента от концентрации детергента показало, что при соотношении детергент/белок 1,66 солибилизуется практически весь фермент (рис. 1). Поэтому при выделении и очистке фермента на стадии солиubilизации мы применяли тритон X-100 в конечной концентрации 1%, что соответствует вышеуказанному соотношению. Применение большей концентрации детергента является нежелательным, так как при колоночной хроматографии он может затруднять сорбцию фермента [14, 15].

Для решения вопроса о гетерогенности форм мембраносвязанной аминопептидазы, гидролизующей энкефалины, использовали хроматографию на ДЭАЭ-сефарозе CL-6B и группспецифических сорбентах.

На рис. 2 представлены результаты ионообменной хроматографии на микроколонке с ДЭАЭ-сефарозой CL-6B. С помощью хромато-

то субстрата, аланил-п-нитроанилида, были обнаружены 3 фракции, содержащие аминопептидазную активность.

Часть ферментного препарата, как это отмечалось и другими авторами [7], не связывалась с ионообменником (эта фракция обозначена в дальнейшем как фракция «Н»). Фракция I была получена элюцией фермента с колонки 0,3 М NaCl, приготовленным на буфере А. Остаточная аминопептидазная активность (фракция II) элюировалась с колонки только при наличии в элюирующем буфере тритона X-100 (в конечной концентрации 2%).

От всех полученных фракций отбирались аликвоты для определения энкефалингидролизующей активности.

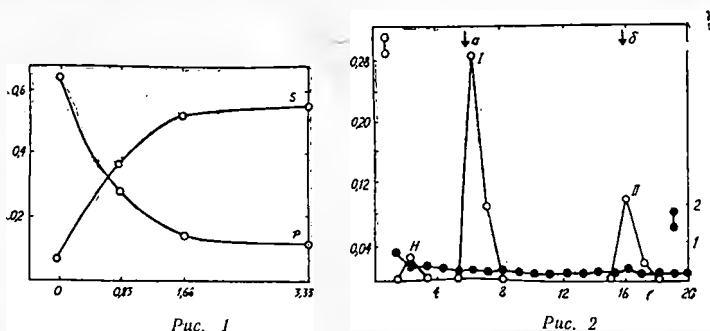


Рис. 1. Солюбилизация мембраносвязанной аминопептидазы тритоном X-100. По оси абсцисс—соотношение детергент/белок (мг/мг), по оси ординат—активность аминопептидазы, выраженная в мкмоль п-НА, образующегося за 45 мин инкубации при 37°, S—активность фермента в супернатанте, P—активность фермента в осадке после центрифугирования проб с различным содержанием детергента

Рис. 2. Хроматография мембраносвязанной аминопептидазы на микроколонке с ДЭАЭ-сефарозой CL-6В. По оси абсцисс—объем собираемых фракций в мл, по оси ординат слева—активность аминопептидазы в мкмоль п-НА, образующегося за 45 мин инкубации при 37°, справа—содержание белка во фракциях (мг/мл). а—элюция буфером А, содержащим 0,3 М NaCl, б—элюция буфером А, содержащим 0,3 М NaCl и 2%-ный тритон X-100

Результаты тонкослойной хроматографии продуктов деградации энкефалина, приведенные на рис. 3, показывают, что фракция «Н» содержит целый набор энкефалингидролизующих ферментов. Видимо, кроме аминопептидазной, в данной фракции присутствуют также дипептидиламинопептидазная, карбоксипептидазная и дипептидилкарбоксипептидазная активности. Об этом свидетельствует наличие на дорожке пятен всех аминокислот, входящих в состав Met-энкефалина. Фракции I и II содержат аминопептидазную и дипептидиламинопептидазную активности, о чем свидетельствует присутствие на соответствующих дорожках пятен тирозина и глицина (рис. 3, I и II).

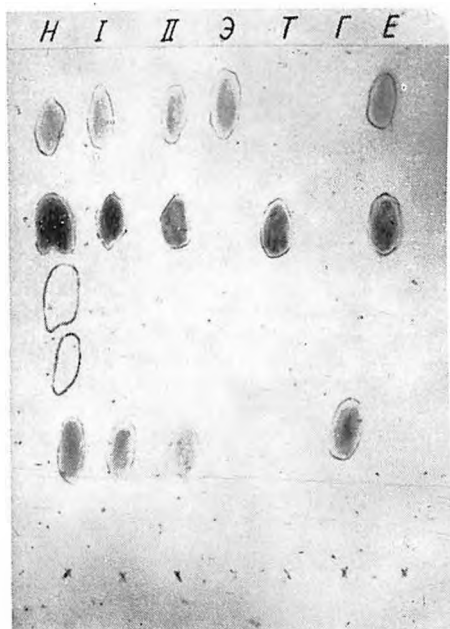


Рис. 3. Тонкослойная хроматография продуктов деградации Мет-энкефалина мембраносвязанной аминопептидазой после фракционирования фермента на колонке с ДЭАЭ-сефарозой СЛ-6В. Н—несвязанная фракция, I—фракция I, II—фракция II, Э—Мет-энкефалин (2 мг/мл), Т—тирозин (2 мг/мл), Г—глицин (2 мг/мл), Е—препарат фермента очищенный последовательно на колонках с ДЭАЭ-сефарозой СЛ-6В, биогеом НТР, АП-сефарозой 4В

На рис. 4 представлены хроматограммы всех этапов очистки фермента. Получение мембраносвязанной аминопептидазы из мозга человека на ДЭАЭ-сефарозе проводили в соответствии с получением фракции I на микроколонке (рис. 4, а). На конечной стадии был получен препарат фермента, обладающий способностью гидролизировать связь Туг-Gly в молекуле энкефалина без последующей деградации, приводящей к образованию тетрапептида (рис. 3, фракция Е).

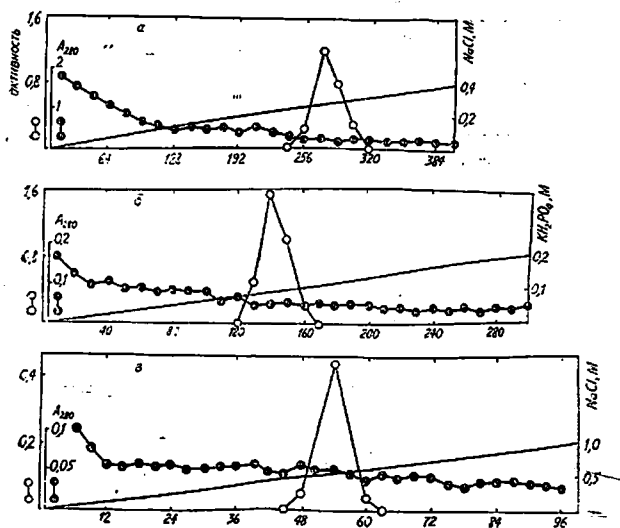


Рис. 4. Очистка мембраносвязанной аминопептидазы мозга хроматографией на колонках с ДЭАЭ-сефарозой CL-6B (а), биогеом НТР (б) и АН-сефарозой 4В (в). По оси абсцисс—объем собираемых фракций в мл, по осям ординат: слева—ферментативная активность и величина поглощения при 280 нм; справа—градиент концентраций NaCl (а, в) и K_2HPO_4 (б)

Так как тирозин является единственной аминокислотой, отщепляемой от Met-энкефалина, можно утверждать, что в процессе выделения фермента аминопептидазная и дипептидиламинопептидазная активности разделились.

Анализ результатов ионообменной хроматографии на микроколонке (табл. 1) позволяет объяснить потерю общей активности фермента при очистке на ДЭАЭ-сефарозе CL-6B, поскольку, помимо несвязавшейся, существует значительная остаточная аминопептидазная активность, которая элюируется с колонки только при добавлении в элюирующий буфер детергента. Однако повышение величины U_A мембраносвязанной аминопептидазы наблюдалось только для фракции I, в то время как фракция II практически не очищалась.

Возможно, что фермент, входящий в состав мицелл детергента,

частично ингибирован по сравнению с тем, который элюируется при повышении ионной силы без детергента. В пользу такого предположения свидетельствуют результаты, полученные при хроматографии исходного препарата мембраносвязанной аминопептидазы на микроколоне с фенил-сефарозой 4В (табл. 2, рис. 5, а). Величина U_A

Таблица 1

Хроматография мембраносвязанной аминопептидазы головного мозга на микроколоне с ДЭАЭ-сефарозой CL-6В

Наименование фракций	Содержание белка во фракции		Активность фермента во фракции	
	мг/мл	мг	мкмоль п-НА/мин	мкмоль п-НА/мин/мг белка
Тритоновый солюбилизат	5,0	1,0	0,84	0,84
Несвязавшаяся фракция	0,45	0,45	0,04	0,1
Фракция I	0,25	0,25	0,56	2,2
Фракция II	0,30	0,30	0,20	0,7

Примечание. Условия хроматографии см. в разделе «Материалы и методы» и на рис. 2.

Таблица 2

Хроматография мембраносвязанной аминопептидазы головного мозга человека на колонке с фенил-сефарозой

Наименование фракций	Содержание белка во фракции		Активность фермента во фракции	
	мг/мл	мг	мкмоль п-НА/мин	мкмоль п-НА/мин/мг белка
Тритоновый солюбилизат	5,0	1,0	3,12	3,12
Фенил-сефарозная	0,52	0,52	1,56	3,00

Примечание. Условия проведения хроматографии см. в разделе «Материалы и методы» и на рис. 5, а.

Таблица 3

Очистка мембраносвязанной аминопептидазы головного мозга человека

Наименование фракций	Содержание белка во фракции		Активность фермента во фракции	
	мг/мл	мг	мкмоль /п-НА/мин	мкмоль /п-НА/мин/мг белка
Тритоновый солюбилизат	5,2	119,6	425,5	3,5
Объединенная фракция после ДЭАЭ-хроматографии	0,24	6,0	195,0	32,5
Объединенная после хроматографии на биогеде НТР	0,015	0,45	30,1	66,9
Объединенная после хроматографии на АН-сефарозе	0,009	0,081	28,7	354,0

аминопептидазы в полученной при этом фракции не повышается по сравнению с У. А. фермента в тритоновом солюбилизате.

Таким образом, для мембраносвязанной аминопептидазы, гидролизующей энкефалин, можно предположить наличие, по меньшей мере, двух форм фермента, различающихся по физико-химическим свойствам. Одна из них элюируется из колонки с ДЭАЭ-сефарозой повышением ионной силы, вторая—добавлением в элюирующий раствор детергента. Объяснение этому феномену следует, по-видимому, искать в особенностях структуры гидрофобных доменов в молекулах двух форм фермента. Кроме того, хроматографией на конканавалин-А-сефарозе нами также было показано существование, по крайней мере, двух форм аминопептидазы в исходном препарате (табл. 3, рис. 5, б). По-видимому, в исходном препарате содержатся аминопептидазы, имеющие маннозные остатки в углеводных фрагментах гликопро-

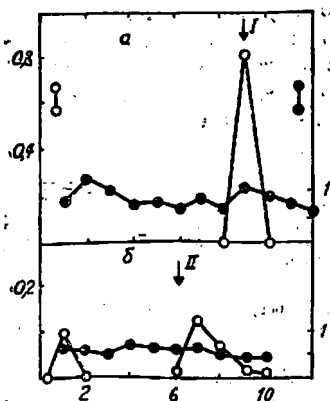


Рис. 5. Хроматография мембраносвязанной аминопептидазы на микроколонках с фенил-сефарозой (а) и конканавалин-А-сефарозой (б). По оси абсцисс—объем собираемых фракций в мл, по оси ординат: слева—ферментативная активность, справа—содержание белка во фракциях (мг/мл). Стрелками обозначены: I—элюция буфером, содержащим 2%-ный тритон X-100, II—элюция буфером, содержащим 10%-ный метил- α -D-глюкопиранозид.

теина и аминопептидазы, не связывающиеся с конканавалином-А. Определить принадлежность этих форм фермента к какой-либо из полученных ферментных фракций при хроматографии на ДЭАЭ-сефарозе CL-6B не удалось из-за низкой аминопептидазной активности фракций, получаемых при пропускании фермента через колонку с конканавалин-А-сефарозой. Это обстоятельство затрудняло также использование фракций, получаемых ионообменной хроматографией в дальнейших исследованиях. Снижение аминопептидазной активности в данном случае происходит из-за ингибирующего действия ионов двухвалентных металлов, содержащихся в буфере, применяемом для работы с конканавалин-А-сефарозой. По этой же причине не может быть окончательно решен вопрос о гликопротеиновой природе полученного нами очищенного препарата фермента.

Таким образом, вполне вероятно, что молекулярная гетерогенность характерна не только для дипептидилкарбокси-пептидазы—«эн-

кефалиназы» [11], но и для мембраносвязанной —аминопептидазы мозга. Можно предположить, что наличие гетерогенности молекулярных форм аминопептидазы, также как и «энкефалиназы», связано с существованием различных рецепторов энкефалинов.

ON HETEROGENEITY OF HUMAN BRAIN ENKEPHALIN-HYDROLYZING MEMBRANE BOUND AMINOPEPTIDASE

ZHERNOSEKOV D. D.

Chair of Biophysics and Biochemistry, Dnepropetrovsk State University

Heterogeneity of human brain Met-enkephalin-hydrolyzing membrane bound aminopeptidase has been studied by means of chromatography on DEAE-Sepharose CL-6B; phenyl-Sepharose CL-6B and Con A-Sepharose. DEAE-Sepharose CL-6B column chromatography of crude brain Triton X-100 extract reveals 3 aminopeptidase fractions: one fraction that passed through the support and two others, that were eluted by increasing salt concentration and by 2% Triton X-100, respectively. Binding of initial extract with Con A-Sepharose points to the glycoprotein nature of at least one form of aminopeptidase.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Schwartz J. C., de la Baume S., Malfroy B., Patey G., Perdrisot R., Swerts J. P., Fournie-Zaluski M. C., Gacel G., Roques B. P. *Physiol. Pept. New trends Radioimmunol.*, v. 58, p. 31—42, 1981.
2. Hersh L. B., Mc. Kety J. F. J. *Neurochem.*, v. 36(1), p. 171—178, 1981.
3. Schnebli H. P., Phillips M. A., Barclay R. K. *Biochim. et biophys. acta*, v. 569, p. 89—98, 1979.
4. Hayashi M., Oshima K. J. *Biochem.*, v. 81, p. 631—639, 1977.
5. D'Monte B., Marks N., Datta R. K., Lajtha A.—In: *Protein metabolism of the nervous system* (ed. A. Lajtha), p. 185—217, Plenum Press, New York, p. 185—217, 1970.
6. Hersh L. B. *Biochemistry*, v. 20, № 8, p. 2345—2350, 1981.
7. Hui K. S., Wang Y.-J., Lajtha A. *Biochemistry*, v. 22, № 5, p. 1062—1067, 1983.
8. Shimamura M., Hazato T., Kalayama T. *Biochim. et biophys. acta*, v. 756, № 3, p. 223—229, 1983.
9. Жерносеков Д. Д., Генгин М. Т., Рева А. Д., Шрам С. И. Докл. АН УССР, № 1, с. 62—64, 1985.
10. Рева А. Д., Мелешко В. И., Генгин М. Т., Жерносеков Д. Д. Материалы 9-й Всесоюз. конф. по биохимии нервной системы, с. 81—82, Ереван, 1983.
11. Ruch. Robert S., Hersh L. B. *Life Sci.*, v. 31, № 5, p. 445—451, 1982.
12. Bradford M. M. *Anal. Biochem.*, v. 72, № 2, p. 248—254, 1976.
13. Lowry O. H., Rosebrough H. J., Farr L. A., Randal R. J. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265—275, 1951.
14. Berezin V., Rasmussen S., Bock E. *Protides Biol. Fluids. Proc. 30th. Colloq. Brussels*, v. 30, p. 79—82, 1982.
15. Березин В. А., Шаповал Т. И., Жолудь Л. М. *Биохимия*, т. 48, № 8, с. 1329—1336, 1983.

Поступила 4. IX 1985



УДК 612.273.1:612.822.1:577.152.1.43

АКТИВНОСТЬ МАО И УЛЬТРАСТРУКТУРА ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ РАЗНЫХ РЕЖИМАХ ГИПЕРОКСИИ

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

Ростовский ордена Трудового Красного Знамени государственный
университет им. М. А. Суслова

Электронно-микроскопическое исследование установило значительные изменения ультраструктуры нейронов коры больших полушарий и среднего мозга в судорожной фазе гипероксии, проявляющиеся в набухании митохондрий, снижении числа и дезориентации крист, исчезновении лизосом. В компенсаторной фазе гипероксии изменения в ультраструктуре нейронов менее выражены. Активность МАО типа А в митохондриальной фракции мозга снижается по мере усиления тяжести кислородной интоксикации, что сопровождается изменением субстратной специфичности фермента и выходом его в цитоплазму. Полученные данные свидетельствуют о нарушении структуры и проницаемости мембран при острой гипероксии.

Важнейшими пусковыми универсальными механизмами в развитии кислородной интоксикации являются усиление свободнорадикальных процессов и повышение интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ), ведущие прежде всего к изменению состояния мембранных структур и модификации свойств мембранных ферментов. Усиление ПОЛ при параллельном снижении антиокислительной активности липидов при гипероксии наблюдали в мозгу, легких, сердце, печени, почках, селезенке, эритроцитах [1, 2]. Ранее нами установлены в условиях гипероксии существенные изменения каталитических свойств МАО [амин:кислород-оксидоредуктаза (дезаминирующая) (флавиносодержащая), КФ 1.4.3.4], ведущего фермента моноаминергических медиаторных систем [3]. МАО является типичным митохондриальным ферментом; он локализован на наружной мембране митохондрий и рассматривается в качестве ее маркерного фермента [4]. При гипероксии изменяется также активность других мембраносвязанных ферментов— Mg^{2+} -АТФазы и K^{+} , Na^{+} -АТФазы [5, 6].

В настоящей работе сопоставлены результаты электронномикроскопических исследований в структурах среднего мозга и больших полушарий головного мозга с активностью митохондриальной МАО.

Поскольку в мозгу различают две формы фермента—МАО типа А (ингибитор хлоргиллин, основные субстраты серотонин и норадреналин) и МАО типа В (ингибитор депренил, субстраты бензиламин, β -фенилэтиламин и метилгистамин) [7], исследовали влияние гипероксии на активность обеих форм фермента.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на взрослых беспородных белых крысах обоего пола массой 150—180 г. Исследовали влияние на животных трех режимов гипероксии: 0,2 МПа O_2 в течение 1 ч, 0,3 МПа O_2 в течение 2 ч, 0,7 МПа O_2 до наступления судорог (в среднем 30 мин). Заданные условия гипероксии создавали в специальной барокамере, снабженной щелочным поглотителем углекислоты, при постоянном режиме компрессии и декомпрессии 0,2 МПа в 1 мин.

Животных декапитировали и все последующие процедуры вели на холоду. Для электронно-микроскопического исследования кусочки мозга объемом до 1 мм³, извлеченные из области коры больших полушарий и крыши среднего мозга, фиксировали в глутаральдегиде на фосфатном буфере по Зеренсену и затем в OsO_4 по Милонингу. Заливку материала проводили в эпон-аралдит. Ультратонкие срезы, полученные на ультрамикротоме Bs-490 А («Tesla», ЧССР), дополнительно окрашивали в солях свинца по Рейнольдсу и в уранилацетате [8]. Срезы исследовали в электронном микроскопе Bs-242 («Tesla», ЧССР).

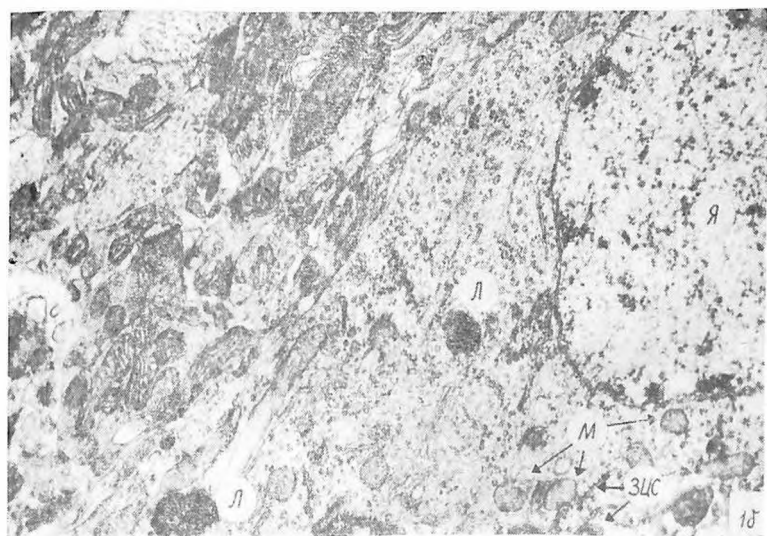
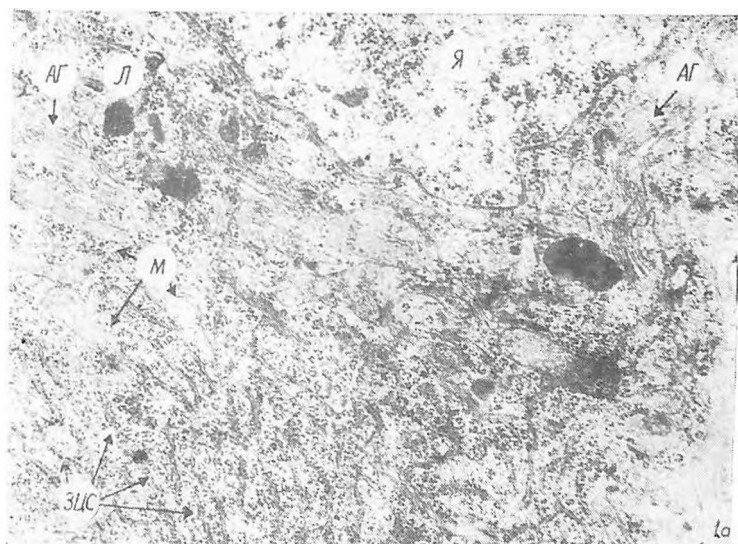
Активность МАО определяли в митохондриальной фракции и супернатанте, полученном после осаждения митохондрий при 20000 g, 20 мин. Мозг гомогенизировали в 0,2 М растворе сахарозы, приготовленном на 0,02 М фосфатном буфере pH 7,45. Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования [9]. В ряде опытов исследовали активность МАО в коре больших полушарий головного мозга и среднем мозгу. Мозг разделяли по Glowinski, Iversen [10]. Активность МАО типа А (субстраты серотонин и норадреналин), а также дезаминирование глюкозамина, путресцина, ГАМК и АМР определяли по освобождению аммиака после инкубации суспензии митохондрий или супернатанта с одним из субстратов в насыщающей концентрации (для серотонина—2,5 мМ, для остальных субстратов—10 мМ). Инкубацию проводили в воздушной среде при 37,5° и pH 7,45 в течение 30 мин [11]. Содержание аммиака определяли спектрофлуориметрическим методом на флуориметре марки «Hitachi» 650—60 [12] после изотермической отгонки [13]. Активность МАО типа В исследовали колориметрическим методом с использованием в качестве субстрата *p*-нитрофенилэтиламин [9]. Белок определяли по модифицированному методу Lowry [14].

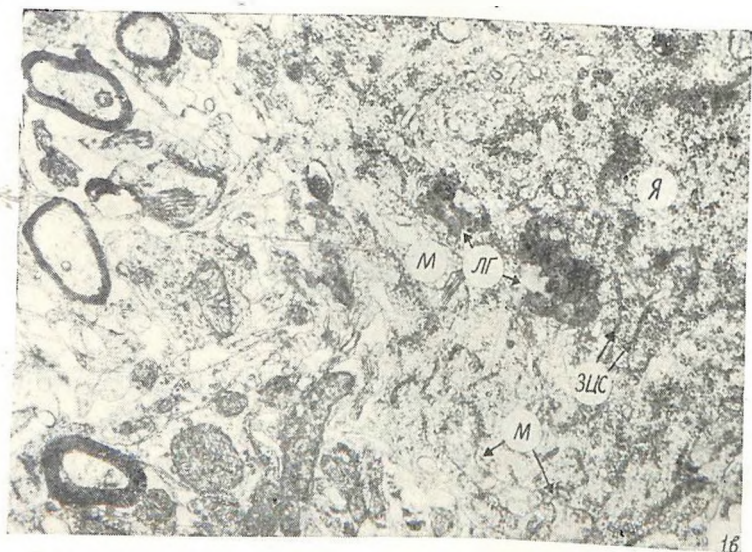
При исследовании влияния ингибиторов МАО хлоргиллина и депренила* суспензию митохондрий или супернатант преинкубировали с одним из ингибиторов в течение 15 мин при 20°. Ингибиторы использовали в концентрации 10^{-6} М, при которой они обладают максимально избирательным действием [7].

Результаты и обсуждение

Электронно-микроскопические исследования показали, что при действии на животных 0,2 МПа O_2 в течение 1 ч изменений в ультраструктуре нейронов как среднего мозга, так и коры больших полушарий не обнаруживается; лишь в отдельных клетках наблюдается незначительное набухание митохондрий.

* Хлоргиллин и депренил были любезно предоставлены В. З. Горкиным (Институт биологической химии АМН СССР, Москва).





Пирамидный нейрон коры среднего мозга крысы в контроле (а), после действия 0,3 МПа кислорода (б), 0,7 МПа кислорода (в) $\times 35000$. АГ—аппарат Гольджи, Л—лизосомы, ЛГ—лизофусиновая гранула, М—митохондрия, ЗЦС—зернистая цитоплазматическая сеть, Я—ядро.

2-часовое воздействие 0,3 МПа O_2 выявило существенные изменения ультраструктуры внутриклеточных органоидов (рис. 1, б). Митохондрии в большинстве своем выглядят более электронноплотными, чем в контроле (рис. 1, а). Канальцы эндоплазматической сети несколько набухшие, укорочены и беспорядочно расположены по всей цитоплазме. Уменьшается число небольших вакуолей, заполненных электронноплотным содержимым. Ядро выглядит более просветленным.

Наиболее выраженные изменения ультраструктуры нейронов обнаружены при анализе препаратов мозга в судорожной фазе кислородной интоксикации—при действии на животных 0,7 МПа O_2 (рис. 1, в). Митохондрии набухают, число крист в них снижается, в некоторых митохондриях наблюдается полное разрушение крист, снижается электронная плотность матрикса. Лизосомоподобных структур не отмечается, зато в изобилии встречаются липофусциновые гранулы размером до 2 мкм. Канальцы эндоплазматической сети немногочисленны и дезориентированы. Пузырьки и вакуоли эндоплазматической сети и аппарата Гольджи значительно набухают.

Следует отметить значительные различия в индивидуальной чувствительности животных к действию повышенного давления кислорода. Об этом свидетельствуют как различия во времени наступления судорог, так и результаты электронно-микроскопического исследования. Если у одних животных существенные повреждения внутриклеточных органоидов, степень выраженности которых в ряде случаев несовместима с жизнью, наблюдаются во всех исследованных клетках, то у других, наряду со значительно поврежденными клетками, встречаются отдельные нейроны с малоповрежденной структурой.

Существенные изменения в ультраструктуре нейронов коры больших полушарий и клеток печени в условиях острой гипероксии обнаружены также Масловой и соавт. [15]. Установлены также изменения под влиянием гипероксии ультраструктуры сердечной мышцы [16].

Результаты исследования активности МАО при разных режимах гипероксии представлены в табл. 1. Активность МАО типа А достоверно не изменяется при действии на животных 0,2 МПа O_2 в течение 1 ч, а в условиях 2-часового действия 0,3 МПа O_2 снижается на 41% с норадреналином в качестве субстрата и на 47%—с серотонином. В судорожную фазу кислородной интоксикации дезаминирование норадреналина снижается в среднем на 68%, серотонина—на 74%. причем почти у половины исследованных животных наблюдается полное ингибирование активности фермента. При этом выявлены различия чувствительности к гипероксии фермента в зависимости от локализации. В среднем мозгу наблюдается 100%-ное ингибирование активности МАО типа А у всех исследованных животных. В коре же больших полушарий лишь у 3-х животных из 12-ти имеет место полное ингиби-

рование активности фермента, у остальных же активность МАО типа А снижается в среднем на 29% ($p < 0,02$).

Активность МАО типа Б, непосредственно не связанная с обменом медиаторов, не изменяется даже в судорожную фазу гипероксии. Ранее нами было показано, что снижение активности МАО типа А в предсудорожную и судорожную фазы кислородной интоксикации сопровождается появлением в митохондриальной фракции способности дезаминировать аминсахара, путресцин, ГАМК и двукратным усилением интенсивности дезаминирования АМР [3, 17].

Таблица 1

Активность МАО типа А митохондрий мозга при гипероксии (в нмоль азота аммиака/мг белка/мин)

Субстраты дезаминирования	Условия опыта			
	контроль	0,2 МПа, 1 ч	0,3 МПа, 2 ч	0,7 МПа, судороги
Серотонин	8,50±0,33 (18)	7,33±0,70 (10) $p > 0,05$	4,47±0,27 (8) $p < 0,001$	2,20±0,49 (19) $p < 0,001$
Норадреналин	5,57±0,17 (27)	4,93±0,57 (11) $p > 0,05$	3,30±0,30 (8) $p < 0,001$	1,76±0,45 (21) $p < 0,001$

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3 в скобках указано число опытов. p —достоверность отличий от контроля.

Как видно из табл. 2, блокирование каталитического центра МАО типа А при преинкубации с избирательно действующим ингибитором МАО типа А хлоргилином, предотвращает усиление интенсивности дезаминирования глюкозамина и путресцина и не влияет на увеличение интенсивности дезаминирования АМР. Преинкубация с ингибитором МАО типа Б депренилом не оказывает влияния ни на дезаминирование глюкозамина и путресцина, ни на дезаминирование АМР. Следовательно, появление в митохондриальной фракции в условиях гипероксии глюкозамин- и путресциндеаминазной активности обусловлено качественным изменением каталитических свойств (трансформацией) МАО типа А, сходным с обнаруженным при целом ряде других патологических состояний: облучении, злокачественном росте, гипервитаминозе D_2 [18], холодовом стрессе [19], гипоксии [20]. Усиление дезаминирования АМР в условиях гипероксии так же, как и при холодовом стрессе [19], не связано с МАО.

Изменение каталитических свойств МАО при гипероксии может быть обусловлено нарушением связи фермента с митохондриальными мембранами и выходом его в цитоплазму. В этой связи исследовали интенсивность дезаминирования серотонина и глюкозамина в супернатанте, полученном после осаждения митохондрий. Из табл. 3 видно, что в условиях гипероксии (судорожная фаза) в супернатанте появляется способность дезаминировать со значительной скоростью

серотонин и глюкозамин. Интенсивность дезаминирования серотонина возрастает более чем в 4 раза, дезаминирования глюкозамина—почти в 15 раз. Преинкубация с хлоргилином препятствует увеличению интенсивности дезаминирования серотонина и глюкозамина, что свидетельствует о моноаминоксидажном происхождении индуцируемой в супернатанте активности. Активность МАО типа Б не изменяется в супернатанте при гипероксии.

Таблица 2

Влияние ингибиторов МАО (в нмоль азота аммиака/мг белка/мин)
на дезаминирование некоторых азотистых соединений митохондриями мозга при гипероксии (0,7 МПа судороги)

	Субстраты дезаминирования				
	п-нитрофенил-этиламин	серотонин	глюкозамин	АМФ	путресцин
Контроль	3,43±0,16 (14)	8,42±0,54 (11)	0,54±0,24 (13)	2,45±0,31 (11)	0,59±0,24 (11)
Без ингибитора	2,78±0,20 (8)	4,85±0,58 (9)	5,48±0,95 (9)	5,09±0,62 (9)	2,48±0,48 (8)
Хлоргилин	2,72±0,20 (8)	0,011±0,007 (9)	1,72±0,72 (9)	5,71±0,68 (9)	1,06±0,23 (7)
Депренил	p>0,05 0,28±0,09 (8)	p<0,001 4,05±0,49 (9)	p<0,01 4,35±1,00 (8)	p>0,05 5,72±0,66 (8)	p<0,05 2,21±0,28 (9)
	p<0,001	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05

Процесс снижения активности МАО типа А в митохондриях и возникновение ее в супернатанте позволяет считать, что одним из механизмов ингибирования этого фермента в условиях гипероксии является его выход в супернатант в результате деструкции митохондриальных мембран. Отсутствие изменений активности МАО типа Б подтверждают имеющиеся в литературе данные о значительно большей зависимости МАО типа А по сравнению с МАО типа Б от липидного микроокружения и целостности митохондриальных мембран [21].

Полученные нами данные свидетельствуют о сопоставимости результатов электронной микроскопии и исследования активности МАО при разных режимах гипероксии. При 1-часовом воздействии 0,2 МПа O₂ не обнаружено ни нарушения ультраструктуры внутриклеточных органондов, ни изменения активности маркерного фермента митохондрий. При 2-часовом воздействии 0,3 МПа O₂ наблюдаются как изменения в ультраструктуре нейронов, так и снижение активности МАО. Однако они относительно незначительны и, по-видимому, обратимы. Первый режим гипероксии повсеместно используется в клинической практике. Полученные нами данные подтверждают отсутствие структурных изменений в головном мозгу при данном режиме. Второй режим приводит организм в состояние компенсаторной фазы кислородной интоксикации и не вызывает несовместимых с жизнью изменений

в структуре и метаболизме клеток. В судорожной фазе кислородной интоксикации имеют место как ярко выраженное нарушение ультраструктуры внутриклеточных органоидов, так и значительное изменение каталитических свойств МАО. Судорожная фаза гипероксии приводит к гибели до 30% исследуемых животных. Продолжение экспозиции при данном режиме гипероксии вызывает гибель всех животных.

Таблица 3

Деаминазирование серотонина и глюкозамина в супернатанте мозга при гипероксии и влияние хлоргиллина (в нмоль азота аммиака/мг белка/мин)

Субстраты деамина- рования	Условия опыта		
	контроль	0,7 МПа, судороги	0,7 МПа, судоро- ги+хлоргиллин
Серотонин	$0,347 \pm 0,12$ (16)	$1,49 \pm 0,12$ (16) $p < 0,001$	$0,03 \pm 0,01$ (5) $p > 0,05$
Глюкозамин	$0,13 \pm 0,04$ (14)	$1,82 \pm 0,23$ (9) $p < 0,001$	$0,21 \pm 0,11$ (5) $p > 0,05$

Структуры среднего мозга более чувствительны к действию гипероксии по сравнению с корой больших полушарий, что подтверждают как данные электронной микроскопии, так и результаты исследования МАО. Это согласуется с ведущей ролью мезодienceфального отдела в развитии судорожной активности при гипероксии [22, 23].

Выраженные изменения ультраструктуры митохондрий наблюдаются только в соме нейронов; митохондрии, расположенные в отростках нейронов, не повреждаются. Это же отмечали и другие исследователи [15]. Следовательно, можно полагать, что под влиянием гипероксии изменяются в основном свойства МАО, локализованной в соме нейронов.

Изменение каталитических свойств МАО связывают с окислением сульфгидрильных групп фермента липидными перекисями [18]. Результаты данной работы, показавшие возможность выхода митохондриальной МАО в супернатант и ярко выраженные изменения ультраструктуры митохондрий, свидетельствуют об определенном вкладе в изменение каталитической активности МАО нарушения связи фермента с наружной митохондриальной мембраной, также, очевидно, обусловленного в значительной степени перекисным окислением мембранных липидов. На важную роль липидов наружной мембраны митохондрий в функционировании МАО в клетке указывают данные Бурлаковой и соавт. по изучению влияния модификации состава и свойств липидов на активность и кинетические параметры фермента [24].

В ходе реакций, катализируемых МАО, возможна инициация ПОЛ. При этом наиболее активная стимуляция ПОЛ имеет место в системе с субстратами МАО типа Б и с субстратами трансформированной МАО типа А; серотонин, напротив, дает антиоксидантный эффект [25]. Представленные в настоящей работе результаты свидетельствуют о том, что в условиях гипероксии происходит трансформация МАО типа А, активность МАО типа Б остается на контрольном уровне, а дезаминирование серотонина в митохондриальной фракции резко снижается. Следовательно, при гипероксии создаются условия для усиления ПОЛ: системы, оказывающие стимулирующее действие на ПОЛ (дезаминирование МАО типа А необычных субстратов и субстратов МАО типа Б), активно функционируют, а система, обладающая антиоксидантным действием (дезаминирование серотонина), ингибируется. Таким образом, в условиях гипероксии возникает «порочный цикл», играющий важную роль в развитии патологий: инициация ПОЛ под действием активных форм кислорода вызывает трансформацию МАО, в результате чего усиливается ПОЛ, которое, в свою очередь, вызывает дополнительную трансформацию МАО, следовательно, лавинообразное накопление продуктов ПОЛ в биомембранах.

Обнаруженные изменения в ультраструктуре клеток головного мозга и каталитических свойствах МАО—одного из ключевых ферментов медиаторного обмена—отражают происходящие в организме нарушения метаболизма и вносят существенный вклад в развитие кислородной интоксикации.

MONOAMINE OXIDASE ACTIVITY AND BRAIN ULTRASTRUCTURE IN RATS UNDER DIFFERENT OXYGEN EXPOSITIONS

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

State University, Rostov-on-Don

Electron-microscopic study of rat brain during convulsive phase of hyperbarooxygenation reveals significant changes in brain cortex and midbrain neuronal ultrastructure such as mitochondrial swelling, decrease in crist number, desorientation of crists and disappearance of lysosomes. In compensator phase of hyperbarooxygenation changes in neuronal ultrastructure are less pronounced. Oxygen intoxication inhibits mitochondrial monoamine oxidase type A activity; alters its substrate specificity and leads to a leakage of mitochondrial enzyme in cytosol. Data obtained suggest membrane structure damage under hyperoxia.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Jerrett S. A., Jefferson D., Mengel C. E.* *Aerosp. Med.*, v. 44, p. 40—44, 1973.
2. *Габитов М. М., Карагезян К. Г.* *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, т. 91, с. 682—684, 1981.
3. *Горошинская И. А.* *Вопр. мед. химии*, т. 25, с. 328—329, 1979.
4. *Greenawalt J. W., Schnaiman C. J.* *Gell. Biol.*, v. 46, p. 173—179, 1970.
5. *Мацынин В. В.* *Укр. биохим. журн.*, т. 46, с. 561—563, 1974.
6. *Шерстнева И. Я., Броницкая З. Г.* *Укр. биохим. журн.*, т. 48, с. 417—420, 1976.
7. *Yang H. Y., Neff N. A. J.* *Pharmacol. and Expt. Ther.*, v. 187, p. 365—371, 1973.
8. *Гайэр А.* *Электронная гистохимия*, М., Мир, 1973.
9. *Москвитина Г. А.*—В кн.: *Современные методы в биохимии* (под ред. В. Н. Ореховича), с. 22—26, М., Медицина, 1977.
10. *Glowinski J., Iversen L. L. J.* *Neurochem.*, v. 13, p. 655—669, 1966.
11. *Горкин В. З., Веревокина Н. В., Гряднева Л. И., Жердева (Брускова) Л. В., Клешторин Л. Б., Кривченко Р. С., Комиссарова Н. В., Леонтьева Г. А., Романова Л. А., Северина Н. С., Фейгина С. М.*—В кн.: *Современные методы в биохимии* (под ред. В. Н. Ореховича), с. 155—177, М., Медицина, 1968.
12. *Sugawara K., Oyama F. J.* *Biochem.*, v. 89, p. 771—774, 1981.
13. *Selegson D., Selegson H. J.* *Lab. Clin. Med.*, v. 38, p. 324—330, 1951.
14. *Schaetler G. R., Pollack R. L.* *Anal. Biochem.*, v. 51, p. 654—655, 1973.
15. *Маслова М. Н., Озирская Е. В., Резник Л. В.* *Цитология*, т. 15, с. 16—21, 1973.
16. *Деклева Н. В.*—В кн.: *Гипербарическая медицина. Материалы VII Международного конгресса, Москва, 2—6 сентября 1981*, т. 2, с. 122—125, М., Наука, 1983.
17. *Горошинская И. А., Грабовская Л. Л., Броницкая З. Г., Кричевская А. А.* *Физиол. журн.*, т. 67, с. 1611—1616, 1981.
18. *Горкин В. З.* *Молекулярн. биология*, т. 10, с. 717—736, 1976.
19. *Горошинская И. А., Кричевская А. А., Броницкая З. Г.* *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, т. 91, с. 431—433, 1981.
20. *Горошинская И. А., Броницкая З. Г., Кричевская А. А., Кабарухина Е. Г.* *Нейрохимия*, т. 1, с. 282—286, 1982.
21. *White H. L., Stine D. K. J.* *Neurochem.*, v. 38, p. 1429—1436, 1982.
22. *Зальцман Г. Л.*—В сб.: *Гипербарические эпилепсия и наркоз*, с. 129—136, Л., Наука, 1968.
23. *Агаджанян Н. А., Калужный Л. В.* *Успехи физиол. наук*, т. 1, № 2, с. 26—40, 1970.
24. *Бурлакова Е. Б., Кайране Ч. Б., Молочкина Е. М., Хохлов А. П.* *Вопр. мед. химии*, т. 30, с. 66—72, 1984.
25. *Каган В. Е., Смирнов А. В., Савов В. М., Горкин В. З.* *Вопр. мед. химии*, т. 30, с. 112—118, 1984.

Поступила 19. VIII 1985.



КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 612.822.1

ДЕЙСТВИЕ НЕЙРОГОРМОНА «С» НА СИНТЕЗ, ЗАХВАТ И ВЫСВОБОЖДЕНИЕ КАТЕХОЛАМИНОВ В МОЗГУ КРЫС

ГАЛОЯН А. А., ЧИФЛИКЯН М. Д., МУРАДЯН М. Ш., ЕДИГАРЯН А. К.,
АБРАМЯН С. С.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

В течение ряда лет нами проводятся исследования механизмов образования и действия новой группы органотропных нейрогормонов—нейропептидов, продуцируемых в магнoцеллюлярных ядрах гипоталамуса [1—3]. В частности, показано, что кардиотропный нейрогормон «С» оказывает влияние на сердечное кровообращение путем ингибирования фосфодиэстеразы (ФДЭ) циклических нуклеотидов [4]. Нейрогормон «С» изменяет сродство ряда важных ферментов и белков к ионам кальция (неопубликованные данные), что отражается на метаболизме циклических нуклеотидов. Исходя из этого, можно предположить участие катехоламинов в реализации действия нейрогормона «С» на обменные процессы и функции мозга и сердца.

В настоящем сообщении приводятся данные о действии нейрогормона «С» на синтез ^{14}C -дофамина и ^{14}C -норадреналина из ^{14}C -тирозина в срезах гипоталамуса и полосатого тела мозга крыс, а также на захват ^3H -дофамина и ^3H -норадреналина и на K^+ -вызванное высвобождение ^3H -дофамина.

Белых крыс массой 180—200 г декапитировали, извлекали мозг и на льду изолировали гипоталамическую область и полосатое тело.

При исследовании синтеза ^{14}C -дофамина и ^{14}C -норадреналина навески срезов (50 мг) преинкубировали в Кребс-бикарбонатном буфере, содержащем ингибитор МАО—ипразид ($3.6 \cdot 10^{-4}\text{M}$), АТР ($9 \cdot 10^{-5}\text{M}$) при 37° , pH—7.2, аэрируемом смесью O_2 с CO_2 (95:5%) в течение 20 мин, затем инкубировали 30 мин в присутствии нейрогормона «С» и еще 30 мин с добавлением радиоактивного предшественника синтеза катехоламинов— ^{14}C -тирозина в концентрации $3.3 \cdot 10^{-5}\text{M}$ (У. А. 333,3 мКи/ммоль). Далее срезы гомогенизировали в 5 мл холодной 0,2 М HClO_4 с 0,5%-ЭДТА. Через 30 мин пробы центрифугировали в течение 20 мин при 9000 g и супернатант нейтрализовали 3 н. Na_2CO_3 до pH 6—6,5. Хроматографическое разделение в нем катехоламинов проводили на колонках с ионообменной смолой Dowex $50\text{w} \times 16$ (20—50 меш) и $50\text{w} \times 8$ (400 меш) в натриевой форме [5, 6]. Расчет скорости синтеза катехоламинов проводили по уравнению:

$$V = \frac{A \cdot 1000 \cdot 2}{B \cdot 2 \cdot 10^6}$$

где V—скорость синтеза, выраженная в моль/г свежей ткани/1 ч инкубации; А—содержание исследуемого вещества, выраженное в распадах в мин; В—масса ткани в мг; В—величина У. А. в мКи/ммоль.

При исследовании захвата ^3H -норадреналина и ^3H -дофамина срезы гипоталамуса и полосатого тела мозга (15 мг) инкубировали 5 мин в Кребс-бикарбонатном буфере при 37 и 0°, 30 мин—с ^3H -норадреналином (10–7 М, У. А. 35 Ки/ммоль) или с ^3H -дофамином (10–7 М, У. А. 9,3 Ки/ммоль) в присутствии нейрогормона «С».

При исследовании действия нейрогормона «С» на K^+ -вызванное высвобождение ^3H -дофамина срезы полосатого тела мозга (15 мг) инкубировали 30 мин в присутствии ^3H -дофамина (10–7 М) при 37° под непрерывной струей смеси O_2 с CO_2 , затем промывали 5 мл 0,9 М NaCl, далее 20 мин—буфером со скоростью 1 мл/мин. На 26-й мин суперфузии срезов добавляли 40 мМ K^+ с нейрогормоном «С» или без него. Суперфузионные фракции собирали каждые 2 мин. Радиоактивность проб измеряли на сцинтилляционном счетчике «Inter technique 4221» (Франция).

Стандартизацию активности нейрогормона «С» проводили по способности гормона ингибировать ФДЭ сАМР мозга крыс, которую определяли по количеству гидролизованного субстрата ^3H -сАМР при его инкубации с ферментом методом восходящей ТСХ на силикагеле [7], модифицированному нами [8]. За единицу активности нейрогормона «С» принимали активность препарата, ингибирующего 1 миллиединицу ФДЭ мозга крыс в мин в мл при 37°.

Исследовали влияние нейрогормона «С» на синтез ^{14}C -дофамина и ^{14}C -норадреналина из ^{14}C -тирозина в гипоталамических срезах в дозах 1–40 миллиединиц/мл. Опыты показали, что наиболее эффективные дозы нейрогормона «С»—1,6 и 16 миллиединиц/мл. Скорость синтеза ^{14}C -дофамина и ^{14}C -норадреналина составляла $3,14 \pm$

Таблица 1

Действие нейрогормона «С» на синтез ^{14}C -дофамина и ^{14}C -норадреналина из С-тирозина в срезах гипоталамуса и полосатого тела мозга крыс

Условия опыта	Гипоталамус		Полосатое тело	
	дофамин $\cdot 10^{-10}$ моль/г/ч	норадреналин $\cdot 10^{-10}$ моль/г/ч	дофамин $\cdot 10^{-10}$ моль/г/ч	норадреналин $\cdot 10^{-10}$ моль/г/ч
Контроль	$3,14 \pm 0,47$ (6)	$3,54 \pm 0,66$ (6)	$4,13 \pm 0,97$ (4)	$2,94 \pm 0,66$ (6)
Нейрогормон «С»				
1,6 миллиединицы/мл	$22,9^* \pm 3,2$ (6)	$22,8^* \pm 4,8$ (6)	$7,08^* \pm 0,87$ (5)	$6,19^* \pm 0,55$ (5)
2 миллиединицы/мл				
16 миллиединицы/мл	$0,53^* \pm 0,024$ (3)	$0,48^* \pm 0,043$ (3)	$69,7^* \pm 18,5$ (5)	$142,3^* \pm 43,6$ (5)
20 миллиединицы/мл				

Примечание. В скобках—число опытов. $p^* < 0,001$

$0,47 \cdot 10^{-10}$ моль/г/ч и $3,54 \pm 0,66 \cdot 10^{-10}$ моль/г/ч (табл. 1). Нейрогормон «С» (1,6 миллиединицы/мл) увеличивал скорости синтеза дофамина и норадреналина в 7,3 и 6,4 раза соответственно. С увеличением его дозы (16 миллиединицы/мл) наблюдалось торможение синтеза как дофамина, так и норадреналина в 7,4 и 5,9 раза соответственно. При изучении синтеза ^{14}C -дофамина и ^{14}C -норадреналина под действием нейрогормона «С» в срезах полосатого тела мозга крыс было выявлено его стимулирующее дозозависимое влияние на эти

процессы. Установили, что нейрогормон «С» в дозах 2 и 20 миллиединиц/мл увеличивал синтез ^{14}C -дофамина в 1,7 и 16 раз, а синтез ^{14}C -норадреналина—в 2,1 и 48 раз соответственно (табл. 1).

Для выяснения функциональной значимости этих изменений в следующей серии опытов изучали действие нейрогормона «С» на захват ^3H -дофамина и ^3H -норадреналина в срезах гипоталамуса и полосатого тела мозга крыс. Было установлено, что захват ^3H -дофамина в гипоталамических срезах был гораздо менее интенсивен, чем в срезах полосатого тела, что соответствует большей плотности распределения дофаминергических нервных окончаний в полосатом теле [9]. Нейрогормон «С» (2 и 20 миллиединиц/мл) не влиял на захват ^3H -дофамина в срезах гипоталамуса и полосатого тела, а также на захват ^3H -норадреналина в гипоталамических срезах.

В серии опытов со срезами полосатого тела, предварительно инкубированными с ^3H -дофамином, изучали действие нейрогормона «С» на K^+ -вызванное высвобождение нейротрансмиттера. Показано, что 40 мМ K^+ вызывает увеличение высвобождения ^3H -дофамина на 153% относительно спонтанного высвобождения (табл. 2). Нейрогормон «С» (2 миллиединицы/мл) вызывает статистически недостоверное увеличение K^+ -вызванного высвобождения ^3H -дофамина на 17%, а в дозе 20 миллиединиц/мл—ингибирование этого процесса на 47% ($p < 0,05$). На основании этих данных можно предполагать, что нейрогормон «С» модулирует дофаминергическую трансмиссию в полосатом теле мозга крыс.

Таблица 2

Действие нейрогормона «С» на K^+ -вызванное высвобождение ^3H -дофамина из срезов полосатого тела мозга крыс.

Условия опытов	^3H -дофамин распады/мин/фракцию
Спонтанное высвобождение	2218 $\pm$ 214 (9)
40 мМ K^+	5612 $\pm$ 721 (3)
40 мМ K^+ + нейрогормон «С» (2 миллиединицы/мл)	6601 $\pm$ 380 (2)
40 мМ K^+ + нейрогормон «С» (20 миллиединиц/мл)	2975 $\pm$ 192 (4)

Примечание. В скобках—количество опытов. * $p < 0,05$

В литературе имеются многочисленные данные относительно прямой или опосредованной модуляции дофаминергической трансмиссии в полосатом теле мозга крыс на пресинаптическом уровне [10]. Однако надо заметить, что все возможные нейротрансмиттеры, за исключением серотонина [11], увеличивают как спонтанное, так и вызванное высвобождение дофамина в срезах полосатого тела мозга крыс.

Значительный интерес представляют полученные нами результаты, свидетельствующие об увеличении синтеза норадреналина под действием нейрогормона «С» в полосатом теле мозга крыс, для которого при высокой плотности β -адренергических рецепторов [12] характерна слабая норадренергическая иннервация [9, 13].

Сопоставляя данные относительно действия нейрогормона «С» на синтез, захват и высвобождение катехоламинов, трудно говорить о кор-

реляции этих процессов. Однако полученные результаты дают основание предполагать, что между нейрогормоном «С» и биосинтезом катехоламинов в некоторых структурах мозга существуют определенные функциональные и биохимические взаимоотношения, направленные на регуляцию функций эндокринных и висцеральных органов. Для выяснения молекулярных механизмов столь разительного усиления биосинтеза норадреналина и дофамина как в полосатом теле, так и в гипоталамических ядрах необходимо исследовать скорость обновления катехоламинов под действием нейрогормона «С», а также биосинтез катехоламинов в условиях *in vivo*.

ACTION OF NEUROHORMONE „C“ ON THE SYNTHESIS, UPTAKE AND RELEASE OF CATECHOLAMINES IN RAT BRAIN

GALOYAN A. A., CHIFLIKIAN M. D., MURADIAN M. SH.,
EDIGARIAN A. K., ABRAHAMIAN S. S.

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

Data obtained indicate that neurohormone „C“ causes a dose-dependent different alteration in the rate of synthesis of ^{14}C -dopamine and ^{14}C -noradrenaline from ^{14}C -tyrosine in the hypothalamic slices. In the striatal slices a stimulation of catecholamines synthesis is observed. We found that neurohormone „C“ does not alter dopamine and noradrenaline uptake in striatal and hypothalamic slices. It has been shown that neurohormone „C“ decreases K^+ -evoked release of dopamine from striatal slices in dose-dependent manner. It may be proposed that neurohormone „C“ plays an important role in the regulation of catecholamines biosynthesis in striatum and hypothalamus.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Галоян А. А. *Вопр. биохимии мозга*, Ереван, Изд. АН АрмССР, т. 13 с. 9—14, 1978.
2. Galoyan A. A. *Ergebnisse der experimentellen Med.*, v. 22, p. 99 1878.
3. Galoyan A., Srapionian R. *Neurochem. Res.*, v. 8, № 12, p. 1511—1535, 1983.
4. Galoyan A. A., Gurvitz B., Saribekian G. A., Kirakosova A. S. *Cyclic Nucleotides and Therapeutic Perspectives* (G. Cehovic, G. A. Robinson eds.), Pergamon Press, N. Y., p. 165—181, 1979.
5. Bertler A., Carlsson A., Rosengren E. *Acta physiol. scand.*, v. 44, p. 273—280, 1958.
6. Волина Е. В., Манухин Б. Н. *Физиол. журн. СССР*, т. 61, № 4, с. 569—574, 1975.
7. Pösch G., Kukovetz W. R. *Life Sci.*, v. 10, p. 133—141, 1971.
8. Гурвиц Б. Я., Сарибекян Г. А., Сомова Е. С., Галоян А. А. *Докл. АН АрмССР*, т. 64, № 5, с. 290—295, 1978.
9. Fuxe K., *Acta physiol. scand., Suppl.*, v. 247, № 61, p. 39—64, 1965.
10. Chesselet M.—F., Cheramy A., Relsine T., Lubetzki C., Glowinski J. *J. Physiol.*, Paris, v. 78, p. 420—425, 1982.
11. Ennis C., Kemp J. D., Cox B. J. *Neurochem.* v. 36, p. 1515—1520, 1981.
12. Bylund D. B., Snyder S. H. *Mol. Pharmacol.*, v. 12, p. 563—580, 1976.
13. Lindvall O., Bjorklund A. *Acta Physiol. Scand., Suppl.* v. 412, p. 1—43, 1974.

Поступила 10. X. 1985.



УДК 612.821

ВЛИЯНИЕ ДИБУТИРИЛ cAMP И ФОРСКОЛИНА НА ВЫСВОБОЖДЕНИЕ ^3H -ГЛУТАМАТА И ^3H -ДОФАМИНА ИЗ НЕОСТРИАТУМА МОЗГА КРЫСЫ

ГОДУХИН О. В.

Институт биологической физики АН СССР, г. Пушкино

При изучении молекулярных механизмов пресинаптической регуляции высвобождения нейротрансмиттеров важное значение имеет выяснение роли циклических нуклеотидов, в частности cAMP, в этих механизмах. Хотя по гистологическим данным аденилатциклаза и cAMP локализованы в основном в телах интернейронов неостриатума [1], небольшой уровень аденилатциклазной активности обнаруживается и в пресинаптических окончаниях нейронов этой структуры мозга [2].

Известно, что унилатеральная электрическая стимуляция глутаматергических кортикостриатных и дофаминергических нигростриатных нейронов вызывает значительное повышение уровня cAMP в неостриатуме [3]. Однако связано ли это с высвобождением глутамата и дофамина из соответствующих окончаний—остается неясным.

Целью настоящей работы было изучение влияния липофильного аналога cAMP—дibuтирил-cAMP и прямого активатора аденилатциклазы форсколина на спонтанное и вызванное K^+ -деполяризацией высвобождение ^3H -глутамата и ^3H -дофамина из неостриатума мозга крыс.

В опытах была использована методика локальной суперфузии мозга крыс (линии Wistar, масса 250—300 г). На шестой день после предварительной операции, в ходе которой животным в неостриатум вживляли направляющую трубку, через неё микрошприцем вводили 3 мкл ^3H -глутамата (У. А. 29 Ки/ммоль, «Amersham», Англия), либо 3 мкл ^3H -дофамина (У. А. 35 Ки/ммоль, «Amersham», Англия). Во время эксперимента животные находились под нембуталовым наркозом (35 мг/кг, внутривенно). Через 20 мин после введения препаратов (время, необходимое для захвата ^3H -глутамата и ^3H -дофамина клеточными элементами) осуществляли посредством пуш-пул канюли суперфузию неостриатума раствором Кребса-Рингера следующего состава (мМ): NaCl—126,5; KCl—2,4; CaCl_2 —1,1; KH_2PO_4 —0,5; NaHCO_3 —27,5; MgSO_4 —1,1; глюкоза—5,9. В опытах с ^3H -дофамином в суперфузат добавляли также ингибитор МАО ниналамид (10^{-6} М). Раствор Кребса-Рингера насыщали газовой смесью O_2/CO_2 (95%/5%) до pH 7,4. Скорость суперфузии

равнялась 50 мкл/мин. Через 60 мин (в опытах с ^3H -глутаматом) и 1 ч 50 мин (в опытах с ^3H -дофамином) после начала суперфузии собирали 3 последовательные 20-минутные фракции суперфузата в пробирки с охлажденным (40°) раствором Кребс-Рингера (200 мкл). Радиоактивность ^3H -глутамата и ^3H -дофамина в первой собранной фракции принимали за 100% и относительно неё оценивали уровни радиоактивных нейротрансмиттеров в последующих двух фракциях (2 и 3). Изменение ионного состава среды (K^+ -деполяризация) и добавление в среду форсколина и дибутирил сАМР производили во время прохождения 2-ой фракции через мозг. Во время прохождения 3-й фракции («отмывка») состав суперфузионной среды возвращался к норме. В опытах с ^3H -глутаматом в пробирки добавляли нерадиоактивный глутамат (конечная концентрация 10–5 М), а в опытах с ^3H -дофамином—смесь, состоящую из нерадиоактивного дофамина (0,005%), аскорбиновой кислоты (6%) и ЭДТА (0,2%). Для очистки ^3H -глутамата и ^3H -дофамина от радиоактивных метаболитов использовали ионообменную хроматографию.

Подробнее методика эксперимента и процедура очистки описана нами ранее [4, 5].

Полученные результаты приведены в таблице. Дибутирил сАМР и форсколин практически не влияли на спонтанное, но ингибировали вызванное высокой концентрацией K^+ в среде высвобождение ^3H -глутамата и ^3H -дофамина. Таким образом, как прямое увеличение уровня сАМР, так и увеличение уровня эндогенного сАМР, вызванное активацией аденилатциклазы, в нейронах суперфузируемой области неостриатума приводило к ингибированию вызванного высвобождения исследованных нейротрансмиттеров. По всей вероятности, это высвобождение происходит из пресинаптических окончаний, так как в суперфузируемой области мозга локализованы только окончания, но не тела глутамат- и дофаминергических нейронов.

Считается, что влияние сАМР на высвобождение нейротрансмиттеров опосредуется сАМР-зависимым фосфорилированием синаптических белков [6], которое, по-видимому, не принимает прямого участия в процессе высвобождения. По данным Llinas и соавт., время от момента вызванного потенциалом действия входа Ca^{2+} в пресинаптическое окончание до выброса квантов нейротрансмиттера не превышает 200 мкс [7], что значительно меньше времени, требуемого для каскада ферментных реакций, приводящих к увеличению уровня сАМР и последующему фосфорилированию синаптических белков. Тем не менее, более длительные процессы пресинаптической модуляции высвобождения нейротрансмиттеров, осуществляемые другими нейротрансмиттерными веществами и гормонами, могут быть опосредованы увеличением уровня сАМР в пресинаптическом окончании.

Однако необходимо отметить, что в литературе описаны и другие эффекты дибутирил сАМР на высвобождение ^3H -дофамина из стриатума. Westfall и соавт. обнаружили, что дибутирил сАМР в концентрации 100 мкМ потенцировал вызванное электрической стимуляцией с частотой импульсов 50 Гц высвобождение ^3H -дофамина из срезов стриатума крыс, предварительно проинкубированных в среде с экзогенным ^3H -дофамином [8]. По-видимому, причиной отличия этих данных от наших является нефизиологическая высокая частота электрической

Таблица

Влияние дибутирил сАМР и форсколина на высвобождение ^3H -глутамата и ^3H -дофамина из неостриатума крысы

Фракция	Условия опыта							
	^3H -глутамат				^3H -дофамин			
	спонтанное высвобождение, %		K ⁺ -вызванное высвобождение, %		спонтанное высвобождение, %		K ⁺ -вызванное высвобождение, %	
	2	3 („отмывка“)	2	3 („отмывка“)	2	3 („отмывка“)	2	3 („отмывка“)
Контроль	74±12	72±15	153±23	81±17	66±9	38±3	256±28	64±9
Дибутирил сАМР ($2 \cdot 10^{-4}$ М)	82±3	64±10	79±11*	44±12	65±16	44±14	90±16*	61±5
Форсколин (10^{-4} М)	69±2	45±2	73±6*	50±4	87±8	83±14*	125±15*	109±1*

Примечание. При K⁺-деполяризации концентрацию K⁺ в среде увеличивали до 60 мМ и эквимолярно уменьшали концентрацию Na⁺ в среде для сохранения изотоничности. *—уровень соответствующих меченых нейротрансмиттеров во фракциях, достоверно ($p < 0,05$) отличающихся от таковых в контроле в тот же период суверфузии.

-стимуляции срезов стриатума в опытах Westfall и соавт., что может приводить к интенсивному притоку Na^+ в пресинаптическое окончание, благодаря которому усиливается отток Ca^{2+} из митохондрий в цитоплазму [9]. В отличие от локальной K^+ -деполяризации пресинаптических окончаний при таких условиях возможно независимое от внешней концентрации Ca^{2+} высвобождение нейротрансмиттеров [4], которое, по-видимому, потенцируется со стороны дибутирил cAMP.

Резюмируя вышесказанное, необходимо отметить, что пресинаптические модуляторы, ингибирующие Ca^{2+} -зависимое, вызванное деполяризующим стимулом, высвобождение глутамата и дофамина из окончаний соответствующих нейронов в неостриатуме, могут осуществлять свои эффекты через активацию пресинаптической аденилатциклазы и увеличение уровня cAMP.

EFFECT OF DIBUTIRYL-cAMP AND FORSCOLINE ON THE RELEASE OF ^3H -GLUTAMATE AND ^3H -DOPAMINE FROM RAT NEOSTRIATUM

GODUKHIN O. V.

Institute of Biological Physics, Poustchino

Dibutryl-cAMP—a lipophylic analogue of cAMP—and forskoline a direct activator of adenylate cyclase—don't affect spontaneous but inhibit K^+ -depolarization induced release of ^3H -glutamate and ^3H -dopamine from rat neostriatum. Data obtained indicate that presynaptic modulators inhibiting Ca^{2+} -dependent release of glutamate and dopamine from neurons may act through the activation of presynaptic adenylate cyclase increasing the level of cAMP.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Ariano M. A., Butcher L. L., Appleman M. M. *Neuroscience*, v. 5, № 7, p. 1269—1276, 1980.
2. Глебов Р. Н. *Успехи соврем. биол.*, т. 91, вып. 3, с. 433—450, 1981.
3. Cherubini E., Bernardi G., Marclani M. G., Anchors I. M., Stanzione P. *Neurosci. Lett.*, v. 13, Suppl. № 3, p. 146, 1979.
4. Годухин О. В., Жарикова А. Д., Буданцев А. Ю. *Физиол. журн. СССР*, т. 68, № 6, с. 745—751, 1982.
5. Жарикова А. Д., Годухин О. В. *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, № 11, с. 574—576, 1984.
6. Cooper I. R., Meyer E. M. *Neurochem. Inter.*, v. 6, № 4, p. 419—433, 1984.
7. Llinas R., Sugimori M., Simon S. M. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Biol. Sci.* v. 79, p. 2415—2419, 1982.
8. Westfall T. C., Kitay D., Wahl G. J. *Pharmacol. and Exp. Therap.*, v. 199, № 1, p. 149—157, 1976.
9. Silbergeld E. K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 77, p. 464—469, 1977.

Поступила 14. VIII 1985.



УДК 612.822.1:577.175.823; 615.212.7:547.95

ИЗМЕНЕНИЕ ОБМЕНА БЕЛКОВ В ОТДЕЛЬНЫХ СТРУКТУРАХ МОЗГА КРЫС ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ТЕТРАПЕПТИДАМИДОМ (ЦИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

ХУДОЕРКОВ Р. М.

Институт мозга ВНЦ психического здоровья АМН СССР, Москва

Открытие анальгетических свойств опиоидных пептидов [1, 2] поставило вопрос о возможности их применения в клинике [3], в связи с чем необходимо всестороннее изучение их влияния на обмен веществ в мозгу.

В настоящей работе методами автордиографии и интерферометрии изучали 30-минутное воздействие энкефалиноподобного тетрапептида (ТПА) на обмен веществ в функционально различных нейронах, входящих в состав двигательной системы мозга крыс: пирамидные нейроны слоя III и крупные пирамидные нейроны слоя V сомоторной коры, а также нейроны хвостатого ядра.

Вначале трем контрольным и трем подопытным крысам-самцам линии *Wistar* массой 180,0—200,0 г вводили внутривенно на физиологическом растворе $D, L\text{-Leu-2-}^3H_1$ (V. A. 8,8 мКи/ммоль, ЛМО «Изотоп») из расчета 4,5 мКи/100 г, а спустя 2,5 ч подопытным крысам внутривенно вводили ТПА ($Tyr-D-Ala-Gly-Phe-NH_2^*$) в дозе 500 мкг/кг, а контрольным—физиологический раствор. Через 30 мин после инъекции ТПА ткань головного мозга крыс фиксировали в Карнуа, обезвоживали и заключали в парафиновые блоки попарно—контрольное животное с подопытным; срезы изготовляли толщиной 7 мкм. Для приготовления гисторадиоавтографов [4] использовали ядерную фотоэмульсию Р (Завод технических фотопластинок). Интенсивность включения $^3H\text{-Leu}$ в белки нейронов оценивали по концентрации зерен серебра в радиоавтографах на автоматическом анализаторе видеоизображения Т. А. С. («Leitz-Wetzlar», ФРГ)**. С этой целью определяли площадь, занимаемую зернами серебра над телами нейронов, площадь самих нейронов и искомую величину—концентрацию зерен серебра находили как частное от деления полученных результатов.

Сухую массу вещества в ядре и цитоплазме, равную содержанию белка в ткани [5], определяли на интерференционном микроскопе БНАМ Л-211 (ЛОМО) в монохроматическом свете ($\lambda=535$ нм) с помощью поворотного анализатора Сенармона. Линейные размеры профильного поля ядра и цитоплазмы измеряли окулярмикромет-

* Синтезирован в лаборатории синтеза пептидов ВКНЦ АМН СССР.

** Автор искренне благодарит проф. Д. Д. Орловскую (Институт клинической психиатрии ВНЦ ПЗ АМН СССР) за предоставленную возможность работы на приборе.

Таблица

Влияние 30-минутного воздействия тетрапептидамидом на содержание и концентрацию белка в ядре и цитоплазме нейронов, а также на интенсивность включения ^3H -Leu в белки нейронов и на показатель метаболизма белка в пирамидных нейронах слоев III и V сенсорной коры больших полушарий и нейронах хвостатого ядра мозга крыс

	Слой III			Слой V			Хвостатое ядро		
	контроль $\bar{x} \pm S_x$	опыт $\bar{x} \pm S_x$	отклонение от контроля, %	контроль $\bar{x} \pm S_x$	опыт $\bar{x} \pm S_x$	отклонение от контроля, %	контроль $\bar{x} \pm S_x$	опыт $\bar{x} \pm S_x$	отклонение от контроля, %
Площадь ядра	86,78 $\pm$ 2,85	86,11 $\pm$ 2,93	-1	152,05 $\pm$ 1,93	160,96 $\pm$ 2,18	+6	74,47 $\pm$ 0,92	74,07 $\pm$ 1,05	-1
Площадь цитоплазмы	85,73 $\pm$ 4,06	87,11 $\pm$ 3,73	+2	197,86 $\pm$ 3,95	219,45 $\pm$ 4,16	+11*	46,61 $\pm$ 1,41	45,15 $\pm$ 1,35	-3
Содержание белка в ядре	67,02 $\pm$ 7,66	58,79 $\pm$ 3,18	-12	167,66 $\pm$ 4,45	177,60 $\pm$ 4,66	+6	43,04 $\pm$ 1,52	43,19 $\pm$ 2,01	+3
Содержание белка в цитоплазме	212,22 $\pm$ 8,73	202,26 $\pm$ 9,46	-5	469,28 $\pm$ 14,35	550,68 $\pm$ 14,60	+17*	77,90 $\pm$ 3,96	78,76 $\pm$ 3,94	+1
Концентрация белка в ядре	0,67 $\pm$ 0,70	0,60 $\pm$ 0,30	-10	1,10 $\pm$ 0,02	1,10 $\pm$ 0,02	0	0,57 $\pm$ 0,02	0,58 $\pm$ 0,03	+2
Концентрация белка в цитоплазме	2,09 $\pm$ 0,10	2,10 $\pm$ 0,70	0	2,34 $\pm$ 0,05	2,48 $\pm$ 0,03	+6	1,59 $\pm$ 0,04	1,66 $\pm$ 0,05	+4
Интенсивность включения ^3H -Leu	0,480 $\pm$ 0,640	0,420 $\pm$ 0,03	-13	0,384 $\pm$ 0,010	0,414 $\pm$ 0,010	+8	0,196 $\pm$ 0,008	0,244 $\pm$ 0,007	+14*
Показатель метаболизма белка	6,56	5,57	-15	5,63	6,48	+15	2,25	2,56	+14

Примечание. В каждом образовании мозга исследовано 150 нейронов у 3-х контрольных и 150 нейронов у 3-х подопытных крыс. Площадь ядра и цитоплазмы выражены в $\mu\text{м}^2$, содержание—в $\mu\text{г}$ и концентрация белка—в $\mu\text{г}/\mu\text{м}^3$, интенсивность включения ^3H -Leu (концентрация зерен серебра в радиоавтографе) и показатель метаболизма белка—в усл. ед. * $p < 0,05$ по сравнению с контролем

ром МОВ-1—15. Концентрацию белка в изучаемых структурах находили как отношение содержания белка в них к площади их профильных полей (при заданной толщине среза—7 мкм).

Показатель метаболизма белка, количественно характеризующий взаимоотношение между содержанием белка и его синтезом в структуре [6], получали как отношение концентрации белка в цитоплазме нейрона к интенсивности автордиографической метки—концентрации зерен серебра в радиоавтографе, выраженной через десятичный логарифм. Полученные результаты обработаны статистически по Стьюденту-Фишеру.

Через 30 мин после введения ТПА (таблица) содержание белка достоверно повышалось на 17% только в цитоплазме нейронов слоя V, с достоверным увеличением и площади самой цитоплазмы на 11%, а концентрация белка в цитоплазме показала лишь тенденцию к увеличению на 6%. В нейронах слоя III и хвостатого ядра не было выявлено существенных изменений по исследуемым показателям. Достоверное увеличение на 14% включения ^3H -Leu обнаружили только в белках нейронов хвостатого ядра. Показатель метаболизма белка повышался на 15 и 14% соответственно в нейронах слоя V и хвостатого ядра и уменьшался на 15% в нейронах слоя III.

Таким образом, проведенная работа показала, что под влиянием ТПА в период его анальгетического действия [1] значительных изменений в содержании и синтезе белка не наблюдается. Но в то же время, судя по показателю метаболизма белка, некоторые изменения в его обмене происходят в разных типах нейронов по-разному. В ассоциативных нейронах слоя III обмен белков несколько понижался, а в проекционно-эфферентных нейронах слоя V сенсомоторной коры и интегративно пусковых нейронах хвостатого ядра он повышался, но не в значительной степени. Скорее всего отмеченные изменения в белках являются отражением вторичных процессов, происходящих в обмене веществ в мозгу. Как следует из данных литературы [7], для этого периода действия ТПА характерны заметные и однонаправленные сдвиги в активности ферментов, связанных с обменом серотонина, и отсутствие изменений со стороны других классических нейромедиаторов. Содержание и концентрация белка существенно меняются, особенно в нейронах хвостатого ядра, на 3-и сутки после однократного введения ТПА [8] с появлением у животных двигательных расстройств [9], что, вероятно, обусловлено нарушением ряда обменных процессов [8, 10].

EFFECT OF TETRAPEPTIDE AMIDE ON PROTEIN TURNOVER IN RAT BRAIN DIFFERENT STRUCTURES

KHUDOERKOV R. M.

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

Wistar rats were treated with an analogue of enkephalins Tyr-D-Ala-Gly-Phe-NH₂ (500 mcg/kg b. w.) and the quantitative cytochemical methods: ^3H -Leu autoradiography and interferometry were used to assess

protein metabolism in the neurons of layer III and V of the motor cortex and n. caudatus during 30 min. No significant alterations in protein synthesis and content have been revealed, only a statistically reliable 14% increase in incorporation of ^3H -Leu in neurons of n. caudatus was detected as well as 17% increase in the protein content in neurons of the layer V. A special factor used for the sake of a more accurate evaluation of protein metabolism points to appreciable effect of this enkephalin analogue on the protein turnover in the neurons of layer V and n. caudatus.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Беспалова Ж. Д., Коробова Н. В., Титов М. И., Чиченков О. Н. Фармакология и токсикология, т. 45, № 2, с. 39—44, 1982.
2. Loew G., Hashimoto G., Williamson L., Burt S., Andersen W. Mol. Pharmacol., v. 22, p. 667—677, 1982.
3. Ашмарин И. П. Вопр. мед. химии, т. 30, № 4, с. 2—7, 1984.
4. Rogers A. W. Techniques of autoradiography. Elsevier Publishing Company. Amsterdam-London-New York, 1967.
5. Бродский В. Я. Трофика клетки, М., Наука, 1966.
6. Данилов Р. К. Цитология, т. 22, с. 481—488, 1980.
7. Попова Н. С., Доведова Е. Л. Журн. высш. нерв. деят-сти, т. 34, с. 926—931, 1984.
8. Герштейн Л. М., Доведова Е. Л., Узбеков М. Г., Голикова Т. Л., Сергутина А. В., Ашмарин И. П. Нейрохимия, т. 3, № 3, с. 236—243, 1984.
9. Келешева Л. Ф., Толпыго С. М. Журн. высш. нерв. деят-сти, т. 34, с. 169—171, 1984.
10. Узбеков М. Г. Бюл. эксперим. биол и мед., т. 95, № 2, с. 38—40, 1983.

Поступила 27. VI 1985



УДК 576.343:612.82:612.67

ВЛИЯНИЕ АЦЕТИЛХОЛИНА И НОРАДРЕНАЛИНА НА АКТИВНОСТЬ Na^+ , K^+ -АТРАЗЫ СИНАПТИЧЕСКИХ МЕМБРАН ГОЛОВНОГО МОЗГА ВЗРОСЛЫХ И СТАРЫХ КРЫС

ПОТАПЕНКО Р. И.

Институт геронтологии АМН СССР, Киев

Изучение возрастных особенностей функционирования транспортной Na^+ , K^+ -АТРАЗЫ (КФ 3.6.1.3) синаптических мембран (СМ) имеет важное значение для раскрытия механизмов изменения функциональной активности головного мозга в старости [1]. Это объясняется тем, что Na^+ , K^+ -АТРАза связана с передачей нервных импульсов, процессами возбуждения и торможения. Имеющиеся данные об активности Na^+ , K^+ -АТРАЗЫ СМ в старости малочисленны и противоречивы [2—4]. В литературе нет сведений о каких-либо возрастных особенностях регуляции активности АТРАЗЫ нейромедиаторами, с которыми она находится в сложном взаимодействии. Вместе с тем, имеются указания на существенные изменения при старении нейромедиаторных систем, выражающиеся в снижении синтеза, выделения и обратного захвата медиаторов [5, 6].

Целью настоящего исследования явилось определение активности Na^+ , K^+ -АТРАЗЫ СМ коры больших полушарий и ствола головного мозга взрослых и старых крыс и изучение влияния на неё АХ и норадреналина (НА).

В работе использовали 7—8-месячных (взрослые) и 26—27-месячных (старые) беспородных крыс-самцов. Синапсомы выделяли из 10%-ных гомогенатов коры и ствола мозга на 0,32 М сахарозе, содержащей 0,01 М трис и 0,005 М ЭДТА (рН 7,5) по методу Najos [7]. СМ получали, подвергнув синапсомы гипотоническому шоку путем инкубации в деионизированной воде (0°, 30 мин). Белок определяли модифицированным методом Lowry и соавт. [8]. СМ замораживали при -20° и хранили не более 2-х суток. Общую АТРАЗную активность определяли путем инкубации в среде следующего состава (мМ): трис—50, NaCl —100, KCl —20, MgCl_2 —3, АТР—3, рН 7,5, 50—60 мкг белка СМ. Активность Mg^{2+} -АТРАЗЫ измеряли в отсутствие ионов натрия. АХ, НА и прозерин (0,05%, 0,02 мл) вносили в пробы после преникубации без субстрата в течение 5 мин при 37° . Об АТРАЗной активности судили по накоплению P_i [9]. Активность Na^+ , K^+ -АТРАЗЫ рассчитывали как разность между общей и Mg^{2+} -АТРАЗной активностями и выражали в мкмоль $\text{P}_i/\text{мг}$ белка/ч.

Установлено, что активность Na^+ , K^+ -АТФазы СМ из коры больших полушарий и ствола мозга отличается по величине и с возрастом крыс существенно не изменяется (взрослые: кора— 20.2 ± 1.6 , ствол— 27.5 ± 1.9 ; старые—соответственно 17.4 ± 1.4 и 25.9 ± 1.8). Характер влияния исследованных нейромедиаторов на активность Na^+ , K^+ -АТФазы оказался сходным и определялся их концентрацией, однако имелись и некоторые возрастные особенности. Как следует из рис. а, было подтверждено, что АХ в низких концентрациях (10^{-7} — 10^{-5} М) активировал фермент, в высоких (10^{-2} М)—угнетал у крыс обеих возрастных групп. Однако необходимо отметить, что если ингибирующий эффект этого медиатора у взрослых и старых животных был одинаков, то активация Na^+ , K^+ -АТФазы под его влиянием у старых крыс была менее выражена и не зависела от концентрации в интервале

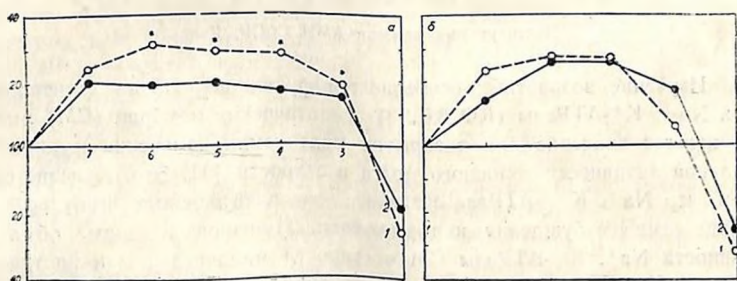


Рис. Влияние АХ (а) и НА (б) на активность Na^+ , K^+ -АТФазы синаптического мембран головного мозга крыс разного возраста. По оси абсцисс— $\lg [\text{АХ}]$, М (а) и $\lg [\text{НА}]$, М (б), по оси ординат—изменение активности Na^+ , K^+ -АТФазы в % по отношению к исходному уровню, принятому за 100%. 1—взрослые крысы, 2—старые крысы. *—статистически значимые различия между взрослыми и старыми животными

10^{-7} — 10^{-3} М. У взрослых крыс повышение концентрации АХ в среде от 10^{-7} до 10^{-6} М сопровождалось увеличением активирующего влияния (с 24 до 31%, $p < 0.05$) с последующей стабилизацией эффекта (10^{-6} — 10^{-4} АХ) и дальнейшим ослаблением активации до 21% ($p < 0.05$) при концентрации АХ 10^{-3} М. В концентрации $5 \cdot 10^{-3}$ М АХ наряду с активацией вызывал у отдельных особей угнетение активности Na^+ , K^+ -АТФазы, одинаковое у взрослых и старых крыс. Результаты исследования на взрослых крысах находятся в полном соответствии с данными других авторов [10, 11].

Кривая, отражающая влияние НА на активность Na^+ , K^+ -АТФазы СМ из ствола мозга, как и в случае с АХ, имеет двухфазный характер (рис. б). В низких концентрациях НА (10^{-7} — 10^{-4} М) повышал, а в высоких (10^{-3} М)—понижал ее активность. Максимальная величина активации и ингибирования Na^+ , K^+ -АТФазы у крыс обоих возрастов была одинаковой и составляла в среднем 30%. Некоторые возрастные особенности влияния НА были обнаружены при концентрации НА

10^{-4} М. В отличие от животных зрелого возраста, у которых активацию Na^+ , K^+ -АТРазы наблюдали лишь в 43% случаев, у старых крыс НА в указанной концентрации повышал активность фермента у подавляющего большинства (83%).

Таким образом, активность Na^+ , K^+ -АТРазы СМ из коры больших полушарий и ствола головного мозга в старости сохранялась на уровне, соответствующем крысам зрелого возраста, однако изменялись ее регуляторные свойства. Особенно существенна перестройка с возрастом регуляции АХ активности Na^+ , K^+ -АТРазы, выражавшаяся в ослаблении активации ее этим медиатором в старости. Это согласуется с имеющимися данными о сравнительно большем повреждении в процессе старения холинэргической системы регуляции, являющейся эволюционно наиболее древней [12].

Возрастные особенности эффекта АХ на активность Na^+ , K^+ -АТРазы в старости могут быть обусловлены рядом причин. Анализ собственных фактических данных и данных литературы [13, 14] позволяет высказать предположение, что наиболее вероятной причиной снижения активирующего влияния АХ на Na^+ , K^+ -АТРАЗу в старости может быть уменьшение плотности мускариновых рецепторов на мембране. Вместе с тем нельзя не учитывать и изменения при старении липидного состава и свойств СМ [15, 16], с которыми, в частности, могут быть связаны и некоторые особенности регуляторного воздействия НА на АТРАЗу у старых крыс. Не исключено, что ослабление активирующего влияния АХ на активность Na^+ , K^+ -АТРазы является одной из причин, приводящих к снижению памяти и способности к обучению, наблюдаемых у старых животных [17].

EFFECT OF ACETYLCHOLINE (ACh) AND NORADRENALINE (NA) ON THE ACTIVITY OF BRAIN SYNAPTIC MEMBRANE Na^+ , K^+ -ATPase IN GROWN UP AND SENILE RATS

POTAPENKO R. I.

Institute of Gerontology, Academy of Medical Sciences of Ukr. SSR, Kiev

Activity of synaptic membrane Na^+ , K^+ -ATPase in brain cortex and truncus cerebri has not been changed on ageing. A two-step effect of neurotransmitters on the activity of this enzyme has been detected: low doses of ACh (10^{-7} — 10^{-4} M) and NA (10^{-7} — 10^{-5} M) activate and high doses (10^{-2} M and 10^{-3} M respectively) inhibit Na^+ , K^+ -ATPase. On ageing the activating effect of ACh is diminished, but the effect of NA does not change significantly.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Фролькис В. В. Безруков В. В. Физиол. человека, т. 4, № 4, с. 596—619, 1978.
2. Sun A. Y., Samorajski T. J. Neurochem., v. 24, p. 161—164, 1975.
3. LaManna J. C., Doull G., McCracken K., Harik S. I. Gerontol., v. 29, № 4, p. 242—247, 1983.
4. Calderini G., Bonetti A. Ch., Battistella A., Crews E. T., Toffano G. Neurochem. Res., v. 8, № 4, p. 483—492, 1983.
5. Bartus R. T., Fleming D. L., Johnson H. R. J. Gerontol., v. 33, p. 858—871, 1978.
6. Априкян Г. В., Шагинян В. А., Мкртчян Г. А., Паронян Ж. А., Князян В. А., Ахвердян Э. С. Физиол. журн. СССР, т. 30, № 1, с. 69—73, 1984.
7. Hajos F. Brain Res., v. 93, № 3, p. 485—489, 1975.
8. Markwell M. A. K., Haas S. M., Rieber L. L., Tolbert N. Anal. Biochem., v. 87, p. 206—210, 1978.
9. Ratbun W., Bettlach V. Anal. Biochem., v. 28, p. 436—445, 1968.
10. Глебов Р. Н., Дмитриева Н. М. Биохимия, т. 39, с. 822—827, 1974.
11. Кометиани Э. П., Джариашвили Т. Я., Цакадзе Л. Г. Биохимия, т. 40, с. 1039—1046, 1975.
12. Strong R., Hicks P., Hsu L., Bartus R. T., Enna S. J. Neurobiol. of ageing, v. 1, № 1, p. 59—63, 1980.
13. Болдырев А. А. Биохимические аспекты электромеханического сопряжения. М., МГУ, 1977.
14. Briggs R. S., Petersen M. M., Cook P. I. Neurobiol. of ageing, v. 3, p. 259—261, 1982.
15. Аксентев С. Л., Милютин А. А., Беляева Е. И., Буланова К. Я., Окунь И. М., Ракович А. А., Кисилев П. А., Кирилюк А. П., Конев С. В. Биофизика, т. 27, с. 650—652, 1982.
16. Nagy K., Zs-Nagy V., Bertoni-Freddart C., Zs-Nagy I. Arch. Gerontol. and geriatr., v. 2, № 1—2, p. 23—39, 1983.
17. Le Poncin-Lafitte M., Lamproglou Y., Duterte D., Rapin J. R. Eur. Neurol. v. 22, № 2, p. 13—14, 1983.

Поступила 20. XII. 1983.



ОБЗОРЫ

УДК 612.822.1+612.815.1

ЭНДОГЕННЫЕ ИНГИБИТОРЫ ГАМК-РЕЦЕПТОРОВ
ПОСТСИНАПТИЧЕСКИХ МЕМБРАН

ПАРФЕНОВА Е. В.

Институт экспериментальной медицины АМН СССР, Ленинград

Из синаптических мембран головного мозга крыс выделены вещества, специфически ингибирующие связывание меченой ГАМК с постсинаптическими рецепторными участками. Обсуждаются противоречивые литературные данные о природе этих ингибиторов и механизме ингибирования. Ставится вопрос о существовании эндогенных ингибиторов постсинаптической рецепции других медиаторов. Высказывается предположение, что эндогенные ингибиторы являются одним из звеньев регуляции синаптической передачи, осуществляющих свою функцию на уровне постсинаптической мембраны.

ГАМК—основной тормозной медиатор в ЦНС позвоночных животных. Эффективность работы ГАМК-ергической синаптической передачи определяется совокупностью процессов, происходящих на уровне как пре-, так и постсинаптической мембран нервных окончаний. Ключевыми моментами постсинаптической регуляции являются число рецепторных участков, их чувствительность к медиатору и степень сопряжения эффектора с Cl^- -ионофором. В последнее время обнаружен новый тип регуляции процессов для ГАМК-ергических синапсов, а именно регуляция постсинаптической рецепции ГАМК эндогенными ингибиторами. Этот вопрос, которому посвящено значительное количество зачастую противоречащих друг другу работ, и является предметом настоящего обзора.

Детальное изучение процесса постсинаптической рецепции ГАМК *in vitro* стало возможным лишь после того, как были определены условия избирательного выявления связывания меченой ГАМК с рецепторными участками и его отграничения от других процессов, в частности обратного захвата медиатора нервными окончаниями и глияльными клетками. Впервые Реск и соавт. в 1973 г. [1] показали, что постсинаптическое рецепторное связывание 3H -ГАМК с синаптосомами коры мозжечка выявляется в отсутствие Na^+ в инкубационной

среде при 0–4°, что отличает его от Na^+ -зависимого процесса обратного захвата медиатора синапсом, а Na^+ -независимое связывание ^3H -ГАМК конкурентно ингибируется бикикулином—известным антагонистом ГАМК и не изменяется в присутствии хлорпромазина—ингибитора обратного захвата ГАМК. Детально характеристики Na^+ -независимого связывания ^3H -ГАМК с синаптическими мембранами различных отделов ЦНС крысы были изучены в работе Zukin и соавт. [2], которые с помощью кинетического и фармакологического подходов показали, что Na^+ -независимое связывание ^3H -ГАМК синаптическими мембранами идентично связыванию этого медиатора с постсинаптическими рецепторными участками мембран нервных клеток. Эта работа дала толчок к появлению целой серии исследований, посвященных изучению рецепторного связывания ГАМК радиоизотопными методами [3–6].

Оказалось, что на свежеполученных препаратах синаптических мембран из различных отделов ЦНС крысы Na^+ -независимое связывание ^3H -ГАМК практически не обнаруживается; его выявление становится возможным лишь после одно- или двукратного замораживания-оттаивания мембран, сопровождаемого интенсивными промывками препарата гипотоническим буфером [2–6]. Обработка предварительно подвергнутых замораживанию-оттаиванию мембран низкими концентрациями детергентов, наиболее распространенным из которых является неионный детергент тритон X-100 в концентрации 0,01–0,5%, также способствует выявлению рецепторного связывания медиатора синаптическими мембранами [7–9]. При этом обработанные детергентом мембраны имеют существенно большую рецепторную активность, чем препараты, интенсивно отмываемые буфером (в 2–3 раза при концентрации детергента 0,05%).

Эти результаты позволили предположить, что в синаптических мембранах ЦНС крысы присутствуют вещества, ингибирующие связывание ^3H -ГАМК *in vitro*. Было показано, что после обработки мембран низкими концентрациями тритона X-100 и последующего их осаждения в надосадочной жидкости обнаруживаются вещества, дозозависимым образом ингибирующие связывание ^3H -ГАМК постсинаптическими рецепторными участками [7, 10–12].

В настоящее время существование эндогенных ингибиторов постсинаптической рецепции ^3H -ГАМК является неоспоримым фактом. Однако вопрос о природе этих веществ и их физиологической роли в ГАМК-ергической синаптической передаче ещё не разрешён. Работы по изучению эндогенных ингибиторов развиваются в двух основных направлениях: 1) феноменологические исследования, в ходе которых устанавливаются факты изменения активности эндогенных ингибиторов в различных экспериментальных условиях и при некоторых патологических состояниях ЦНС; 2) исследования, задачей которых является выяснение молекулярной природы ингибиторов и механизма ингибирования.

При феноменологических исследованиях активность ингибиторов идентифицируется двумя методами: а) по приросту Na^+ -независимого связывания ^3H -ГАМК препаратами синаптических мембран после их обработки низкими концентрациями детергента; б) по способности очищенной фракции супернатанта, полученного после осаждения мембран, обработанных замораживанием-оттаиванием и детергентом, ингибировать Na^+ -независимое связывание ^3H -ГАМК синаптическими мембранами. В ходе таких исследований установлен ряд интересных фактов. Продemonстрировано, например, что феномен гиперчувствительности рецепторов ГАМК в стриатуме крыс после местной дегенерации нейронов, вызванной введением в мозг каннтовой кислоты, сопровождается снижением активности эндогенных ингибиторов в той части мозга, где отмечается массовая дегенерация нейронов; в то же время активность эндогенных ингибиторов в интактной части мозга не претерпевает изменений [11]. Оказалось также, что у больных хореей Геттингтона, у которых в стриатуме и коре мозжечка наблюдается значительная потеря ГАМК-ергических нейронов, функционирующие нейроны также обладают гиперчувствительностью рецепторов к ГАМК, и это сопровождается практически полным отсутствием в синаптических мембранах из коры мозжечка таких больших эндогенных ингибиторов [13]. Интересны данные об изменении активности эндогенных ингибиторов в онтогенезе. Показано, что их активность в передних отделах головного мозга крыс снижается в ряду 1-дневные—10-дневные—взрослые животные, что сопровождается возрастанием рецепторного связывания ^3H -ГАМК [14]. В то же время в работе других авторов показано, что активность ингибиторов в мембранах из передних отделов головного мозга минимальна у новорожденных крысят и достигает нормальных значений ко 2—3 дню после рождения, что происходит параллельно с «созреванием» ГАМК-рецепторов в этих отделах мозга [15]. Таким образом, полученные при феноменологических исследованиях данные позволяют предположить, что эндогенные ингибиторы ГАМК-рецепторов являются участниками механизма постсинаптической регуляции ГАМК-ергической синаптической передачи, а изменению их активности принадлежит важная роль в некоторых физиологических и патологических процессах в ЦНС.

Хотя факт существования эндогенных ингибиторов постсинаптической рецепции ГАМК в настоящее время не вызывает сомнений, вопрос о химической природе этих веществ пока еще не решен. Поскольку эндогенные ингибиторы солибилизируются из синапсомембранных при замораживании-оттаивании и промывках буфером или обработке детергентами, их присутствие в супернатанте после осаждения таких мембран легко обнаруживается. Различными авторами было показано, что ингибирующим влиянием на рецепторное связывание ^3H -ГАМК обладают различные вещества, солибилизирующиеся из мембран после указанных обработок: эндогенная ГАМК [16—19], фосфолипиды [20], белки [21, 22], пептиды [23], пурины [24] и низкомоле-

кулярные вещества [11]. Необходимо проанализировать имеющиеся данные, чтобы попытаться ответить на вопрос, какие же из перечисленных кандидатов на роль ингибиторов действительно являются эндогенными ингибиторами Na^+ -независимого связывания ^3H -ГАМК.

ГАМК. Показано, что в препаратах синаптических мембран различных отделов ЦНС животных в значительном количестве обнаруживается эндогенная ГАМК, которая исходно была заключена в синаптических окончаниях. По данным Toiffano и соавт. [8], её содержание в таких препаратах вполне достаточно для того, чтобы успешно конкурировать с меченой ГАМК, используемой для радиорецепторного исследования и, таким образом, занижать величины связывания ^3H -ГАМК и создавать эффект ингибирования рецепторного связывания *in vitro*. Замораживание-оттаивание синаптических мембран, сопровождаемое их промывками гипотоническим буфером, приводит к разрушению мембранных везикулярных структур и вымыванию эндогенной ГАМК из препарата. Эффект замораживания-оттаивания усиливается дополнительной обработкой детергентами, также способствующими нарушению целостности мембранных структур. После 2—3-кратной последовательной обработки 0,05%-ным тритоном X-100 в препаратах синаптических мембран из коры головного мозга крыс эндогенной ГАМК практически не обнаруживается [8]. Кроме того, указанная обработка снижает содержание в препаратах синаптических мембран и других аминокислот—таурина, аргинина и глутаминовой кислоты [8], которые, по данным некоторых авторов, уменьшают связывание ^3H -ГАМК с синаптическими мембранами [25]. Это сопровождается увеличением связывания меченой ГАМК с препаратами синаптических мембран. Таким образом, эндогенная ГАМК является не истинным, а кажущимся ингибитором рецепторного связывания ^3H -ГАМК, с присутствием которого в интактных препаратах мембран необходимо считаться [16—19].

Однако маскирующим эффектом эндогенной ГАМК на рецепторное связывание ^3H -ГАМК синаптическими мембранами не объясняются все наблюдаемые эффекты. Так, обнаружены вещества, неконкурентно ингибирующие Na^+ -независимое связывание ^3H -ГАМК [7, 10, 11], в то время как эндогенная ГАМК, естественно, находится в конкурентных отношениях с меченой ГАМК.

Фосфолипиды. Обработка клеточных мембран детергентами приводит к удалению из них значительной части фосфолипидов. При стандартной обработке синаптических мембран головного мозга крыс тритоном X-100 (0,05%-ным в течение 30 мин при 37°), используемой при радиорецепторном исследовании связывания ГАМК, содержание фосфолипидов в мембранах снижается на 50% [8]. Естественно было проверить, не являются ли фосфолипиды, экстрагируемые из мембран детергентами, теми эндогенными ингибиторами, которые препятствуют проявлению активности ГАМК-рецепторов в интактных препаратах мембран. Эта возможность привлекла внимание исследователей ещё и потому, что существует гипотеза Watkins, базирующаяся на сходстве

структуры и распределения заряда в молекулах ГАМК и фосфатидилэтанолamina [26]. Сущность этой гипотезы состоит в том, что мембрана содержит комплексы между этим типом фосфолипидов и рецепторными белками, диссоциирующими в присутствии ГАМК. Это приводит к изменению проницаемости постсинаптических мембран для ионов. Следуя этой гипотезе, фосфолипиды, в частности фосфатидилэтанолamin, являются теми веществами, которые конкурируют с ГАМК за связывание с рецепторными участками.

Для решения вопроса о роли фосфолипидов в постсинаптической рецепции ГАМК было использовано 2 экспериментальных подхода. Прежде всего было изучено влияние экзогенных фосфолипидов (как суммарной фракции, так и отдельных типов) на рецепторное связывание ^3H -ГАМК с предварительно обработанными детергентом синаптическими мембранами головного мозга крыс. Оказалось, что фосфолипиды действительно снижают связывание меченого медиатора с рецепторными участками синаптических мембран, причём наибольшей ингибирующей активностью обладает именно фосфатидилэтанолamin [8, 20]. Однако полученные величины ингибирования оказались не очень значительными (10—30% по данным Toffano и соавт. [8]) и не вполне объясняли факт 2—3-кратного увеличения рецепторного связывания ^3H -ГАМК синаптическими мембранами после их обработки детергентом.

Другим экспериментальным подходом, использованным для выяснения роли фосфолипидов в процессе постсинаптической рецепции ГАМК, было изучение связывания ^3H -ГАМК с синаптическими мембранами после их обработки фосфолипазами. Если фосфолипиды действительно являются эндогенными ингибиторами ГАМК-рецепторов, то разрушение их фосфолипазами должно привести к возрастанию Na^+ -независимого связывания ^3H -ГАМК синаптическими мембранами. Однако полученные результаты достаточно противоречивы. Так, было показано, что обработка синаптических мембран фосфолипазой A_2 , катализирующей отщепление жирной кислоты в β -положении, приводит не к ожидаемому увеличению рецепторного связывания ^3H -ГАМК, а, напротив, к его снижению в 1,5—2 раза [8, 20]. Полученные результаты авторы связывают с действием продуктов гидролиза—лизосомальных фосфолипидов, которые, как известно, токсичны и вызывают разрушение мембран. Обработка синаптических мембран фосфолипазой C , отщепляющей фосфорилированные азотсодержащие спирты от молекул фосфолипидов, приводит к увеличению рецепторного связывания ^3H -ГАМК мембранами в 1,5—2 раза [8, 20]. В то же время аналогичная обработка не оказывает влияния на активность сольбилизованного ГАМК-рецептора [27]. Фосфолипаза D , отщепляющая от молекул фосфолипидов азотсодержащие спирты, не влияет на Na^+ -независимое связывание ^3H -ГАМК синаптическими мембранами [8].

Таким образом, результаты работ, касающихся роли фосфолипидов в процессе постсинаптической рецепции ГАМК, неоднозначны.

Большинство авторов придерживается мнения, что фосфолипиды не являются ингибиторами, действующими непосредственно на участок связывания медиатора. Вероятнее всего, фосфолипиды косвенным образом регулируют доступность гидрофильных молекул ГАМК и её аналогов к участкам связывания за счёт увеличения их липидного окружения [8, 13, 28]. Не исключается также возможность, что ГАМК-связывающий компонент рецепторного участка является липопротеидом или липидзависимым белком [8], или сопрягающим фактором между рецептором и молекулой Cl^- -ионофора [29].

Пурины. В работе Ticku, Burch [24] было показано, что различные пурины (инозин, дезоксиинозин, гипоксантин, теофиллин и аденозин) в концентрации 0,2—1 мМ дозозависимым образом ингибируют Na^+ -независимое связывание ^3H -ГАМК с клеточными мембранами мозга крысы, в то время как тимин, сАМР и АТР не изменяют параметров связывания. Этим данным противоречат результаты, полученные Asano, Spector, которые не обнаружили влияния пуринов на связывание ^3H -ГАМК с синаптическими мембранами [30].

Пептиды. В 1979 г. были опубликованы тезисы австралийских исследователей Johnston и Kennedy, где сообщалось о выделенном ими эндогенном ингибиторе связывания ^3H -ГАМК с синаптическими мембранами мозга крысы, который являлся пептидом с M_r менее 1 кД, был диализуем, термостабилен (98°, 30 мин) и имел основной характер [23].

В 1983 г. Kugoda сообщил о выделении из супернатанта, полученного после обработки синаптических мембран мозга крысы 0,05%-ным тритоном X-100, эндогенного ингибитора рецепторного связывания ^3H -ГАМК, который окрашивался реактивом Фолина [12]. Гель-фильтрация супернатанта на сефадексе G-75 позволила установить, что вся ингибирующая активность элюировалась в общем объёме колонки, то есть её M_r составляла менее 3 кД. Дальнейшая очистка ингибитора и идентификация его природы не проводилась. Изучение кинетики ингибирования привело авторов к заключению, что данный ингибитор не идентичен эндогенной ГАМК, хотя кинетика ингибирования имеет конкурентный характер.

Низкомолекулярные факторы. В 1980 г. японскими исследователями Yoneda и Kuriyama из супернатанта, полученного после обработки синаптических мембран мозга крысы 0,01%-ным тритоном X-100, был выделен и частично очищен низкомолекулярный ингибитор Na^+ -независимого связывания ^3H -ГАМК [11]. По данным ультрафильтрации, M_r этого ингибитора составила менее 0,5 кД. Было показано, что добавление его к препаратам синаптических мембран дозозависимым образом снижает Na^+ -независимое связывание ^3H -ГАМК за счёт уменьшения чувствительности рецептора к медиатору и его агонистам без изменения числа участков связывания (то есть, ингибирование имеет неконкурентный характер). Это вещество, названное авторами GRIF (GABA-receptor inhibiting factor), термостабильно (95°, 10 мин),

нечувствительно к трипсину, коллагеназе, проназе и фосфолипазе С, имеет основной характер и не идентично ГАМК и фосфатидилэтаноламину. Его содержание в мозгу крысы изменяется при экспериментальных воздействиях на ЦНС. Дегенерация нейронов стриатума через 7 дней после инъекции каннтовой кислоты в эту структуру мозга сопровождалась снижением ингибирующей активности GRIF, выделенного из стриатума. Этот факт авторы полагают ведущим в феномене денервационной чувствительности ГАМК-рецепторов, который развивается после введения каннтовой кислоты в данную структуру [11].

Обнадёживающее начало по очистке и идентификации природы этого ингибирующего фактора не нашло пока своего продолжения — в 1982 г. была опубликована статья той же группы авторов, в которой по-прежнему лишь констатировалось существование термостабильного и диализуемого ингибитора в супернатанте после осаждения мембран, обработанных солюбилизирующими концентрациями тритона X-100 (1%), который не осаждался при 40%-ном насыщении сульфатом аммония [27]. Интересно, что малые количества этого неочищенного вещества после диализа, напротив, в 1,7—2 раза увеличивали связывание агониста ГАМК ^3H -мусцимола с солюбилизованным ГАМК-рецептором. Это, по-видимому, указывает на присутствие в супернатанте после обработки мембран детергентом недиализуемых веществ, стимулирующих рецепцию агонистов ГАМК солюбилизованным рецепторным комплексом.

Белки. В 1978 г. появились первые работы группы американских исследователей во главе с Costa E., в которых сообщалось о выделенном эндогенном белковом ингибиторе Na^+ -независимого связывания ГАМК, неконкурентно блокировавшем высокоаффинные рецепторные участки: он был назван авторами ГАМК-модулином [7,21]. В дальнейшем этот белок был полностью очищен и получены следующие критерии его гомогенности: 1) при электрофорезе в ПААГ в присутствии ДДС- Na выявлялась 1 полоса, соответствующая величине M_r 17 кД; 2) жидкостная хроматография высокого давления обнаруживала только 1 пик; 3) анализ С-концевых групп показал присутствие только гистидина, причём его карбоксильная группа была свободна [22].

В качестве исходного материала для получения ГАМК-модулина был использован гомогенат цельного мозга крысы. Первые этапы очистки основаны на термостабильности и кислотоустойчивости ингибитора: гомогенизация мозга в горячей (80°) 1 М уксусной кислоте денатурирует значительное количество примесных белков. Растворенный в 1 М уксусной кислоте ингибитор далее был фракционирован путём ступенчатого насыщения сульфатом аммония (осаждался при 60%-ном насыщении). Последующая гель-фильтрация на сефадексах G-75 и G-100, уравновешенных 0.1 М уксусной кислотой, позволила получить 500-кратную очистку ингибитора. Полученный на этой стадии очистки

ингибитор содержал ещё 30—40% примесных компонентов. Окончательная очистка ГАМК-модулина (800-кратная по отношению к исходному гомогенату) была достигнута с помощью жидкостной хроматографии высокого давления [22].

Аминокислотный анализ ГАМК-модулина выявил отсутствие цистеина и высокое содержание гидрофильных остатков основных аминокислот, так что белок в целом имел основной характер. Ингибирующая активность ГАМК-модулина полностью терялась после его обработки протеолитическими ферментами трипсином и химотрипсином.

Изучение кинетики влияния очищенного ГАМК-модулина на Na^+ -независимое связывание ^3H -ГАМК синаптическими мембранами мозга крысы показало, что в концентрации более 0,5 мкМ он неконкурентно, за счёт, вероятно, аллостерических взаимодействий, снижает число высокоаффинных участков связывания ^3H -ГАМК, не влияя на низкоаффинное связывание этого лиганда. Кривая ингибирующего влияния ГАМК-модулина имеет характер насыщения, при этом максимальное ингибирование, составляющее не более 50% от исходных значений, достигается в присутствии 1—5 мкМ ГАМК-модулина. Оказалось, что действие этого ингибитора специфично для Na^+ -независимого связывания ^3H -ГАМК и её аналогов, но не распространяется на связывание ^3H -дiazепама, ^3H -эторфина, ^3H -имипрамина и ^3H -аденозина с синаптическими мембранами. В то же время ГАМК-стимулируемое связывание ^3H -diazепама снижалось под влиянием ГАМК-модулина [22].

Авторы провели тщательную проверку способности ГАМК-модулина связывать ГАМК. Оказалось, что даже в высоких концентрациях (100 мкг) этот белок не связывает сколько-нибудь значительное количество меченого медиатора.

Изучение влияния других основных белков, сходных по величине M_r с ГАМК-модулином, на способность изменять связывание ^3H -ГАМК с синаптическими мембранами, показало, что ни альбумин (до 5 мг/мл), ни лизоцим (до 100 мкг/мл), ни гистоны (до 100 мкг/мл), ни низкомолекулярный миелиновый основной белок не изменяют величину связывания этого медиатора [22].

Существование ГАМК-модулина было продемонстрировано также в мембранах клонируемых клеток нейробластомы NB_{2a} и глиомы C_6 , причём его относительная активность в культурах этих клеток в 2—2,5 раза выше, чем в головном мозгу крыс [32]. Как на культурах клеток, так и на синаптических мембранах из мозга было показано, что ингибирующее действие ГАМК-модулина на рецепторное связывание ^3H -ГАМК полностью устраняется diaзепамом (10^{-6} M)—веществом из класса бензодиазепинов, которые, как известно, усиливают связывание ГАМК с рецептором и имеют вследствие этого широкое фармакологическое применение [32]. Авторы высказывают предположение, что механизм потенцирующего влияния бензодиазепинов на связывание ГАМК с рецептором осуществляется посредством их влияния на активность ГАМК-модулина.

С помощью очищенного и помеченного ^{125}I ГАМК-модулина было рассчитано, что концентрация этого ингибитора в мозгу крысы составляет около 6 мкМ, то есть его физиологические концентрации более чем достаточны для ингибирования постсинаптических ГАМК-рецепторов [22]. Распределение ГАМК-модулина в различных отделах мозга неравномерно: наиболее высоко его содержание в мозжечке [22], где отмечается и наибольшее содержание ГАМК-рецепторов [2]. Интересно, что ГАМК-модулин обнаружен и в печени крыс [7, 22], несмотря на отсутствие там ГАМК-рецепторов, хотя содержание его в этом органе значительно ниже, чем в мозгу [22].

Предварительные опыты показали, что введение очищенного ГАМК-модулина в желудочки мозга крыс усиливает судороги, вызванные действием изониазида, что, вероятно, обусловлено снижением действия эндогенной ГАМК, освобождаемой нервным импульсом [22].

В последующей работе Costa и соавт. было показано, что ингибирующая активность ГАМК-модулина исчезает после фосфорилирования этого белка сАМР-зависимой протенинкиназой *in vitro* [31]. Кальмодулинчувствительная протенинкиназа *in vitro* также фосфорилирует ингибитор, однако при этом его активность не изменяется, то есть различные протенинкиназы фосфорилируют функционально различные участки ГАМК-модулина. Эндогенные протенинкиназы, активируемые сАМР, Ca^{2+} и кальмодулином, также оказались способны фосфорилировать ингибитор. На основании полученных данных высказано предположение, что *in vivo* фосфорилированию ГАМК-модулина принадлежит важная роль в регуляции числа участков связывания ГАМК на постсинаптической мембране [31].

Завершением работ цитированной группы авторов явилась гипотеза, согласно которой ГАМК-модулин является интегральным компонентом постсинаптического рецептора ГАМК, который *in vivo* с помощью аллостерического механизма регулирует сродство рецептора к его эндогенному эффектору, опосредует потенцирующее действие бензодиазепинов на связывание ГАМК и, возможно, является посредником между участком связывания медиатора и Cl^- -ионофором [33].

Хотя работы группы Costa E. по изучению эндогенных белковых ингибиторов постсинаптических ГАМК-рецепторов производят впечатление наиболее последовательных, детальных и логически привлекательных, их теория пока не получила всеобщего признания. Попытка воспроизвести результаты их работ в других лабораториях пока не удалась [19]. Одним из вероятных объяснений этого может быть возможность разрушения высокомолекулярного белкового ингибитора под воздействием эндогенных протеаз на низкомолекулярные компоненты, которые, в свою очередь, способны изменять Na^+ -независимое связывание ^3H -ГАМК. В частности, в одной из работ тех же авторов было продемонстрировано существование диализуемого низкомолекулярного ингибитора неидентифицированной природы, который неконкурентно блокировал рецепторное связывание ^3H -ГАМК с синаптиче-

скими мембранами коры мозга, не разрушался протеолитическими ферментами и обладал способностью связывать ГАМК [10]. Кроме того, нельзя исключить и другую возможность, а именно агрегацию низкомолекулярных ингибиторов ГАМК-рецепторов в высокомолекулярные комплексы в ходе выделения и последующей очистки.

Обобщая имеющиеся в литературе данные, можно заключить, что в ЦНС животных в качестве интегрального компонента синаптических мембран или примембранных слоев присутствуют вещества, ингибирующие связывание ^3H -ГАМК с постсинаптическими рецепторами, однако вопросы о природе этих ингибиторов, механизме ингибирования и их роли в функционировании рецепторов *in vivo* до сих пор остаются неясными. Несомненно, что одним из таких веществ является эндогенная ГАМК, конкурентно блокирующая связывание ^3H -ГАМК с рецепторными участками (её можно назвать ложным или кажущимся ингибитором). Обнаружены также вещества, способные к некооперативному ингибированию Na^+ -независимого связывания ^3H -ГАМК. Различные группы авторов считают, что этими веществами могут быть фосфолипиды, пурины, пептиды, белки и низкомолекулярные факторы неидентифицированной природы. Однако наиболее вероятно, что фосфолипиды модифицируют работу ГАМК-рецепторов постсинаптических мембран, регулируя доступность молекул медиатора к участкам связывания и не являются истинными эндогенными ингибиторами. Вопрос о роли пуринов в работе ГАМК-ергических нейронов весьма проблематичен; вероятно, пурины являются эндогенными лигандами бензодиазепинового рецептора, функционально сопряженного с ГАМК-рецептором, и таким образом могут оказывать косвенное влияние на связывание ГАМК с рецепторными участками. Предположение о роли низкомолекулярных веществ в регуляции постсинаптической рецепции ГАМК пока не получило окончательного экспериментального подтверждения. Наиболее убедительны в настоящее время данные о том, что эндогенным ингибитором ГАМК-рецептора является ГАМК-модулин—термо- и кислотоустойчивый белок с величиной M_r 17 кД, в концентрации более 0,5 мкМ некооперативно ингибирующей Na^+ -независимое связывание ^3H -ГАМК с синаптическими мембранами. Активность ГАМК-модулина изменяется за счёт его фосфорилирования cAMP-зависимой протеинкиназой. Не исключается возможность того, что этот белок является предшественником низкомолекулярных эндогенных ингибиторов постсинаптической рецепции ГАМК.

Эндогенные ингибиторы других рецепторов. Вопрос о существовании эндогенных ингибиторов и их роли в функционировании постсинаптических рецепторов впервые был поставлен при изучении ГАМК-рецепторов. Однако в последнее время появились работы, в которых указывается на существование эндогенных ингибиторов и для других рецепторов. Так, Zashek и соавт. сообщили о выделении из мозга крыс вещества, специфически ингибирующего связывание L^3H -глутамата с синаптическими мембранами [34]. Это вещество было полностью

очищено с помощью методов ионообменной хроматографии на Dowex и жидкостной хроматографии высокого давления. Им оказался пептид с блокированной аминной группой—N-ацетиласпартилглутамат. Этот пептид связывается только с глутаматными рецепторами и не оказывает влияния на специфическое связывание других нейромедиаторов с ГАМК-, мускариновыми и дофаминовыми рецепторами. При ионофоретическом введении он оказывает действие на кортикальные нейроны. Обсуждая физиологическую роль N-ацетиласпартилглутамата в функционировании глутаматных рецепторов, авторы высказывают предположение, что эндогенными возбуждающими нейромедиаторами являются не непосредственно аспартат и глутамат, а NH_2 -блокированные пептиды, обогащенные этими кислыми аминокислотами [34]. Однако, возможно, эти пептиды являются эндогенными ингибиторами глутаматных рецепторов.

Недавно было обнаружено, что супернатант, полученный при высокоскоростном центрифугировании гомогената мозга крыс, обладает ингибирующим влиянием на связывание α -бунгаротоксина с синаптическими мембранами [35]. Вместе с тем, эта неочищенная фракция не влияла на связывание меченых медиаторов или их аналогов с дофаминовыми, α_1 -адренергическими и мускариновыми холинергическими рецепторами. Полученные данные авторы обсуждают в плане существования эндогенных лигандов для α -бунгаротоксиновых рецепторов.

Показано также существование эндогенного ингибитора рецепторного связывания бензодиазепинов в ЦНС крыс. Полагают, что им является термостабильное вещество с величиной M_r от 2 до 10 кД (по данным ультрафильтрации), которое увеличивает K_d и снижает общее число мест связывания ^3H -дiazепама с синаптическими мембранами [36]. Эндогенный ингибитор бензодиазепиновых рецепторов, полученный в очищенном виде Guidotti и соавт. представляет собой полипептид с величиной M_r 11 кД, чувствительный к протеолитическим ферментам, с высоким содержанием кислых аминокислот, концевая аминная группа которого блокирована. Этот полипептид конкурентно ингибирует связывание меченых лигандов бензодиазепиновых рецепторов и не влияет на связывание ГАМК, аденозина и эторфина. Исходя из конкурентного характера ингибирующего действия, авторы заключают, что обнаруженное вещество является эндогенным лигандом бензодиазепиновых рецепторов и может играть модулирующую роль в тонкой настройке ГАМК-рецептора [37].

Таким образом, в последние годы показано, что в мозгу крыс присутствуют вещества, ингибирующие связывание меченых медиаторов, их агонистов или антагонистов с ГАМК-рецепторами, глутаматными рецепторами, рецепторами α -бунгаротоксина, бензодиазепиновыми рецепторами. Эти вещества могут быть как эндоген-

ными липандами перечисленных рецепторов (тогда кинетика ингибирования имеет конкурентный характер), так и эндогенными ингибиторами рецепторов (кинетика ингибирования в этом случае может иметь как конкурентный, так и неконкурентный характер). В настоящее время вопрос о роли этих веществ в функционировании постсинаптических рецепторов нейромедиаторов и их природе только поставлен. Решение его будет способствовать пониманию регуляции синаптической передачи на уровне постсинаптических мембран и, возможно, откроет новые пути направленных фармакологических воздействий на ЦНС.

ENDOGENOUS INHIBITORS OF POST-SYNAPTIC GABA RECEPTORS IN MAMMALIAN BRAIN

PARFENOVA E. V.

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

Modern controversial data on the nature of endogenous modulators inhibiting specific Na^+ -independent ^3H -GABA binding to its post-synaptic receptors in mammalian brain is discussed. The existence of endogenous inhibitors of the post-synaptic receptors of some neurotransmitters other than GABA is considered. It is proposed that in vivo endogenous inhibitors affect the synaptic transmission on the post-synaptic membrane level.

ЛИТЕРАТУРА

1. Peck E. I., Schaeffer I. M., Clark J. H. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, v. 52, p. 394—400, 1973.
2. Zukin S. R., Young A. B., Snyder S. H. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 71, p. 4802—4807, 1974.
3. Greenlee D. V., Van Ness P. C., Olsen R. W. *J. Neurochem.*, v. 31, p. 933—933, 1978.
4. Lester B. L., Peck E. J. *Brain Res.*, v. 161, p. 79—97, 1979.
5. Van Ness P. C., Olsen R. W. *J. Neurochem.*, v. 33, p. 593—596, 1979.
6. Olsen R. W., Bergman M. O., Van Ness P. C., Lummis S. C., Watkins A. E., Naplas C., Greenlee D. V. *Mol. Pharmacol.*, v. 19, p. 217—227, 1981.
7. Toffano G., Guidotti A., Costa E. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 75, p. 4024—4028, 1978.
8. Toffano G., Aldinio C., Balzano M., Leon A., Savoini G. *Brain. Res.*, v. 222, p. 95—102, 1981.
9. Bowery N. G., Hill D. R., Hudson A. L. *Brit. J. Pharmacol.*, v. 78, p. 191—206, 1983.
10. Massotti M., Mazzari S., Schmid R., Guidotti A., Costa E. *Neurochem. Res.*, v. 6, p. 551—565, 1981.
11. Yoneda Y., Kuriyama K. *Nature*, v. 285, p. 670—673, 1980.
12. Kuroda H. *Acta Med. Okayama*, v. 37, p. 93—106, 1983.
13. Lloyd K., Davidson L. *Science*, v. 205, p. 1147—1149, 1979.
14. Skerrett J. H., Johnson G. A. *Dev. Neurosci.*, v. 5, p. 189—197, 1982.

15. *Palacios J. M., Nichoff D. L., Kuhar M. J. Brain. Res.*, v. 179, p. 390—395, 1979.
16. *Greenlee D. V., Van Ness P. C., Olsen R. W. Life Sci.*, v. 22, p. 1653—1662, 1978.
17. *Napias C., Bergman M. O., Van Ness P. C., Greenlee D. V., Olsen R. W. Life Sci.*, v. 27, p. 1001—1011, 1980.
18. *Gardner C. R., Klein J., Grove J. Eur. J. Pharmacol.*, v. 75, p. 83—92, 1981.
19. *Lagoś N., Valdes F., Orrego F. Neurochem. Int.*, v. 5, p. 325—331, 1983.
20. *Giambalvo C. T., Rosenberg F. J. Biochim. et biophys. acta*, v. 436, p. 741—756, 1976.
21. *Guidotti A., Toffano G., Costa E. Nature*, v. 275, p. 553—555, 1978.
22. *Guidotti A., Konkel D. R., Ebstein R., Corda M. G., Wise B. C., Kruttsch H., Meek J. L., Costa E. Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 79, p. 6084—6088, 1982.
23. *Johnston G. A., Kennedy S. M. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, v. 6, p. 686—687, 1979.
24. *Ticku M. K., Burch T. Biochem. Pharmacol.*, v. 29, p. 1217—1220, 1980.
25. *Koide B., Florey E. Comp. Biochem. and Physiol.*, v. 51 C, p. 13—23, 1975.
26. *Watkins J. C. J. Theor. Biol.*, v. 9, p. 37—49, 1965.
27. *Ito Y., Kuriyama K. Brain. Res.*, v. 236, p. 351—363, 1982.
28. *Nishimura C., Ohkuma S., Tamura J., Kuriyama K. Neurochem. Inten.*, v. 4, p. 413—418, 1982.
29. *Fujimoto M., Okabayashi T. Life Sci.*, v. 32, p. 2393—2400, 1983.
30. *Asano T., Spector G. Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 76, p. 977—989, 1979.
31. *Wise B. C., Guidotti A., Costa E. Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 80, p. 886—890, 1983.
32. *Baraldi M., Guidotti A., Schwartz J. P., Costa E. Science*, v. 205, p. 821—823, 1979.
33. *Costa E.*—In: *Receptor as supramolecular entities* (eds. G. Biggio, E. Costa), p. 213—235, Pergamon Press, 1983.
34. *Zaczek R., Koller K., Cotter R., Heller D., Coyle J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 80, p. 1116—1119, 1982.
35. *Quik M. Brain Res.*, v. 245, p. 57—65, 1982.
36. *Корнеев А. Я., Фактор М. И. Бюл. эксперим. биол. и мед.*, т. 7, с. 64—65, 1983.
37. *Guidotti A., Forchetti C. M., Corda M. G., Konkel D., Bennett C. D., Costa E. Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 80, p. 3531—3535, 1983.

Поступила 27. VIII 1985

МЕДЬСОДЕРЖАЩИЕ БЕЛКИ МОЗГА И ИХ ЗНАЧЕНИЕ
В ЭТИОЛОГИИ ШИЗОФРЕНИИ

НАЛБАНДЯН Р. М.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Анализируются «медные» концепции шизофрении. Рассмотрены свойства нейрокупрена, основного медьсодержащего белка мозга, обладающего вазодилатирующими свойствами. Этот белок способен связывать катехоламины и взаимодействовать с ними по окислительно-восстановительному пути. Обсуждается роль нейрокупрена в этиологии шизофрении.

Двадцатый век характеризуется резким ростом не только сердечно-сосудистых и опухолевых заболеваний, но и психических, среди которых основное место занимает шизофрения. Достаточно отметить, что более половины коек в психиатрических больницах занято больными с диагнозом «шизофрения». Этой болезнью в настоящее время болеют около 20 млн. человек, представителей всех человеческих рас. Несмотря на некоторые успехи в лечении, связанные, главным образом, с применением нейролептиков, число заболеваний шизофренией во всем мире продолжает расти,—в развитых странах ею болеет до 2% населения.

Болезнь поражает человека в расцвете творческих сил, вследствие чего общество несет огромные потери. Поэтому во многих странах в последние годы резко увеличены ассигнования на изучение шизофрении. Например, только за последние 5 лет в США расходы на исследовательскую работу по шизофрении составили более 100 млн. долларов.

В терапии шизофрении еще не достигли таких впечатляющих успехов, как в последние годы в лечении сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний. Одна из основных причин этого в том, что до сих пор не разработаны более или менее адекватные модели для изучения этого заболевания.

Этиология шизофрении. Вопрос о природе дефектов при шизофрении задается вот уже более 60 лет, однако этиология этого заболевания все еще не установлена. Время от времени на очередном нейрохимическом конгрессе или в каком-либо из многочисленных журналов нейрохимического профиля можно услышать или прочитать сооб-

щения об открытии «субстанции», ответственной за шизофрению, или об обнаружении некоторых, часто весьма незначительных, метаболических отклонений при этой болезни. Однако большинство этих гипотез и экспериментальных данных не выдерживало проверки временем. Обзор ранних представлений об этиологии шизофрении был приведен нами ранее [1], а современное состояние многих из этих гипотез рассмотрено в недавнем обзоре [2]. Большинство исследователей в настоящее время, по-видимому, отказалось от распространенной ранее точки зрения на шизофрению как чисто генетическое заболевание, хотя многие и сегодня полагают, что генетические факторы играют какую-то предрасполагающую роль [3]. Определенное значение в этиологии заболевания придается характеру питания [4, 5]. В целом, однако, вопрос о влиянии среды обитания, факторов питания, в частности влияния различных микроэлементов, еще плохо изучен [6]. В последние годы значительное распространение получила вирусная теория этиологии шизофрении [7—11]. Имеется много вирусов, относящихся к нейротропным, то есть инфицирующим нервную ткань. Ряд вирусов типов herpes, polio, rabies, zoster атакует отдельные, иногда очень небольшие, участки мозга. Цитомегаловирус (ЦМВ), относящийся к вирусам herpes, инфицирует лимбическую систему мозга, которая подвергается изменениям при шизофрении. Имеющиеся данные показывают, что уровень антител ЦМВ у больных шизофренией значительно выше, чем в контроле. ЦМВ может инфицировать мозг человека еще в зародышевом состоянии, оставаясь в неактивной форме многие годы, даже десятилетия. Таким образом, вирус атакует плод очень рано, еще в первые месяцы беременности. Вирусная теория шизофрении привлекает внимание своей способностью объяснять многие установленные факты, такие как зависимость частоты заболевания от уровня жизни и времени года рождения, сезонные обострения заболевания, переход болезни в хроническую форму и т. д. Данные новейших диагностических подходов, например компьютерной томографии, указывают на увеличение при шизофрении по сравнению с нормой «пазух» в мозгу, заполненных ЦБЖ, которые, вероятно, являются следствием инфицирования мозга вирусом. Не случайно изучению ЦМВ как возможного этиологического агента при шизофрении и анализу возможности использования антител к ЦМВ для борьбы с этим заболеванием посвящаются специальные симпозиумы [11]. Окончательное доказательство вирусной этиологии шизофрении может резко изменить стратегию поиска эффективных подходов для терапии этого заболевания. С этой целью прежде всего представляется важным выявить все звенья взаимодействия вируса с клеточными структурами НС, и в частности, с дофаминовыми рецепторами (см. ниже).

Нейрохимические концепции шизофрении. Независимо от того, какая из теорий этиологии шизофрении верна, с точки зрения нейрохимии очевидно, что наблюдающиеся при этом заболевании изменения

поведения, восприятия, настроения, познавательной способности и т. д. в конечном счете отражают происходящие при шизофрении изменения в синапсах, то есть нейрохимически болезнь прежде всего отражается в изменении процессов в синапсах. Первый вопрос, который возникает в связи с этим выводом, состоит в том, какие синапсы и нейромедиаторы оказываются вовлеченными в патологический процесс при шизофрении. Острые споры вокруг этих проблем еще не окончены. Тем не менее, большинство исследователей придерживается мнения, что нарушения происходят в ДА-ергической и (или) норадренергической системах. В пользу этих концепций обычно приводят следующие факты: 1. Нейролептики блокируют дофаминовые рецепторы, в частности D-2 рецепторы, причем во многих случаях наблюдается корреляция эффективности блокирования с симптоматическим эффектом нейролептиков [12]. 2. Ряд соединений (амфетамин, β -фенилэтиламин, метилфенилат, L-ДОФА, диметилтриптамин) при введении людям вызывают психозы, симптоматика которых напоминает шизофрению. Оказалось, что все эти соединения либо увеличивают содержание дофамина в мозгу, либо стимулируют его сборачиваемость и выделение [13]. 3. Однако нарушения в ДА-ергической системе не способны объяснить всех симптомов заболевания [14], в частности таких, как аутизм, отсутствие мотивации, которые могут быть обусловлены дефицитом норадреналина. Принятие этой концепции влечет за собой предположение, что болезнь может быть обусловлена дисбалансом между норадреналином и его предшественником дофамином. 4. В патологии шизофрении могут вовлекаться только системы, взаимодействующие с ДА-ергическими путями. К ним, помимо адренергической, относятся также ГАМК-ергическая и эндорфинная системы. Действительно, сообщалось об улучшении состояния больных под влиянием анорморфина, пропроналола, налоксона, γ -эндорфина и γ -оксимасляной кислоты [15—19]. 5. Наконец, обмен дофамина тесным образом связан с метаболизмом меди, а её значение в патологии шизофрении уже давно установлено [20]. Этому вопросу посвящен и недавно написанный критический обзор Bowman, Lewis [21].

Медный статус организма и содержание дофамина в мозгу. Уже одно только рассмотрение путей метаболизма дофамина показывает, что его уровень зависит от активности ряда медьсодержащих ферментов (рисунк). Когда уровень меди высок, насыщенность этих ферментов медью также высока, и, следовательно, их активность максимальна. При высоком уровне меди часть тирозина, являющегося предшественником дофамина, окисляется медьсодержащим ферментом тирозиназой. Тем самым снижается количество дофамина. Кроме того, ДОФА-декарбокслеаза сильно ингибируется медью. Поэтому снижается также синтез дофамина из ДОФА.

В свою очередь, распад дофамина, помимо флавиновых аминоксидаз, катализируется медьсодержащей аминоксидазой и медьсодержащей о-дифенолоксидазой. Дофамин используется для синтеза нор-

адреналина также при помощи медьсодержащего фермента—дофамин- β -гидроксилазы. Таким образом, при высоком уровне меди ингибируются процессы образования дофамина и увеличивается активность и степень его утилизации.

Итак, высокий уровень меди должен приводить к понижению стационарной концентрации дофамина в мозгу. Очевидно также обратное положение—следствием дефицита меди в мозгу должно быть увеличение уровня дофамина в мозгу. Если шизофрения связана с высоким уровнем дофамина, то концепция предполагает, что в качестве общего подхода к терапии необходимо создавать условия для повышения уровня меди в мозгу. Между тем, не все имеющиеся экспериментальные результаты укладываются в столь однозначную схему. Так, об-

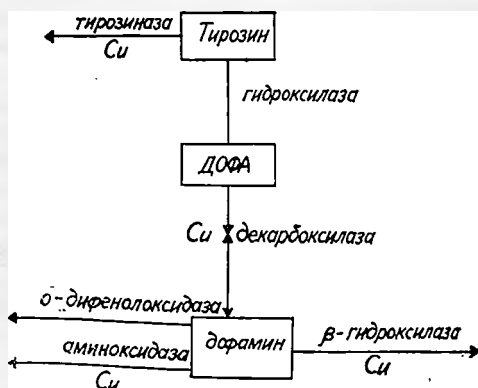


Рис. Участие меди в процессах образования и распада дофамина

наружилось, что у крыс дефицит меди приводит не к увеличению, а к уменьшению на 30% содержания дофамина и норадреналина, хотя не во всех участках мозга наблюдаются аналогичные изменения этих аминов [22]. Известно, что хронический дефицит меди обычно приводит к снижению уровня всех медьсодержащих ферментов [23]. Далее, по крайней мере некоторые больные шизофренией, по-видимому, имеют не пониженный, а повышенный уровень меди в мозгу, и терапия некоторыми нейролептиками приводит к дальнейшему повышению её уровня [21, 24]. Для больных шизофренией характерно также повышенное содержание меди в волосах [25]. В то же время в СМЖ больных оно ниже, чем в норме [26]. В хронической форме содержание меди в СМЖ больных также ниже [27]. Хотя не все эти данные находят разумное объяснение, они указывают на возможное значение меди в этиологии шизофрении. Статус меди в организме чаще всего характеризуется уровнем в плазме кислого медьсодержащего гликопротеида—церулоплазмину, содержащего почти 90% меди плазмы. Неоднократно было показано, что при шизофрении содержание

церулоплазмину увеличивается по сравнению с нормой. Сам по себе этот факт уже давно сомнений не вызывает, поскольку он продемонстрирован в общей сложности более чем на 10 тыс. больных, принадлежащих ко всем расам и живущим на пяти континентах. Однако его интерпретация различными исследователями далеко не однозначна. Некоторые из них полагают, что повышенный уровень церулоплазмину является причиной шизофрении, тогда как другие считают его следствием заболевания. В первом случае логика подхода к терапии представляется простой—нужно удалить избыточное количество меди, связанной с церулоплазмином. Действительно, терапия хелаторами, и в частности пенициламином, а также содержание на диете с пониженным содержанием меди приводила к значительному улучшению состояния больных [28]. С другой стороны, предполагалось, что повышение уровня церулоплазмину может приводить к развитию симптомов заболевания шизофренией по той причине, что церулоплазмин способен окислять ряд биогенных аминов, среди них такие, продукты окисления которых обладают галлюцинаторными свойствами (например, норадренехром). Согласно этому представлению подавление оксидазной активности церулоплазмину (в том числе хелаторами меди)—путь терапии заболевания. Многие нейролептики способны взаимодействовать с церулоплазмином, выступая как ингибиторы этого медьсодержащего фермента. Таким образом, имеются две точки зрения относительно церулоплазмину как причины заболевания—одна из них рассматривает церулоплазмин как источник меди для ферментов мозга, а другая как оксидазу, приводящую к образованию соединений, ответственных за этиологию шизофрении. Вариантом последней является хорошо известная адренехромовая гипотеза. Обе ветви «церулоплазминовой» этиологии шизофрении находят некоторое подтверждение. У каждой из них имеются свои сторонники и противники. Однако существует еще одна точка зрения на значение повышенного уровня церулоплазмину при шизофрении. Она рассматривает повышение церулоплазмину при заболевании как неспецифическую ответную реакцию организма [29]. Действительно, церулоплазмин увеличивается практически при любых патологиях (туберкулез, артриты, гепатиты, нефриты, различные опухоли, вирусные, сердечно-сосудистые заболевания и т. д.), а также под влиянием некоторых гормонов, при беременности не только для шизофрении, но и для любого патологического процесса в организме и является ответной защитной реакцией организма на него. Поэтому предполагалось, что введение больным шизофренией дополнительного количества церулоплазмину должно способствовать преодолению болезни. Martens [30] вводил больным частично очищенный церулоплазмин и достиг почти 90% излечения, причем более половины больных имели «полную ремиссию». Хотя многие детали этой работы не были опубликованы, наиболее впечатляющие данные были получены для группы больных, находящихся в ост-

рой стадии. Было показано, что повышенный уровень церулоплазмينا является результатом заболевания. При этом церулоплазмин выполняет активную защитную роль, а не является просто следствием патологии. Успех Martens никогда не был повторен. Более того, ему не удалось воспроизвести собственные результаты, используя высокоочищенный препарат церулоплазмينا. Исходя из этого, он предположил, что нет оснований для дальнейшей поддержки гипотезы о роли церулоплазмينا в этиологии шизофрении. Между тем из этих данных, строго говоря, следовало только, что терапевтический фактор, если он действительно имеется, сопровождается более или менее очищенные препараты церулоплазмينا. Кроме того, было бы преждевременным исключать на основании этих данных возможность косвенного влияния церулоплазмينا.

Нам представляется, что есть две стороны, касающиеся роли церулоплазмينا в шизофрении. Одна из них относится к увеличению содержания церулоплазмينا как следствию развития в организме любого патологического процесса, что отражает только наличие в организме патологического процесса неспецифической природы, наблюдающегося не только при шизофрении, но и при других заболеваниях. Хорошо известна другая столь же общая неспецифическая реакция организма на развитие в нем любого патологического процесса—усиление липидной пероксидации [31]. Недавние исследования выявили, что церулоплазмин обладает свойством подавлять пероксидацию липидов. Фактически он является основным антиоксидантом плазмы [32, 33], поэтому увеличение церулоплазмينا при патологии действительно может рассматриваться как общая компенсаторная реакция, направленная на подавление липидной пероксидации. Иначе говоря, практически любая патология характеризуется двумя ответными реакциями: с одной стороны, увеличивается пероксидация липидов, а с другой—содержание в плазме ингибитора пероксидации церулоплазмينا. Уже одного этого достаточно, чтобы сохранить церулоплазмин, по крайней мере, в качестве вспомогательного средства для терапии практически любого заболевания. Поэтому представляется заслуживающим внимания дальнейшее изучение возможности применения высокоочищенного церулоплазмينا для терапии шизофрении.

Другая сторона вопроса о роли церулоплазмينا связана с наличием в плазме и в недостаточно очищенных препаратах церулоплазмينا фактора, который может быть связан именно с патологией шизофрении. Время от времени сообщается об обнаружении в плазме больных людей факторов, имеющих отношение к шизофрении. Полагают, что они способны проходить через ГЭБ. Однако к настоящему времени эти факторы еще плохо охарактеризованы. Если допустить, что они выполняют роль челнока между медью мозга и плазмы, то можно объяснить большую группу фактов с единой точки зрения. Действительно, перенос меди из плазмы к мозговым медьсодержащим ферментам, связанным с обменом дофамина, как мы видели, должен приводить

к понижению уровня меди в плазме. Согласно этой модели, увеличение церулоплазмينا в плазме, происходящее в результате неспецифической реакции организма при патологии, будет приводить также к увеличению меди в мозгу и, следовательно, к понижению в нем дофамина. Таким путем болезнь могла бы быть преодолена сама по себе. Действительно, в литературе можно найти случаи спонтанного излечения, хотя эти примеры немногочисленны. Такой же эффект ожидается, если церулоплазмин вводить дополнительно, как это делал Martens. Вопрос только в том, какие дозы чистого церулоплазмينا следует вводить и насколько длительно, чтобы медь в мозгу увеличилась до необходимого для терапии уровня. Очевидно также, что увеличения меди в мозгу можно достичь введением не только церулоплазмينا, но и непосредственно того фактора, который выполняет роль челнока меди между плазмой и мозгом. Если этот фактор присутствует в избыточных (аномальных) количествах, то без дополнительных предположений трудно предсказать возможные последствия такой ситуации. Однако если при этих условиях большее значение начинает приобретать обратный перенос меди (от мозга в плазму), то легко видеть, что при этом будет возрастать уровень дофамина в мозгу. Следовательно, согласно рассмотренной модели, фактор, выполняющий функции переносчика меди между плазмой и мозгом, может выступать как этиологический агент шизофрении. Непосредственные доказательства этой точки зрения можно было бы получить из данных по гемодиализу больных шизофренией. Однако имеющиеся к настоящему времени результаты противоречивы: сообщается как об улучшении состояния больных при гемодиализе, так и об отсутствии эффекта [34, 35]. Поэтому необходимы более подробные исследования влияния гемодиализа. Установление природы этого фактора значительно продвинуло бы наши знания об этиологии шизофрении. Можно предположить, что роль такого фактора способны выполнять сравнительно низкомолекулярные комплексы пептидов с медью, способные проникать из плазмы в мозг и обратно. Среди большой группы этих соединений особое внимание должны, вероятно, привлечь комплексы меди с эндорфинами.

Кислые медьсодержащие белки мозга. Рассмотренные выше медьсодержащие ферменты мозга, участвующие в обмене дофамина, объясняют только небольшую часть меди мозга. Мозг, как известно, является одним из богатых медью органов, уступая в этом отношении только печени. Большая часть меди в мозгу связана с крайне кислой белковой фракцией [36], из которой удается очистить несколько медьсодержащих белков [37]. Наиболее подробно изучен медьсодержащий белок с величиной M_r около 10 кД, названный нейрокупреином [38]. Он получен также из хромаффинных гранул [39]. Содержание меди в нейрокупреине составляет более 30% меди растворимой фракции мозга. Важным свойством нейрокупреина является его высокое сродство к катехоламинам. В своей окисленной фор-

ме он способен стехиометрически (неферментативно) окислять адрепалин, норадрепалин, а также дофамин по хиноидному пути с образованием соответствующих адренохромоподобных соединений [40], подобно недавно обнаруженной реакции катехоламинов с дофамин- β -гидроксилазой [41, 43]. С другой стороны, восстановленная форма белка способна окисляться адренохромом и родственными соединениями. Медь может быть удалена из нейрокупреина хелаторами, причем из восстановленного белка она удаляется легче, в частности даже таким хелатором, как адренохром.

Таким образом, все эти данные указывают на возможную роль нейрокупреина при шизофрении. Действительно, во-первых, нейрокупреин является одним из важнейших медьсодержащих белков мозга. Во-вторых, он способен взаимодействовать с катехоламинами, и в частности с дофамином, как связывая их, так и входя с ними в окислительно-восстановительную реакцию. Таким образом, нейрокупреин является еще одной медьсодержащей системой мозга, связанной с дофамином. И хотя бы по этой причине он должен рассматриваться как важнейшее недостающее звено в нейрохимических концепциях шизофрении. Легко видеть значение нейрокупреина как буферной системы, способной нейтрализовать избыточные количества дофамина, если они образовались в мозгу. Его возможная функция скорее всего связана с участием этого белка в обратном захвате катехоламиновых нейромедиаторов, благодаря которому может предотвращаться развитие гиперчувствительности. То, что уже известно о свойствах этого белка, побуждает думать о том, что шизофрения может развиваться, когда на фоне повышенного уровня дофамина (или норадрепалина) обнаруживается сравнительно пониженное содержание нейрокупреина. Поскольку повышенный уровень дофамина, как мы видели, является следствием понижения активности медьсодержащих ферментов, участвующих в обмене дофамина, нейрокупреин способен компенсировать эффект понижения активности этих медьсодержащих ферментов, обусловленный снижением уровня меди в мозгу. В этой связи возникают вопросы, касающиеся роли меди в самом нейрокупреине. В какой мере она существенна для выполнения функции связывания катехоламинов? Как указано выше, адренохромоподобные соединения способны окислять восстановленную медь нейрокупреина и даже удалять ее из белка. Поэтому очевидно, что повышение уровня адренохромоподобных соединений в мозгу может приводить к дестабилизации нейрокупреина, и следовательно, затруднять выполнение им функции связывания избыточных количеств катехоламинов. В отсутствие меди белок уже не способен восстанавливать адренохромоподобные соединения. Однако, вероятно, роль меди в белке не исчерпывается этими функциями. Заслуживает экспериментальной проверки способность нейрокупреина обмениваться медью с фактором, выполняющим роль челнока между плазмой и мозгом.

Создается впечатление, что благодаря нейрокупреину удается примирить, по крайней мере, три-четыре нейрохимические концепции шизофрении, которые ранее считались взаимоисключающими. К ним относятся медная, дофаминовая и норадреналиновая гипотезы, а также представления о плазменном факторе и адренохроме как этнологических корнях развития заболевания. Она естественным образом позволяет объяснить подавляющее большинство имеющихся экспериментальных данных, казавшихся ранее несовместимыми, например, положительный эффект как хелаторов, так и церулоплазмينا, отсутствие в ряде случаев антибатной корреляции между общими уровнями меди и дофамина и т. д. Так, терапевтический эффект хелаторов может быть связан с тем, что медь удаляется главным образом не из медьсодержащих ферментов метаболизма дофамина, а из нейрокупреина. Нами показано [42], что нейрокупреин обладает вазодилатационным свойством в отношении мозговых сосудов. Характерно, что таким же свойством обладает церулоплазмин. Пока трудно оценить значение этих наблюдений для этнологии шизофрении, однако уже сейчас очевидно, что на фоне пониженного уровня этих белков может облегчаться развитие спастических состояний мозговых сосудов, и следовательно, их пониженный уровень благоприятствует развитию гипоксии мозга. Достоинством нейрокупреиновой гипотезы шизофрении является то, что она может быть проверена непосредственными экспериментами. Эта гипотеза имеет определенные перспективы развития, в частности, связанные с установлением функций других крайне кислых медьсодержащих белков с большой величиной M_r , обнаруженных в мозгу, и их взаимосвязи с нейрокупреином. Определенный интерес представляет также изучение первичной структуры нейрокупреина с целью выявления в нем последовательностей, характерных для нейроактивных пептидов, в частности эндорфинов. Кроме того, заслуживает внимания поиск в плазме белков, напоминающих по свойствам нейрокупреин. Проблема, однако, заключается в том, что нейрокупреин и церулоплазмин имеют сходные изоэлектрические точки, а содержание нейрокупреина, если он присутствует в плазме, должно быть намного ниже, чем содержание церулоплазмينا.

В любом случае, всякая вновь создаваемая нейрохимическая теория возникновения шизофрении должна будет учитывать наличие в мозгу крайне кислого медьсодержащего белка, объясняющего большую часть меди мозга, способного связывать и входить в редокс-реакции с катехоламинами и расширять сосуды мозга.

COPPER-CONTAINING PROTEINS OF BRAIN AND THEIR SIGNIFICANCE IN ETIOLOGY OF SCHIZOPHRENIA

NALBANDYAN R. M.

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

Copper concept of schizophrenia has been analyzed. Properties of neurocuprein, the major copper-containing protein of brain were considered. This protein is able to bind catecholamines and to interact with them by a redox way. Neurocuprein is a vasoactive protein. The role of neurocuprein in the etiology of schizophrenia is put forward.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Налбандян Р. М. Вopr. биохимии мозга, т. 7. с. 221—232, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1972.
2. Rodnight R. J. *Neurochem.*, v. 41, № 1, p. 12—21, 1983.
3. Kessler S. *Schizophrenias Bull.*, v. 6, p. 404—416, 1980.
4. Dohan F. C., Grashberger J. C. *Amer. J. Psychiatry.*, v. 130, p. 685—688, 1973.
5. Singh M. M., Kay S. R. *Science*, v. 91, p. 401—402, 1976.
6. *Lancet*, № 1, (8927), p. 744—745, 1983.
7. Kaufmann C. A. *Lancet*, № 8359, 12 nov., p. 1136—1137, 1983.
8. Karger S., Easel A. G. *Adv. in Biol. Psych.* (ed. P. V. Morozov), v. 12, 1983.
9. Terry E. F., Jolker R. H., Winfrey C. J. *Science*, v. 216, p. 892—894, 1982.
10. Griffiths P. D. *J. Infect. Diseases*, v. 148, № 3, p. 613—617, 1983.
11. Pass R. F., Stogno S., Broth W. J., Alford Ch. *J. Infect. Diseases*, v. 148, № 6, p. 953—961, 1983.
12. Randrup A., Munkvold J. *Orthomol. Psychiatry*, v. 1, p. 2—7, 1972.
13. Snyder S. H. *Amer. J. Psychiatry*, v. 130, p. 61—67, 1973.
14. Carlton P. L., Manowitz P. *Neurosci. and Biobehav. Revs.*, v. 8, № 1, p. 137—152, 1984.
15. Levy M. J., Davies B. M., Mohs R. C., Triglos G. C., Mathè A. A., Davies K. L. *Psychiatry Res.*, v. 9, № 1, p. 1—8, 1983.
16. Анохина И. П. *Вестн. Акад. мед. наук СССР*, № 1, с. 37—40, 1982.
17. van Praag H. M., Verhoeven W. M. A., van Pee J. M., de Wied D. *Biol. Psychiatry*, v. 17, p. 83—98, 1982.
18. Levy M. J., Davies B. M., Mohs R. C., Kendler K. S., Mathè A. A., Triglos G., Horvath Th. B., Davies K. L. *Arch. Gen. Psychiatry*, v. 41, № 5, p. 520—524, 1984.
19. Jorkston N. J., Gruzeltier J. G., Zaki S. A., Hollander D., Pitcher D. R., Sergeant H. G. S. *Lancet*, v. 2, p. 575—578, 1977.
20. Brener W. Z. *Kinderhelik*, v. 66, p. 14—18, 1949.
21. Bowman M. B., Lewis M. S. *Neurosci. Biobehav. Revs.*, v. 6, № 3, p. 321—328, 1982.
22. Feller D. J., O'Dell B. L. *J. Neurochem.*, № 34, p. 1259—1263, 1980.
23. Bohnenkamp W., Weser U. *Biochim. et biophys. acta*, v. 444, № 2, p. 396—406, 1975.
24. Curzon G. *Int. Rev. Neurobiol.*, v. 10, p. 323—330, 1967.
25. Petering H. G., Vecger D. W., Withrup S. O. *Arch. Envir. Health.*, v. 23, p. 203—207, 1971.
26. Tyrer S. P., Delvis H. T., Weller M. P. *Amer. J. Psychiatry*, v. 136, p. 937—939, 1979.

27. Shore D., Potkin S. G. Amer. J. Psychiatry, v. 140, p. 754—756, 1983.
28. Nicholson G. A., Griener A. C., McFarlane W. J. C., Baker R. A. Lancet, v. 1, p. 344—347, 1966.
29. Busila V. T., Dragomirescu M. Stud. Cercetari Med. Interne, v. 6, p. 157—160, 1965.
30. Martens S. Effect of exogenous human ceruloplasmin in the schizophrenic syndrome, Stockholm, 1966.
31. Прилико Л. Л., Лидежан Р. Р. Вестн. Акад. мед. наук СССР, № 1, с. 33—36, 1982.
32. Погосян Г. Г., Налбандян Р. М. Биохимия, т. 48, с. 1129—1134, 1983.
33. Nalbandyan R. M.—In: Oxygen radicals in chemistry and biology (eds. W. Bors, M. Sarau, D. Tait), p. 731—734, W. de Gruyter Berlin, 1984.
34. Wagemaker H., Cade R. Amer. J. Psychiatry, v. 134, p. 684—685, 1977.
35. Vanherweghem J. R., Jinkowski P., Mendelowicz J. Arch. Gen. Psychiatry, v. 40, p. 211—214, 1983.
36. Nalbandyan R. M. Neurochem. Res., v. 8, p. 1211—1232, 1983.
37. Шароян С. Г., Налбандян Р. М. Нейрохимия, т. 2, с. 389—391, 1983.
38. Sharoyan S. G., Shaljian H. H., Nalbandyan R. M., Buniatian H. Ch. Biochim et biophys. acta, v. 493, p. 478—487, 1977.
39. Grygorian N. A., Nalbandyan R. M., Buniatian H. Ch. Biochem. and Biophys Res. Commun., v. 100, p. 921—928, 1981.
40. Gasparov V. S., Nalbandyan R. M., Buniatian H. Ch. FEBS Lett., v. 97, p. 37—41, 1979.
41. Boyajian A. S., Nalbandyan R. M. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 106, p. 1243—1255, 1982.
42. Мирзоян С. А., Маркарян В. М., Микаэлян М. В., Налбандян Р. М. Кровообращение, т. 16, с. 3—6, 1983.
43. Mikaelyan M. V., Nalbandyan R. M. Neurochem. International, v. 7, p. 1073—1078, 1985.

Поступила 7. VII 1985.



ХРОНИКА

НИКОЛАЙ НИКОЛАЕВИЧ ДЕМИН

(к 75-летию со дня рождения)

30 марта 1986 г. исполняется 75 лет со дня рождения одного из ведущих советских ученых-нейрохимиков, доктора биологических наук, профессора Н. Н. Демина.

Профессор Н. Н. Демин родился 30 марта 1911 г. в Минчуринске (б. Козлов) Тамбовской области. В 1928 г. Николай Николаевич опубликовал свою первую научную работу (Русский гидробиологический журнал, т. 7, с. 204) и в том же году



был избран членом Немецкого малакозоологического общества (Франкфурт-на-Майне).

В 1929—1934 гг. Николай Николаевич учился на биологическом факультете ЛГУ у таких всемирно известных ученых, как проф. Е. С. Лондон и акад. А. Д. Сперанский. Ещё будучи студентом университета, в 1933 г. Николай Николаевич был принят в лабораторию Всесоюзного института экспериментальной медицины, руководимую А. Д. Сперанским, где в 1933—1935 гг. им была выполнена серия исследований по биохимии мышц при столбнячной интоксикации. В этой работе был использован разработанный автором оригинальный прибор для определения рН тканей *in vivo* и *in situ*.

В 1935 г. Н. Н. Демин переезжает в Москву и по приглашению проф. Б. П. Збарского занимает должность ассистента возглавляемой им кафедры биохимии I Московского медицинского института. Здесь Николай Николаевич исследует способность эритроцитов транспортировать свободные аминокислоты крови при различных функциональных состояниях. Полученные результаты послужили основой кандидатской диссертации, успешно защищенной в 1940 г.

В первые годы войны Н. Н. Демин заведует кафедрой органической химии Омского медицинского института. В августе 1943 г. он возвращается в Москву и продолжает работу на кафедре биохимии I Московского медицинского института.

С 1946 по 1956 гг. Николай Николаевич работает в Институте морфологии животных им. А. Н. Северцова АН СССР. В лаборатории, руководимой член-корр. АН СССР Х. С. Коштыяцем, им был проведен большой цикл работ, основанных на оригинальной идее о возможности внесинаптической, а нередко и внутриклеточной метаболической активности нейромедиаторов, в частности ацетилхолина. Полу-

ченные материалы, экспериментально показавшие действие ацетилхолина *in vitro* на ряд биохимических процессов, составили основу докторской диссертации, которая была успешно защищена в 1954 г.

В 1956 г. Николай Николаевич избирается зав. лабораторией биохимии Института биофизики МЗ СССР, где продолжает свои исследования. Одновременно в 1956—1957 гг. он заведует кафедрой биохимии Московского технологического института мясной и молочной промышленности, где раскрывается новая грань дарования Н. Н. Демина—его блестящие педагогические способности.

С 1961 по 1983 гг. Николай Николаевич заведует лабораторией функциональной нейробиологии Института физиологии им. И. П. Павлова АН СССР, а с 1983 г. является профессором-консультантом. Здесь исследования по внесинаптической активности ацетилхолина и других нейромедиаторов получают дальнейшее широкое развитие. В результате был сформулирован общий вывод, согласно которому действие ацетилхолина на клеточный метаболизм осуществляется, прежде всего, через изменение свойств мембранных структур. Таким образом, эффект ацетилхолина как нейромедиатора в синапсах является частным случаем его общей мембранной активности.

Серией исследований по нейробиологии сна было показано, что биологическая необходимость сна высших животных и человека связана с необходимостью устранения (в условиях деафферентации) тех денатурационных изменений в белковых комплексах синаптических мембранных структур стволовой части головного мозга, которые постепенно накапливаются в процессе бодрствования.

Замечательная способность профессора Н. Н. Демина устанавливать творческое сотрудничество с различными научными учреждениями позволила ему значительно расширить свои исследования. В результате этого удалось разработать пути фармакологической профилактики нейробиологических нарушений при длительном вынужденном бодрствовании, изучить эволюционные аспекты проблемы сна, провести разностороннее изучение нейробиологии зимней спячки, выполнить цикл нейробиологических исследований, связанных с влиянием условий космических полетов на подопытных животных.

Перу Н. Н. Демина принадлежит около 150 научных работ, в том числе 2 монографии и ряд крупных обзоров.

Как видный ученый-нейробиолог профессор Н. Н. Демин широко известен не только в нашей стране, но и далеко за ее пределами. Он член Международного и Европейского нейробиологических обществ. Николай Николаевич многократно и достойно представлял нашу науку за рубежом, чему в большой степени способствовало прекрасное знание иностранных языков. Он выступал с докладами и лекциями во многих социалистических странах, а также в Италии, Франции, Великобритании, США, Японии.

Следует отметить разностороннюю научно-организационную деятельность профессора Н. Н. Демина. Он был ученым секретарем секции Комитета по государственным премиям СССР, членом экспертной комиссии ВАК, членом редколлегии различных журналов. Но главной в этой области является многолетняя и плодотворная работа Николая Николаевича на посту председателя Секции нейробиологии научного совета АН СССР по проблемам биохимии человека и животных (1971—1985). При его активном участии и в значительной мере под его руководством были организованы четыре Всесоюзные нейробиологические конференции, несколько местных научных совещаний и школ.

Руководимые Николаем Николаевичем регулярные заседания Секции, собираемые не реже двух раз в год, активно способствовали координации научных исследований по нейробиологии и установлению личных контактов между учеными, работающими в этой области. Сейчас Николай Николаевич—заместитель председателя Секции.

Трудно переоценить деятельность Николая Николаевича, связанную с основанием журнала «Нейробиология». На посту заместителя главного редактора этого журнала он принимает самое активное участие в его работе.

Правительство высоко оценило деятельность профессора Н. Н. Демниа, наградив его Орденом Трудового Красного Знамени, медалью «За Трудовую доблесть» и другими медалями.

Огромная эрудиция, доброжелательность и личное обаяние снискали Николаю Николаевичу заслуженный авторитет среди его многочисленных коллег и учеников.

Свой юбилей Н. Н. Демниа встречает полным сил и бодрости. Редколлегия сердечно поздравляет дорогого и глубокоуважаемого Николая Николаевича и желает ему здоровья, долголетия и дальнейших больших творческих успехов.

РЕДКОЛЛЕГИЯ



СИМПОЗИУМ «АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ СОВРЕМЕННОЙ
НЕЙРОХИМИИ», ПОСВЯЩЕННЫЙ 100-ЛЕТИЮ
СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ АКАДЕМИКА А. В. ПАЛЛАДИНА

В связи с исполнившимся 10 сентября 1985 г. 100-летием со дня рождения патриарха советской нейрохимии, одного из основателей и организаторов Международного нейробиохимического общества (1966 г.) академика А. В. Палладина в Киеве состоялось торжественное общее собрание Академии наук Украинской ССР. С докладами о жизни и деятельности А. В. Палладина и о его вкладе в развитие отечественной биохимии выступили вице-президент АН УССР академик Ф. С. Бабичев и председатель Всесоюзного биохимического общества академик С. Е. Северин. 11—13 сентября было проведено организованное Институтом биохимии им. А. В. Палладина АН УССР и Научным советом АН УССР по проблеме «Биохимия животных и человека» совещание «Актуальные проблемы современной нейрохимии», посвященное памяти А. В. Палладина. Участники совещания, прибывшие в Киев из Москвы, Ленинграда, Еревана, Тбилиси, Тарту, Горького, Нальчика, Кишинева, Ростова-на-Дону и других городов Советского Союза, посетили мемориальный музей-квартиру А. В. Палладина и его могилу, где состоялось возложение венков.

В ходе совещания были заслушаны и обсуждены 11 докладов ведущих нейробиохимиков Советского Союза о последних достижениях в области нейрохимии. Значительное место в работе симпозиума заняли вопросы, связанные с механизмами функционирования нервной клетки, в частности, с механизмами действия ионных каналов и регуляции мембранных АТРАЗ.

В большом проблемном докладе академика П. Г. Костюка «Роль кальция и циклических нуклеотидов в функционировании нервной клетки» были освещены вопросы сопряжения биофизических и биохимических процессов, лежащих в основе генерации нервного импульса. Использование нового методического подхода, позволяющего изучать биохимические и физиологические процессы на уровне отдельной клетки или части клетки (например, участка мембраны с одиночным ионным каналом) позволило установить, что если Na^+ -канал может генерировать потенциал независимо и без связи с клеточным метаболизмом лишь при наличии ионного градиента, то работа Ca^{2+} -канала прекращается при нарушении внутриклеточного гомеостаза. При этом убедительно показано, что для работы Ca^{2+} -канала необходимо непрерывное фосфорилирование белков канала и воротным механизмом для открытия Ca^{2+} -каналов является обмен циклических нуклеотидов, на основании чего акад. П. Г. Костюком предложена новая схема регуляции Ca^{2+} -каналов, включающая Ca^{2+} -зависимую и cAMP-зависимую системы регуляции работы каналов.

Академик АН УССР В. К. Лишко в своем докладе «Биохимические модели для изучения механизма проведения нервного импульса» познакомил участников симпозиума с новыми методическими подходами для изучения структуры и функции ионных каналов. В частности, изучение мембранных потенциалов и эффектов нейротоксинов (активирующих или ингибирующих Na^+ - и Ca^{2+} -каналы) на бесклеточной модели, позволяющей менять состав среды по обе стороны мембраны, на липосомах со встроенными канальными белками и на плоской искусственной мембране позволило получить новые сведения об ультраструктуре ионных каналов и о том, как ориентирован канал в мембране. Эти методические приемы позволили вплотную

подойти также к решению проблемы биогенеза мембранных белков и доказать существование белка-предшественника Na^+ -каналов, названного В. К. Лишко «каналом-формером». Этот белок выделен, очищен и охарактеризован, доказана его гликопротеиновая природа и «канальные» свойства, а также его цитоплазматическое происхождение.

Большой интерес вызвал доклад член-корр. АН Арм ССР А. А. Галояна «Биохимия кардиоактивных нейрогормонов мозга и сердца».

Ещё в 1962 г. А. А. Галоян был обнаружен и выделен группа полипептидных кардиотропных гормонов (K, C, G) из гипоталамуса животных. В 1967 г. на примере открытого им нейросекреторного, гормонообразования сердца автором была выдвинута концепция об эндокринном сердце. На основании огромного экспериментального материала по раскрытию гликопептидной природы кардиоактивных нейрогормонов, обнаружению специфических белков гипоталамуса, являющихся не только носителями, но и предшественниками гликопептидных нейрогормонов им была разработана пептидная теория регуляции метаболизма и функции висцеральных органов, в частности сердца, имеющая большое значение для развития нейроэндокринологии. В докладе были представлены масс-спектральные и другие характеристики индивидуальных соединений мозга и сердца (всего 11), принимающих участие в функционально-биохимических взаимоотношениях этих органов. Для сердечных гормонов органом-мишенью является мозг (гипоталамус), печень и *Sinus carotis*, а для гипоталамических кардиоактивных нейрогормонов—сердце и поджелудочная железа, которая также принимает участие (через гипоталамус) в регуляции метаболизма и функции сердца. Механизм стимулирующего действия нейрогормона «C» на биосинтез дофамина и норадреналина, а также ингибирования под его влиянием активности Ca^{2+} -кальмодулинзависимой фосфодиэстеразы cAMP и cGMP мозга, cAMP-зависимой протеинкиназы докладчик объяснил способностью нейрогормона «C» и его структурных аналогов изменять сродство ряда ферментов к белкам к связыванию ионов кальция.

Доклад А. А. Болдырева «Механизмы превращения энергии в системе Na^+ , K^+ -АТФазы» был посвящен центральной проблеме изучения АТФаз—механизму сопряжения потока энергии и ионов. Докладчик привел убедительные доказательства неправомерности переноса данных об активности гидролиза АТФ на состояние ионного транспорта и основное внимание уделил сопоставлению гидролитических и транспортных функций фермента на реконструированной системе в различных условиях при использовании широкого набора субстратов. При этом было показано, что транспорт ионов связан не с каталитическим (гидролитическим) центром, а с двумя аллостерическими центрами, и перевод K^+ -формы фермента в Na^+ -форму осуществляется аллостерическим центром низкого сродства, который способен связывать протон.

В докладе З. П. Кометиани «Особенности регуляции Na^+ , K^+ -АТФазной системы возбудимых мембран» были представлены результаты изучения регулирующего действия различных нейротрансмиттеров на Na^+ , K^+ -АТФазу, локализованную в синаптических мембранах различной эргичности. Автору удалось выявить ингибирующее действие АХ и ДА на АТФазу холинергических синаптических мембран, активирующее действие серотонина и ингибирующее НА на АТФазу адренергических синаптических мембран, а также различия в действии нейротрансмиттеров на Na^+ , K^+ -АТФазу различных отделов мозга. При этом показано, что действие нейротрансмиттеров осуществляется без участия системы циклических нуклеотидов. Эти данные ставят вопрос о том, имеет ли этот эффект нейротрансмиттеров какое-либо функциональное значение.

Нейрофармакологическим аспектам регуляции АТФазной системы был посвящен доклад Л. Я. Тахенылда, Э. И. Карелсона и У. С. Тарве «Роль транспортных АТФаз мозга в механизмах действия психотропных препаратов». Были представлены данные сравнительного исследования ингибирующего действия основных классов психотропных средств (нейролептиков, транквилизаторов, антидепрессантов и пси-

хостимуляторов) на активность Na^+ , K^+ , Ca^{2+} (Mg^{2+}) и актомиозиноподобной АТФазы мозга в сопоставлении с подавлением этими средствами психомоторной активности животных. Полученные данные позволили авторам прийти к заключению, что в основе обескормозного компонента в спектре действия психотропных средств, по-видимому, лежит их ингибирующее действие на Na^+ , K^+ -АТФазу за счет конкуренции их с Na^+ и K^+ за активный центр фермента, в то время как антипсихотическое действие нейролептиков связано с подавлением Ca^{2+} (Mg^{2+})-АТФазы.

Два доклада были посвящены нейрохимическим проблемам сенсорных систем. Так, в докладе Р. Н. Этингер «Функциональная роль и специфичность белков фоторецепторного нейрона: иммунохимический анализ» были представлены результаты оценки специфичности трех функционально важных белков (трансдуцина, ФДЭ циклических нуклеотидов и белкового ингибитора ФДЭ), фоторецептора и роли ФДЭ в изменении биоэлектрической активности сетчатки. Антитела к ФДЭ впервые были включены в липосомы, а из электрофизиологических экспериментов (совместно с В. И. Говардовским) следует, что они модулируют действие искусственных ингибиторов ФДЭ, не проникая при этом к месту локализации фермента в клетке. Таким образом, ставится под сомнение общепринятое представление о роли каталитической активности ФДЭ в фоторецепторном акте. В связи с этим изучены свойства антигенных участков ФДЭ, показано, что ФДЭ метилируется, как и другие белки наружного сегмента палочек сетчатки, выявлены зависимость этого процесса от GMP и тормозящее влияние белкового ингибитора ФДЭ. При помощи специально полученных моноспецифических антител установлено, что из 3-х изученных белков специфичным для ткани сетчатки является только белковый ингибитор ФДЭ. Обсуждена роль регуляторной субъединицы ФДЭ в процессе функциональной активности фоторецептора.

Второй доклад, посвященный биохимии фоторецептора,—доклад М. А. Острожского «Молекулярные механизмы фотоповреждения зрительных клеток»—привлек внимание аудитории как пример использования результатов фундаментальных исследований для решения практических задач медицины. Докладчик представил убедительные доказательства того, что в числе молекулярных механизмов повреждающего действия яркого освещения на структуру и функцию фоторецепторной мембраны лежит усиленное фотоокисление ненасыщенных липидов с накоплением продуктов их перекисного окисления и окисление SH-групп родопсина, что ведет к потере кативных свойств зрительного пигмента. Исследование поведения родопсина со спинной меткой методами ЯМР и ЭПР показало, что по мере увеличения дозы освещения и исчезновения SH-групп мономер родопсина превращается в ди- и тримеры, количество агрегированных форм растет и фоторецепторная мембрана перестает функционировать. Восстановление ее функций требует длительного времени. Исследование зависимости степени фотоповреждения от концентрации кислорода и цвета светофильтров позволило разработать систему защитных мер, включающих, в частности, применение желтых светофильтров и фармакологических средств из ряда антиоксидантов.

Вопросам функциональной нейрохимии был посвящен доклад Н. Ф. Авровой «Ганглиозиды нервной ткани, локализация и функциональная роль», в котором основное внимание было уделено обобщению последних данных о локализации различных молекулярных видов моно-, ди- и полисialogанглиозидов в нейронах, ганглионах клеток и миелине, о нейротрофических и нейротропных эффектах экзогенных ганглиозидов в культуре ткани и *in vivo* и об их участии в процессах дифференцировки клеток. Обсуждены также новейшие представления о роли ганглиозидов в межклеточном взаимодействии и в адгезии клеток, полученные на основе иммунохимического исследования ганглиозидов и гликопротеинов клеточной адгезии, а также об их участии в явлениях памяти и обучения. Докладчик обратила внимание слушателей на совершенно новый прикладной аспект использования ганглиозидов как специфических маркеров клеточных популяций в связи с обнаружением среди ганглио-

зидов (фукозил GMI) специфических антигенов карциномы, что открывает перспективы создания диагностических препаратов для выявления карцином.

В содержательном докладе *Е. С. Северина* «Молекулярные механизмы регуляции клеточной активности» была рассмотрена роль вторичных мессенджеров (сАМР, олиго-А, Ca^{2+} , диацилглицерина и др.) в регуляции разнообразных процессов жизнедеятельности клетки. Особое внимание докладчик уделил анализу действия олиго-А как специфического активатора ФДЭ сАМР в процессах пролиферации, в реализации противовирусных эффектов интерферона, в реализации эффектов NGF (фактора роста нервов), а также роли Ca^{2+} -связывающих белков в генерации физиологического ответа клетки на стимулирующие сигналы. Рассматривая механизмы регуляции ферментов метаболизма циклических нуклеотидов, автор дал подробную характеристику обнаруженному в его лаборатории новому белковому токсину стафилококка, который полностью имитирует активирующее действие кальмодулина на ФДЭ, но не требует ионов кальция. Автор подчеркнул, что вопрос об избирательности использования клеткой того или иного вторичного посредника для регуляции какого-либо процесса пока остается открытым.

Был также заслушан доклад *М. Д. Курского* «Механизмы транспорта кальция в мышцах и его регуляция». Докладчик показал, что везикулы сарколеммы миокарда являются удобной моделью для изучения пассивного транспорта Ca^{2+} через потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы, поскольку они в таких везикулах функционально активны, ингибируются рядом неорганических блокаторов Ca^{2+} -тока и управляются мембранным потенциалом. Представлены интересные данные о том, что сАМР и Ca^{2+} (кальмодулин)-зависимое фосфорилирование везикул сарколеммы миокарда угнетает пассивный транспорт Ca^{2+} через Ca^{2+} -каналы. Выявлена прямая корреляция между величиной фосфорилирования мембран и ингибирующим эффектом фосфорилирования на пассивный транспорт Ca^{2+} .

В заключительном слове директор Института биохимии имени *А. В. Палладина* АН УССР, академик АН УССР *В. К. Личко* поблагодарил участников совещания и отметил, что совещание продемонстрировало преемственность в развитии советской нейробиологии, которая выразилась в том, что здесь выступали те же докладчики, что и на конференциях, организованных при участии *А. В. Палладина*, в том числе и некоторые его ученики. Это является залогом дальнейшего плодотворного развития основных направлений советской нейробиологии.

В эти же дни в Киеве состоялось очередное заседание секции нейробиологии Научного совета АН СССР по проблемам биохимии животных и человека и редколлегии и редсовета журнала «Нейробиология».

На заседании секции были рассмотрены предложения, связанные с организацией очередной Всесоюзной нейробиологической конференции, рабочих совещаний, школ и симпозиумов и с формированием единого плана нейробиологических исследований на период 1986—1990 гг., а также решен ряд организационных вопросов.

Проф. *Н. Н. Демин* по его просьбе освобожден от обязанностей председателя Секции нейробиологии. Члены секции выразили ему сердечную благодарность за многолетний плодотворный труд на этом посту.

Председателем секции нейробиологии избран член-корр. АН АрмССР *А. А. Галоян*, заместителями — проф. *Н. Н. Демин* (Ленинград) и проф. *Р. И. Кругликов* (Москва).

В своем выступлении *А. А. Галоян* указал на необходимость расширения исследований по молекулярной нейрогенетике, геной инженерии нейроспецифических белков, рецепторов, различных нейропептидов, а также изучения нейробиологических аспектов генетических дефектов метаболизма. Он призвал также обратить большое внимание на всестороннее и глубокое изучение нейробиологии наркомании и алкоголизма, имеющих важное практическое значение.

Секция нейробиологии выразила персональную искреннюю благодарность академику АН УССР *В. К. Личко* за прекрасную организацию юбилейного симпозиума.

ТАРАНОВА Н. П.



X МЕЖДУНАРОДНОЕ СОБРАНИЕ ПО НЕЙРОХИМИИ

(Рива-дель-Гарда, Италия, 1985 г.)

С 19 по 25 мая 1985 г. в Рива-дель-Гарда (Италия) состоялось очередное X Международное собрание по нейрохимии. Его открыл вступительным словом А. А. Boulton (Канада), отметивший стремительное развитие нейрохимии, главным образом, исследований по молекулярной нейробиологии в период, прошедший после IX собрания, состоявшегося в Ванкувере. Во время официальной церемонии, посвященной памяти президента Международного нейрохимического общества проф. G. Porcellati (Италия) были отмечены его заслуги в организации этого форума в Рива-дель-Гарда. В своих выступлениях G. B. Ansell (Англия) и A. Lajtha (США) дали высокую оценку научной и научно-организаторской деятельности проф. G. Porcellati.

Был избран новый состав Совета международного общества по нейрохимии. Президентом общества на новый срок избран проф. A. Boulton, генеральным секретарем проф. V. P. Whittaker (ФРГ), казначеем — проф. B. W. Agranoff (США).

В новый совет вошли также: L. Austin (Австралия), N. Baumann (Франция), S. B. Blass (США), M. R. Cuenod (Швейцария), M. S. Dowdall (Англия), B. Drujan (Венесуэла), А. Галоян (СССР), A. Hamberger (Швеция), L. A. Horrocks (США), K. Kuriyama (Япония). Председателем следующего XI собрания Международного общества по нейрохимии был избран проф. A. Boulton.

В работе конгресса участвовало более 900 делегатов из 35 стран мира. Активное участие в его работе принимала делегация советских ученых (руководитель делегации А. А. Галоян), в состав которой входили Н. Ф. Аврова (Ленинград), Д. Г. Микеладзе (Тбилиси), М. Б. Агаларова (Москва). Состоялось два заседания совета общества (19 и 25 мая 1985 г.), на которых был обсужден ряд организационных вопросов — место и тематика организации сателлитных симпозиумов при XI конгрессе по нейрохимии (Венесуэла, 1987), возможность проведения XI Международного конгресса международного нейрохимического общества совместно с американским нейрохимическим обществом (ANS) и т. д. Рассматривался также вопрос о средствах организации помощи молодым нейрохимикам для более активного участия в ра-

боте конгрессов, стажировки в других научных центрах по нейрохимии.

Научная программа конгресса включила пленарную лекцию S. Numa (Япония) «Структурное и функциональное изучение никотинового ацетилхолинового рецептора методом молекулярного клонирования», 10 симпозиумов: 1—Влияние молекулярной генетики на нейрохимию; 2—Нейрональные мембраны: модулирование метаболизма липидов; 3—Функциональные изменения при посттрансляционной модификации в нервной ткани. 4—Нейрональные мембраны: роль ионных каналов. 5—Рецепторы нейротрансмиттеров: новые достижения; 6—Механизм аксонального транспорта; 7—Созревание мозга; 8—Молекулярные аспекты нейронального развития и пластичности; 9—Формирование (processing) нейропептидов; 10—Специфические макромолекулы в клеточных взаимодействиях в нервной системе, а также 6 коллоквиумов, 6 заседаний за круглым столом, 11 устных заседаний и 24 стендовые сессии, на которых было представлено 40% всех сообщений.

На различных коллоквиумах были обсуждены также следующие вопросы: молекулярные механизмы, лежащие в основе обучения и памяти, простагландины и лейкотриены в функции мозга, динамические аспекты накопления трансммиттеров в органеллах, будущее пересадки мозга, нейрональные мембраны (роль ионных каналов), последние достижения в изучении глимальных клеток, нейропептидов и белков; метаболизма мозга, нейрогистохимии и нейроиммуногистохимии, молекулярной нейрофармакологии, экспериментальной нейрохимической патологии и т. д. Сообщения по вышеуказанным разделам нейрохимии были представлены также в 24-х стендовых сессиях.

Значительным событием нейрохимического конгресса были работы по молекулярной генетике рецепторов нейротрансмиттеров. S. Numa привел данные о раскрытии полной первичной структуры, субъединичных структур никотинового ацетилхолинового рецептора из электрического органа Torpedo-California, а также натриевого канала путем молекулярного клонирования соответствующих генов. В докладе E. A. Bernard (Англия) были приведены данные о клонировании генов N-холино и ГАМК-рецепторов, а также субъединичной структуре опиоидных рецепторов. Молекулярно-генетические методы получили отражение и в изучении ферментов обмена катехоламинов. Группой французских ученых S. Mallet и др. была расшифрована первичная структура ключевого фермента биосинтеза катехоламинов тирозингидроксилазы путем анализа клонов кДНК, причем были изучены гены этого фермента в процессе развития катехоламинергических нейронов. Обнаружение гена тирозингидроксилазы у крыс позволило изолировать также человеческий ген и изучить его локализацию и полиморфизм в хромосомах, что будет способствовать изучению фермента в различных нейронах. Методы рекомбинантной ДНК используют для изолирования генов, кодирующих предшественники пептидов в иден-

тифицированных нейронах с известной функцией. В нейрохимических исследованиях начали применять гены эмбрионов дрозофилы, являющиеся удобным и простым объектом для молекулярно-генетических исследований свойств различных нейронов (C. S. Goodman и др., США). A. Giudetta и др. (Италия) показали транспорт мРНК по аксону кальмара. Им удалось выявить гетерогенное семейство мРНК в аксонах, в большом количестве она была обнаружена в микросомной фракции. Следует заметить, что несколько лет тому назад нами ставился вопрос о возможности транспорта информационной РНК по аксону из нейронов супраоптических и паравентрикулярных ядер гипоталамуса в нейрогипофиз.

Ora Bernard и др. (Австралия) изолировали ряд клонов, один из которых, обозначенный Р₃, оказался специфическим в отношении высокоосновного белка миелина мозга. Выделенная кДНК гибридизовалась с мРНК, изолированной из мозга, но не из других органов (печень, селезенка, почки, В и Т лимфоциты, тимус, фибробласты), а также с рестрикционными фрагментами, полученными из ДНК человека, мышей, быка. При гибридизации *in situ* в опытах со срезами мозга, используя эту кДНК авторы показали, что мРНК преимущественно экспрессируется во фронтальной коре, мозжечке, гипоталамусе. *In situ* гибридизация с изолированными клетками показала, что мРНК экспрессируется лишь в нейронах спинного мозга, но не в олигодендронитах и астроглии.

I. Iakahashi и др. (Япония) получили мРНК нейронспецифической синаптической ферментации, очищенной из свободных полисомов мозга крысы иммунохимическим методом с помощью хроматографии на олиго-(dT)-целлюлозе. кДНК синтезировали на матрице этой мРНК и клонировали олиго (dC-dG)-коннекторным методом. Были обнаружены кДНК из нейрональной железы, которые сравнивали с нейрональной синаптической. Оказалось, что кДНК нейрональной синаптической ферментации короче на 500 нуклеотидных остатков, а гомология аминокислотных остатков составляет лишь 82%.

D. W. Schmid (ФРГ) привел данные о библиотеке кДНК мозга *Torpedo marmorata*, из которой были изолированы клоны, специфические для холинергической функции. мРНК была изолирована из очищенных холинергических долей и использована для обратной транскрипции. Полученную кДНК включали в плазмиду pBR 322 олиго-(dC-dG)-коннекторным методом и трансформировали в клетки *E. coli* K 12. Тетрациклинрезистентные ампициллинчувствительные клоны переносились на нитроцеллюлозные мембранные фильтры и использовали для гибридизации *in situ* с различными радиоактивно мечеными пробами кДНК.

Этот метод позволяет выбирать участки, включающие холинергическую функцию перикарионной электрической доли. Было установлено, что в мозжечке имеется несколько или вовсе отсутствуют холинергические синапсы, и поэтому кДНК мозжечка не гибридизи-

ровалась с холинергическими специфическими участками. Из 3200 клонов 48 были отобраны этим методом дифференциальной гибридизации. Они соответствуют тем участкам, которые, вероятно, имеют отношение к регуляции, функции и дифференциации холинергической симпатической передачи. D. K. Batter и др. (США) изучали структуру и регуляцию гена фенилэтанол-амин-N-метилтрансферазы (Ф-N-MT) терминального фермента в биосинтезе катехоламинов, катализирующего превращение норадреналина в адреналин. ДНК, комплементарную к мРНК Ф-N-MT из мозгового слоя надпочечников, клонировали в pBR 322. Эту ДНК (650 п. о.) использовали как зонд для поиска гена Ф-N-MT.

В докладе A. Maggi и I. Zucchi (Италия) были приведены факты о механизме влияния эстрогенов на ЦНС млекопитающих. Было установлено, что введение овариэктомированным крысам эстрогенов вызывает увеличение полисомной активности и аккумуляирование поли-A(+) мРНК в мозгу *in toto*. В течение 24 ч эстрадиол бензоат (50 мкг/крыса) преимущественно увеличивал содержание поли A (+/-) мРНК в коре (+40%) и в гиппокампе (+60%) и поли A(—) мРНК в гипоталамусе (+35%). Была сконструирована библиотека кДНК гипоталамуса крыс, обработанных эстрогенами с целью изолирования методом дифференциальной гибридизации ДНК соответствующих генов, специфически индуцируемых половым гормоном.

A. Roses и др. (США) попытались выработать стратегию идентификации локуса генов и участков повреждения у больных со старческим слабоумием.

Ряд докладов был посвящен молекулярным аспектам *нейронального развития и пластичности*. Исключительно интересным в плане эволюции и функции симпатической и холинергической систем было сообщение S. C. Landis, G. Lebbong и L. Storens (США). Они обнаружили эволюционные изменения в нейротрансмиттерном фенотипе симпатических нейронов *in vivo*. Многие симпатические нейроны являются адренергическими, но некоторые, включая те, которые иннервируют потовые железы, являются холинергическими. Были изучены эволюционные механизмы такого выбора *in vivo*.

Потовые железы и их иннервация развиваются постнатально. Иннервация первоначально по фенотипу является адренергической. Тирозин и дофамин β -гидроксилазная иммунореактивности и катехоламиновая флуоресценция были выявлены в этих железах. С дальнейшим развитием выявляются холин-ацетилтрансферазная и ацетилхолинэстеразные активности и иммунореактивность в отношении двух пептидов (вазоактивный интестинальный и кальцитонинподобный пептиды), а проявление адренергических свойств ослабевает. Установлено, что эти изменения соответствуют фенотипному превращению (трансформации) в единственной популяции волокон потовых желез. Фенотипические изменения, наблюдаемые в волокнах потовых желез, соответствуют изменениям, ранее описанным для симпатических ней-

ронов в культуре. Под влиянием специфического растворимого фактора, выделенного из нейрональных клеток, пораженnergические нейроны могут превращаться в холинергические.

Данные о нейритстимулирующих факторах в эмбриогенезе спинного мозга эмбрионов кур были приведены в докладе *Ch. E. Henderson* и соавт. (Франция). Было установлено, что развивающиеся мотонейроны спинного мозга зависят от факторов роста, образуемых мышцами для их дифференциации. Эти факторы похожи на фактор роста нервов в отношении их влияния на чувствительные и симпатические нейроны-мишени. Экстракты эмбриональных мотонейронов *in vitro* стимулируют рост нейронов. Описанные факторы имеют M_r 40 кД и более, чувствительны к трипсину и продуцируются лишь клетками мышц и печени в культуре. Исследованиями *P. H. Patterson* (США) было обнаружено, что ненейрональные клетки секретируют комплекс высокомолекулярных протеогликанов, стимулирующий рост нейронов как периферической, так и ЦНС.

Ряд докладов на нейрохимическом собрании был посвящен функциональному значению посттрансляционных модификаций в НС.

M. B. Kennedy (США) продемонстрировала большой фактический материал о Ca^{2+} -зависимом фосфорилировании белков в НС, имеющем важное значение в нейрональных ответах при изменении концентрации кальция. В нервной ткани идентифицирован ряд различных Ca^{2+} -зависимых протеинкиназ и охарактеризованы особенности некоторых из них, в частности Ca^{2+} и липидзависимой С-киназы, Ca^{2+} -кальмодулинзависимой протеинкиназы и т. д. Для изучения функционального значения этих киназ в ответ на изменение концентрации ионов кальция важно знать их распределение в нейронах в различных отделах мозга и их субклеточных структурах. Новый класс протеинкиназ, названный Ca^{2+} -кальмодулинзависимые протеинкиназы II типа, особенно обильно представлен в мозгу. Радиоиммунохимия и иммуногистохимические исследования показывают, что кальмодулинзависимые протеинкиназы II типа расположены в большей мере в телэнцефалических нейронах, чем в нейронах из нижних отделов мозга. Это свидетельствует о важном значении Ca^{2+} в ответных реакциях телэнцефалических нейронов. Приблизительно половина этой киназы находится в растворимой форме, другая часть — в постсинаптических образованиях. Часть из них легко связана со структурой цитоскелотона. Эти киназы имеют M_r 500—700 кД и находятся не только в НС, но и в самых различных органах.

P. De Camilli (Италия) показал иммуногистохимическими методами локализацию фосфорилирующихся субстратов и протеинкиназы в различных частях мозга. Имеется гетерогенность нейронов по содержанию протеинкиназ и фосфопротеинфосфатаз и фосфопротеинов. Фосфопротеины находятся лишь в определенных классах нейронов и включаются, по-видимому, в процессы биосинтеза нейротрансмиттеров и модуляции сигналов (регуляторные белки протеинкиназ и фосфа-

таз). Была обсуждена также роль двух важных фосфопротеинов, широко распространенных в нервных популяциях—синапсин 1 и MAP 2. Синапсин 1—нейроспецифический фосфопротеин, включающийся в секреторный путь специфических нейронов. MAP 2, связанный с микротрубулами, избирательно концентрируется в перикарионе и дендритах, что может реализовать влияние нейротрансмиттеров на «дендритическом» цитоскелетоне.

N. Hutter и др. (ФРГ) привели данные о сульфировании тирозина белков в нейрональных и не нейрональных клетках. Сульфирование по тирозину белков было обнаружено во многих тканях у всех позвоночных и беспозвоночных животных. Они относятся к единому классу секреторных белков. Первичная функция сульфирования тирозина в белках может контролироваться такими пресекреторными процессами, как внутриклеточное накопление определенных секреторных белков. В ретине сульфирования по тирозину белки распределяются в везикулах мембран и достигают нервных окончаний. Они, в основном, локализованы аксональным током в аппарате Гольджи и пост-Гольджи. Сульфирование тирозина секреторных белков дает возможность «узнавать» их специфическими рецепторами.

Были представлены данные H. L. Ploegh (Нидерланды) о возможности биосинтеза N-гликанов. Многие из этих препаратов не токсичны и могут быть использованы в исследованиях с культурами нервной ткани. Важным событием можно считать обнаружение эктокиназ, осуществляющих фосфорилирование специфических субстратов на внешней поверхности нервных клеток (J. H. Ehrlich и др., США). Авторы показали, что внеклеточный АТР оказывает сильное влияние на активность мембран возбудимых клеток. Известно также, что АТР выделяется нервными окончаниями пуринергических нейронов. Нервные клетки, содержащие эктокиназы, утилизирующие внеклеточный АТР для фосфорилирования специфических белков, локализованы на внешней поверхности мембран. Используя клетки нейробластом, гибридизированных с глиальными клетками, авторы показали, что происходит фосфорилирование как эндогенных, так и внеклеточных (поверхностных) белков. Основные белки, фосфорилируемые эктокиназами, имеют M_r 190, 120, 97 и 33 кД. Это фосфорилирование чувствительно к Mn^{2+} , Ca^{2+} и блокаде кальциевых каналов—верапамину. Считают, эктокиназы играют важную роль в захвате кальция интактными нервными клетками.

Посттрансляционным модификациям гликопротеинов Шванновских клеток было посвящено сообщение S. F. Poduslo (США). Он показал значение двух α -1, 2-маннозидаз в превращении Man_6 , $GlcNAc_2$ в Man_3 , $GcNAc_2$. Предварительно предшественник этих тромбопластических соединений олигосахарида, связанный с аспарагином белка N-связью, распадается под влиянием эндо- β -N-ацетилглюкозаминидазы H.

Посттрансляционным изменениям подвергаются также хромосомные белки, что играет важную роль в транскрипции хроматина.

Как показано *M. Sngoglia* и др. (США), посттрансляционной модификаций могут подвергаться под влиянием ряда аминокислот (аргинин, лизин, лейцин, тирозин и аспарат) белки интактных и регенерирующих аксонов седалищного нерва. По данным *P. Mandel* (Франция), с изменением структуры хроматина связано АДР-рибозилирование белков в культуре астроцитов быстро растущей C_6 -глиомы крыс и кур. Важное значение имеет также их ацетилирование, метилирование и фосфорилирование (*I. Serra* и др., Италия). Посттрансляционная модификация путем ацетилирования и деацетилирования наблюдается и в синапсомных белках (*S. Berl* и др., США).

Значительное место в работе нейрохимического собрания заняло обсуждение вопросов, связанных с формированием (процессингом) нейропептидов.

Хорошо известно наличие генов-предшественников многих нейропептидов, содержащих более чем один биоактивный пептид. Примером таких полипептидов являются предшественники опиоидных пептидов. Опиоидные пептиды образуются из трех предшественников: проопиомеланокортина, проэнкефалина А (проэнкефалина) и проэнкефалина В (продинарфина). Были изолированы гены этих предшественников и определена их нуклеотидная последовательность. Экспрессия генов была изучена введением генов в овоциты лягушки и АГТ-20 клетки (клетки опухоли гипофиза мышей, которые синтезируют проопиомеланокортин, но не проэнкефалин). Была изолирована мРНК человеческого проопиомеланокортина и изучена роль кортикотропин-рилизингфактора, сАМР и гликокортикоидов в регуляции ее экспрессии. В АГТ-20 клетках, принимающих участие в процессинге проопиомеланокортина, были обнаружены калликреин, тиюловая протеаза и карбоксипептидаза. Аминокислотный состав этого калликреина отличается от калликреина, ранее открытого у мышей. мРНК калликреина находится в промежуточной доле (наиболее активный участок синтеза РОМС) гипофиза и гипоталамуса мышей.

Были идентифицированы также гипоталамические предшественники окситоцина, вазопрессина и соматостатина как крысы, так и крупного рогатого скота. Недавно были выделены предшественники человеческого соматостатина (45 кД) и вазопрессина (19 кД). Выделенный вазопрессиновый предшественник имеет С-концевой гликопептид с неизвестной пока функцией (*R. Ivell, D. Richter, ФРГ*).

Как известно, холецистокинин широко распространен в мозгу млекопитающих. Он является мощным нейротрансмиттером. Наряду с тем, что холецистокинин находится в коре мозга в высоких концентрациях, происходит быстрая трансляция и процессинг препро-холецистокинина. Структура этого нейропептида у человека, свиньи и крысы уже известна. Холецистокинин находится в мультимолекулярных формах. Посттрансляционный процессинг препро-холецистокинина происходит, по крайней мере, тремя различными путями в коре мозга, отсюда — несколько типов ССК нейронов в мозгу (*S. F. Rehfeld, Дания*).

А. А. Галоян представил данные о процессинге гликопептидов в гипоталамусе и их участии в регуляции метаболизма циклических нуклеотидов и катехоламинов, а также о катепсине В, генерирующем ангиотензин II в мозгу млекопитающих.

Значительное место в работе конгресса заняли доклады по нейрональным мембранам. Обсуждались роль GM-ганглиозидов в холинэргической системе (R. S. Sope, H. S. Baker, США), значение метаболизма фосфонозитида в мембранных процессах (B. Agronoff, США), механизм сопряжения между ГАМК-рецепторами и Cl^- -каналами (R. Harris и A. Allan, США).

Ряд докладов был посвящен роли фосфолипидов в биосинтезе нейротрансмиттеров, структуре и механизму вольтачувствительных ионных каналов (M. Zardunsku, Франция), Ca^{2+} -каналам нейронов позвоночных (H. Zux, E. Carbone, ФРГ), Ca^{2+} -инактивируемым мембранным каналам (D. Alkon, США) и т. д.

На симпозиальных заседаниях, коллоквиумах и особенно в стендовых сообщениях было приведено множество сообщений о нейротрансмиттерах и их рецепторах. Гликопротеиновая природа мускариновых рецепторов мозга и функциональное значение их различных «субтипов», никотиновые рецепторы в стриатуме крыс, свойства допамины D_2 -рецептора, характеристика ГАМК-рецепторов верхнего шейного симпатического ганглия, онтогенез рецепторов α -глутамил и аспартата, опиоидные рецепторы (множественные формы, принимающие участие в регуляции нейроэндокринного контроля секреции лютеинизирующего гормона и пролактина у крыс—вот далеко не полный перечень исследований по рецепторам). Ряд работ был посвящен метаболизму нейротрансмиттеров, а также аксональному транспорту в развивающемся мозгу, пластичности нейронов *in vivo* и *in vitro*, глиальным клеткам и т. д.

Были представлены также первые сообщения, касающиеся нейрохимии пересадки нервной ткани и новые данные по нейрохимии памяти, обучения и поведения.

Подытоживая приведенные данные, следует отметить, что состоявшееся в Рива-дель-Гарда собрание по нейрохимии продемонстрировало заметное развитие молекулярной нейрогенетики, использование достижений геной инженерии в раскрытии химической структуры рецепторов, ферментов и белков. Большое внимание было уделено посттрансляционным модификациям, особенно фосфорилированию белков, играющим важную роль в функциональной деятельности синапсов. Широко были представлены также механизмы процессинга различных нейропептидов. Высокий методический уровень, стремление выяснить молекулярные механизмы нейрохимических патологий (болезнь Паркинсона, старческое слабоумие, шизофрения и т. д.), глубокий анализ нейрохимических процессов—характерные черты нынешнего собрания нейрохимиков.

ГАЛОЯН А. А.



РЕФЕРАТЫ СТАТЕЙ, НАПРАВЛЕННЫХ НА ДЕПОНИРОВАНИЕ В ВИНТИ

УДК 591.488.1:612.015.1:577.15.042

АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ МЕДИАТОРНОГО И БЕЛКОВОГО МЕТАБОЛИЗМА В СТРУКТУРАХ ЦНС ПРИ ДЕЙСТВИИ АРГИНИЛВАЗОПРЕССИНА И ЦИПРОГЕПТАДИНА (количественное гистохимическое исследование)

ГЕРШТЕЙН Л. М., АБИЛОВА Г. А., СЕРГУТИНА А. В.

Количественными гистохимическими методами на крысах исследовано влияние аргинилвазопрессина (АВП), ципрогептадина (ЦПГ) и их совместное действие на активность некоторых ферментов медиаторного и белкового метаболизма в структурах головного мозга как ответственных за консолидацию памяти, так и связанных с двигательной активностью.

Установлено, что при однократном введении АВП в дозе 10^{-3} мг/кг необученным животным достоверно снижалась активность глутаматдегидрогеназы (ГДГ), аминопептидазы (АМП) хвостатого ядра и МАО гиппокампа и увеличивалась активность ГДГ слоя III больших полушарий коры. Одноразовое введение ЦПГ в дозе 1 мг/кг достоверно снижало активность АМП и повышало активность ГДГ в структурах сенсомоторной коры. Совместное введение АВП и ЦПГ приводило к существенным изменениям активности исследованных ферментов как в гиппокампе, где возрастала активность ГДГ, так и в остальных структурах. Активность МАО достоверно снижалась в вентролатеральной группе ядер зрительного бугра, тогда как в слое III коры она достоверно возрастала. Уровень активности АМП достоверно увеличивался в слое III коры и в хвостатом ядре.

Полученные данные позволяют высказать предположение, что воздействие АВП и ЦПГ на обмен веществ в ЦНС нельзя рассматривать только в связи с состоянием серотонинергической системы и, принимая во внимание физиологические данные о положительных эффектах вазопрессина на память животных, по-видимому, можно полагать, что вазопрессин обладает модулирующим влиянием на все исследуемые структуры мозга, в которых по-разному изменяются показатели

белкового и медиаторного обменов в зависимости от того, получали животные только АВП, ЦПГ или АВП совместно с ЦПГ.

10 с., ил., библиогр. 11

Институт мозга ВНИЦЗ АМН СССР,

Москва

Поступила 19.XII 1985

Рукопись депонирована в ВИНТИ 25.02.86 № 1297—В86

УДК 612.7.814:612.821.2

ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРОКОАГУЛЯЦИИ ВЕНТРАЛЬНОГО НОРАДРЕНЕРГИЧЕСКОГО ПУТИ НА РЕАКТИВНОСТЬ ДОФАМИНЕРГИЧЕСКИХ СТРУКТУР МОЗГА ПРИ ВОСПРОИЗВЕДЕНИИ ОБОРОНИТЕЛЬНЫХ УСЛОВНОРЕФЛЕКТОРНЫХ РЕАКЦИЙ.

НИКИФОРОВ А. Ф., КНЯЗЕВ Г. Г., МИХАЙЛОВ В. В.

Задачей настоящего исследования было изучение влияния электрокоагуляции вентрального норадренергического пути на активацию терминалей ядер переднего мозга при воспроизведении условной реакции с неизбежным подкреплением.

Через 15 дней после билатеральной электрокоагуляции вентрального норадренергического пути крыс-самцов линии *Wistar* обучали условной реакции с неизбежным подкреплением. На следующий день их тестировали в течение 3 мин, после чего декапитировали. За 4 ч до тестирования животным вводили блокатор синтеза катехоламинов α -метил-п-тирозин. В процессе тестирования количественно регистрировали ряд поведенческих показателей. Уровень катехоламинов в структурах мозга определяли с помощью модифицированного метода Фалька.

Электрокоагуляция вентрального норадренергического пути вызывала у необученных животных значительное снижение уровня флуоресценции норадренергических, но не дофаминергических терминалей в структурах переднего мозга. Одновременно регистрировали изменения параметров поведения животных в экспериментальной камере, свидетельствовавшее о повышении их эмоциональной реактивности. Воспроизведение оборонительной условной реакции с неизбежным подкреплением приводило у оперированных животных к достоверному снижению уровня флуоресценции дофаминергических терминалей в структурах переднего мозга по сравнению с оперированными, но не обученными крысами. Этот эффект, свидетельствующий об активации дофаминергических терминалей в процессе воспроизведения условной реакции, не выявлен при тестировании обученных неоперированных животных.

Результаты исследований, указывающие на увеличение реактив-

белкового и медиаторного обменов в зависимости от того, получали животные только АВП, ЦПГ или АВП совместно с ЦПГ.

10 с., ил., библиогр. 11

Институт мозга ВНИЦЗ АМН СССР,

Москва

Поступила 19.XII 1985

Рукопись депонирована в ВИНТИ 25.02.86 № 1297—В86

УДК 612.7.814:612.821.2

ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРОКОАГУЛЯЦИИ ВЕНТРАЛЬНОГО НОРАДРЕНЕРГИЧЕСКОГО ПУТИ НА РЕАКТИВНОСТЬ ДОФАМИНЕРГИЧЕСКИХ СТРУКТУР МОЗГА ПРИ ВОСПРОИЗВЕДЕНИИ ОБОРОНИТЕЛЬНЫХ УСЛОВНОРЕФЛЕКТОРНЫХ РЕАКЦИЙ.

НИКИФОРОВ А. Ф., КНЯЗЕВ Г. Г., МИХАЙЛОВ В. В.

Задачей настоящего исследования было изучение влияния электрокоагуляции вентрального норадренергического пути на активацию терминалей ядер переднего мозга при воспроизведении условной реакции с неизбежаемым подкреплением.

Через 15 дней после билатеральной электрокоагуляции вентрального норадренергического пути крыс-самцов линии *Wistar* обучали условной реакции с неизбежаемым подкреплением. На следующий день их тестировали в течение 3 мин, после чего декапитировали. За 4 ч до тестирования животным вводили блокатор синтеза катехоламинов α -метил-п-тирозин. В процессе тестирования количественно регистрировали ряд поведенческих показателей. Уровень катехоламинов в структурах мозга определяли с помощью модифицированного метода Фалька.

Электрокоагуляция вентрального норадренергического пути вызывала у необученных животных значительное снижение уровня флуоресценции норадренергических, но не дофаминергических терминалей в структурах переднего мозга. Одновременно регистрировали изменения параметров поведения животных в экспериментальной камере, свидетельствовавшее о повышении их эмоциональной реактивности. Воспроизведение оборонительной условной реакции с неизбежаемым подкреплением приводило у оперированных животных к достоверному снижению уровня флуоресценции дофаминергических терминалей в структурах переднего мозга по сравнению с оперированными, но не обученными крысами. Этот эффект, свидетельствующий об активации дофаминергических терминалей в процессе воспроизведения условной реакции, не выявлен при тестировании обученных неоперированных животных.

Результаты исследований, указывающие на увеличение реактив-

ности дофаминергической системы после электрокоагуляции вентрального норадренергического пути, подтверждают данные исследователей, которые считают, что у интактных животных система вентрального пути тормозит активность дофаминергических систем, что может служить одной из причин нарушения условнорефлекторного поведения.

8 с., ил., библиогр. 14

Институт физиологии СО АМН СССР.

Новосибирск

Поступила 12. XI 1985

Рукопись депонирована в ВИНТИ 25.02.86. № 1296—В86

УДК 616.127—005.8.616.831.009.8.02.577.174.5

ОБМЕН ПИРУВАТА В БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА

ДАВИДОВ В. В., СКУРЫГИН В. П., ЖЕЖА В. В., СТУПНИЦКИЙ Ю. И.,
ЯКУШЕВ В. С.

Изучали особенности обмена пирувата в мозгу при экспериментальном инфаркте миокарда, а также ишемическом некрозе миокарда, воспроизведенном после эмоционального стресса.

Показано, что развитие экспериментального инфаркта миокарда сопровождается изменением метаболизма пировиноградной кислоты в мозгу, что характеризуется уменьшением её использования в реакциях декарбоксилирования и липогенеза, увеличением утилизации в лактатдегидрогеназной реакции и переаминировании, а также, вероятно, в биосинтезе ряда аминокислот.

Возникновение указанных сдвигов в обмене пирувата может иметь важное значение в формировании нарушений энергетического обмена нейронов, обуславливать изменение их функционирования и, следовательно, лежать в основе развития расстройств ЦНС при инфаркте миокарда.

Перенесенный до воспроизведения некроза миокарда эмоциональный стресс выступает в роли фактора интенсификации путей обмена пировиноградной кислоты, что свидетельствует о реализации процессов метаболической компенсации.

11 с., ил., 2, библиогр. 13

Кафедра биохимии медицинского
института, Запорожье

Поступила 14. XI 1985

Рукопись депонирована в ВИНТИ 25.02.86. № 1298—В86

ности дофаминергической системы после электрокоагуляции вентрального норадренергического пути, подтверждают данные исследователей, которые считают, что у интактных животных система вентрального пути тормозит активность дофаминергических систем, что может служить одной из причин нарушения условнорефлекторного поведения.

8 с., ил., библиогр. 14

Институт физиологии СО АМН СССР.

Новосибирск

Поступила 12. XI 1985

Рукопись депонирована в ВИНТИ 25.02.86. № 1296—В86

УДК 616.127—005.8.616.831.009.8.02.577.174.5

ОБМЕН ПИРУВАТА В БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА

ДАВИДОВ В. В., СКУРЫГИН В. П., ЖЕЖА В. В., СТУПНИЦКИЙ Ю. И.,
ЯКУШЕВ В. С.

Изучали особенности обмена пирувата в мозгу при экспериментальном инфаркте миокарда, а также ишемическом некрозе миокарда, воспроизведенном после эмоционального стресса.

Показано, что развитие экспериментального инфаркта миокарда сопровождается изменением метаболизма пировиноградной кислоты в мозгу, что характеризуется уменьшением её использования в реакциях декарбоксилирования и липогенеза, увеличением утилизации в лактатдегидрогеназной реакции и переаминировании, а также, вероятно, в биосинтезе ряда аминокислот.

Возникновение указанных сдвигов в обмене пирувата может иметь важное значение в формировании нарушений энергетического обмена нейронов, обуславливать изменение их функционирования и, следовательно, лежать в основе развития расстройств ЦНС при инфаркте миокарда.

Перенесенный до воспроизведения некроза миокарда эмоциональный стресс выступает в роли фактора интенсификации путей обмена пировиноградной кислоты, что свидетельствует о реализации процессов метаболической компенсации.

11 с., ил., 2, библиогр. 13

Кафедра биохимии медицинского
института, Запорожье

Поступила 14. XI 1985

Рукопись депонирована в ВИНТИ 25.02.86. № 1298—В86

АКТИВНОСТЬ ГЛУТАМИНАЗЫ В ГОЛОВНОМ МОЗГУ ЗИМОСПЯЩИХ И НЕЗИМОСПЯЩИХ ЖИВОТНЫХ ПРИ САМОСОГРЕВАНИИ ПОСЛЕ ПЕРЕНЕСЕННОЙ ГИПОТЕРМИИ

ЭМИРБЕКОВ Э. З., ИСМАИЛОВ И. А.

Исследована фосфатзависимая и фосфатнезависимая активность глутаминазы в мозгу крыс и сусликов на различных этапах самосогревания (до температуры тела 30 и 37°), после перенесенной гипотермии 30 и 20°. Обнаружено, что в мозгу крыс и сусликов при самосогревании после перенесенной гипотермии как фосфатзависимая, так и фосфатнезависимая активность глутаминазы, измеренная в условиях инкубации 37, 30 и 20°, повышается. Однако при самосогревании после перенесенной искусственной гипотермии соотношение участия фосфатзависимой и фосфатнезависимой глутаминазы в регуляции содержания в мозгу глутаминовой кислоты и аммиака у незимоспящих (крыс) и зимоспящих (сусликов) животных отличается.

7 с., ил., библиогр. 8

Проблемная лаборатория нейрoхимии
Дагестанского госуниверситета
им. В. И. Ленина, Махачкала

Поступила 27. X 1985

Рукопись депонирована в ВИНТИ 25.02.86. № 1295—В86

УДК 577.15:612.391

ФЕРМЕНТЫ МЕТАБОЛИЗМА ВОССТАНОВЛЕННОГО ГЛУТАТИОНА (ФМВГ) В ГОЛОВНОМ МОЗГУ И ДРУГИХ ТКАНЯХ В НОРМЕ И ПРИ ГОЛОДАНИИ

КОЛЕСНИЧЕНКО Л. С., МАНТОРОВА Н. С.

В исследованных органах (головной мозг, печень, почки, селезенка, сердце) мышей линии (CBAxCS₇Bl)_{F₁} и крыс линии *Wistar* имеются почти все ферменты метаболизма восстановленного глутатиона (ФМВГ): глутатион-S-трансфераза (ГТ), γ -глутамилтранспептидаза (γ -ГТП), селеновая и неселеновая пероксидазы (СГПО и НСГПО), незначима только НСГПО в головном мозгу и сердце мышей. Особенности распределения активности ФМВГ сходны у обоих видов: $r_s = +0,988$. Среди ФМВГ γ -ГТП доминирует в почках, а ГТ—в печени, мозгу и сердце. При сравнении активности ферментов в органах у обоих видов активность ГТ максимальна в печени: γ -ГТП, СГПО и НСГПО—в почках.

АКТИВНОСТЬ ГЛУТАМИНАЗЫ В ГОЛОВНОМ МОЗГУ ЗИМОСПЯЩИХ И НЕЗИМОСПЯЩИХ ЖИВОТНЫХ ПРИ САМОСОГРЕВАНИИ ПОСЛЕ ПЕРЕНЕСЕННОЙ ГИПОТЕРМИИ

ЭМИРБЕКОВ Э. З., ИСМАИЛОВ И. А.

Исследована фосфатзависимая и фосфатнезависимая активность глутаминазы в мозгу крыс и сусликов на различных этапах самосогревания (до температуры тела 30 и 37°), после перенесенной гипотермии 30 и 20°. Обнаружено, что в мозгу крыс и сусликов при самосогревании после перенесенной гипотермии как фосфатзависимая, так и фосфатнезависимая активность глутаминазы, измеренная в условиях инкубации 37, 30 и 20°, повышается. Однако при самосогревании после перенесенной искусственной гипотермии соотношение участия фосфатзависимой и фосфатнезависимой глутаминазы в регуляции содержания в мозгу глутаминовой кислоты и аммиака у незимоспящих (крыс) и зимоспящих (сусликов) животных отличается.

7 с., ил., библиогр. 8

Проблемная лаборатория нейрoхимии
Дагестанского госуниверситета
им. В. И. Ленина, Махачкала

Поступила 27. X 1985

Рукопись депонирована в ВИНТИ 25.02.86. № 1295—В86

УДК 577.15:612.391

ФЕРМЕНТЫ МЕТАБОЛИЗМА ВОССТАНОВЛЕННОГО ГЛУТАТИОНА (ФМВГ) В ГОЛОВНОМ МОЗГУ И ДРУГИХ ТКАНЯХ В НОРМЕ И ПРИ ГОЛОДАНИИ

КОЛЕСНИЧЕНКО Л. С., МАНТОРОВА Н. С.

В исследованных органах (головной мозг, печень, почки, селезенка, сердце) мышей линии (CBAxCS₇Bl)F₁ и крыс линии *Wistar* имеются почти все ферменты метаболизма восстановленного глутатиона (ФМВГ): глутатион-S-трансфераза (ГТ), γ -глутамилтранспептидаза (γ -ГТП), селеновая и неселеновая пероксидазы (СГПО и НСГПО), незначима только НСГПО в головном мозгу и сердце мышей. Особенности распределения активности ФМВГ сходны у обоих видов: $r_s = +0,988$. Среди ФМВГ γ -ГТП доминирует в почках, а ГТ—в печени, мозгу и сердце. При сравнении активности ферментов в органах у обоих видов активность ГТ максимальна в печени: γ -ГТП, СГПО и НСГПО—в почках.

При голодании через 48 ч увеличивается γ -ГТП в печени, мозгу и почках; СГПО—в почках и печени; ГТ—только в печени, глутатион-редуктаза (ГР) снижена в мозгу и печени, но увеличена в почках. Через 4 суток сохраняется стимуляция γ -ГТП и ГР в печени и почках. Известно, что при голодании накапливается сАМР, что вызывает индукцию γ -ГТП и активацию ГТ и СГПО. Активация СГПО и ГТ при голодании может способствовать обезвреживанию метаболитов усиленного тканевого распада, а активация γ -ГТП—активному транспорту накапливающихся аминокислот. Меньшая выраженность изменений ФМВГ в головном мозгу по сравнению с другими органами согласуется с хорошо известным фактом большей сохранности массы мозга и его белков при голодании.

10 с., ил., библиогр. 23

Красноярский медицинский институт

Поступила 16.XI 1985

Рукопись депонирована в ВИНТИ 25.02.86. № 1294—В86

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

1. В журнале публикуются оригинальные статьи, содержащие 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 должен превышать 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. Ко всем статьям и сообщениям прилагается на отдельном листе резюме на английском языке, которое должно быть озаглавлено, в нем указываются авторы и название учреждения, в котором выполнена работа. Резюме на русском языке для экспериментальных статей и обзоров должно быть напечатано на машинке через 1,5 интервала и расположено в начале статьи, непосредственно под заголовком. Резюме для кратких сообщений следует приложить на отдельном листе.

Экспериментальные статьи, являющиеся основным публикуемым материалом в журнале, должны быть построены по следующему плану: резюме на русском языке, краткое введение с указанием цели работы, материалы и методы, результаты и обсуждение, резюме на английском языке, литература. Вверху справа от названия статьи указывается индекс универсальной десятичной классификации (УДК), под фамилиями авторов приводится полное название учреждения, в котором выполнена работа.

3. 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 указать достоверность данных.

4. Рисунки, отчетливо выполненные тушью на плотной белой бумаге или кальке, представляются в конверте в двух, а фотографии в трех экземплярах. На обороте каждого рисунка карандашом следует указать фамилии авторов, сокращенное название статьи и порядковый номер, для фотографий (на глянцевой бумаге) следует указать ее верх и низ. Подписи к рисункам и фотографиям представляются на отдельном листе. Замена фотоиллюстраций электрофоретических исследований рисованными схемами не допускается. Количество иллюстративного материала (таблицы и рисунки) не должно превышать в статьях 8, в кратких сообщениях—2.

5. Формулы и индексы должны быть вписаны четко черными чернилами или пастой, обязательно выделяя курсив (подчеркнуть волнистой линией) и различая прописные и строчные буквы, мало отличающиеся по своему написанию двумя черточками снизу или сверху, буквы греческого алфавита подчеркиваются красным карандашом.

Фамилии иностранных авторов даются в тексте на языке оригинала.

6. Название ферментов и коферментов, символы кинетики ферментов и единицы активности, написание соединений, меченных изотопами, и т. п. должны соответствовать требованиям Международного биохимического союза. Разрешаются лишь общепринятые современные сокращения слов, различных единиц измерения, физических и химических величин, терминов и т. п. В приложении к правилам для авторов, которое публикуется в каждом первом номере нашего журнала, приводится список наиболее часто употребляемых сокращенных обозначений, применяемых без специальной расшифровки.

Используемые авторами другие сокращенные слова при первом упоминании даются полностью и в скобках в сокращенном виде. —

7. Список литературы составляется в порядке цитирования, его объем—до 25 названий для статей, до 80—для обзоров и до 15—для кратких сообщений. 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. Например:

1. Силакова А. И., Труш Г. П., Являкова А. Вопросы мед. химии, т. 7, с. 538—544, 1962.

2. Георгиев Г. П.—В кн.: Цитология ферментов (под ред. А. А. Покровского). с. 32—83, М., Мир, 1971.

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

9. В случае возврата статьи для исправления датой поступления ее в редакцию считается день получения исправленного текста.

10. Редакция высылает авторам бесплатно оттиски опубликованной статьи.

11. При отсылке рукописи в редакцию рекомендуется прилагать к заказному письму или бандероли уведомление о вручении, редакция в свою очередь сообщает автору о получении статьи.

12. В случае, если статья будет отклонена редакцией, возвращается второй экземпляр рукописи и акт экспертизы.

13. Корректуру автором редакция не высылает.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Journal "Neirokhimia" will primarily publish papers that present the results of original research on biochemistry of nervous system, short communications, reviews on actual problems of neurochemistry, chronicles, reviews of new books and letters to Editor.

The Journal will accept papers from any country. Manuscripts should be type-written in English, no longer than 15 pages in toto (typed with double spacing), reviews—20 pages, short communications and chronicles—4 pages, letters to Editor—2 pages. Authors should submit 2 copies of their contribution together with tables and figures. Manuscripts should conform to the "Instructions" and should be submitted to

The Editorial Office

Journal "Neirokhimia"

P. Sevak str. 5/1, Yerevan 375044, USSR

Arrangement of the manuscript

1. The first page should bear:
 - a) the title, concise but informative
 - b) the complete names of the author(s)
 - c) the name of the lab where the work was carried out
 - d) the address to which correspondence should be sent

2. Each paper should be preceded by a Summary giving a brief account to the most relevant contributions of the paper (100—200 words, 1,5 spacing). It's important to indicate the goal, the methods, the results and conclusions.

3. Experimental papers should be divided into the following sections: Materials and Methods, Results and Discussion, Reference List. It may be often advantageous to have only 2 sections: Results and Discussion. There's no need to split short communication.

4. Bibliographic citations should be made in numerical order (not more than 25 References for articles, 80—for reviews, 15—for short communications), in square brackets and in order of their citation in the text. The form of listed references is as follows; surname and initials of authors, Journal name, volume and issue number, inclusive page numbers and year. For book titles the style is similar but contains book title—"In" followed by initials, surname of editor, the name and location of the publishing company.

5. Tables should be typed on separate pages and numbered in the order they appear in the text. They must have heading and contain only usually adopted abbreviations. Figures and graphs should be drawn separately on good quality drawing or tracing paper and put into envelope. Photographs should be glossy and as rich in contrast as possible. The back of each figure and photo should be labelled lightly in soft pencil to show the top of it, the author's name and the figure and photo number. Legends to figures and photos should be typed on separate pages.

6. The Editorial Board has got the right to shorten and improve the text not altering the main meaning.

7. Proofs are not sent to authors. For each article reprints are supplied free of charge.

Стандартные обозначения некоторых тривиальных названий химических соединений

Ala*—аланин
 AMP, ADP, АТР*—аденозин-5'-моно-, ди- и трифосфаты
 cAMP—циклический аденозинмонофосфат
 Ara*—арабиноза
 Arg—аргинин ...
 Asp—аспарагин
 Asp—аспарагиновая кислота
 Asx—аспарагиновая кислота или аспарагин
 CMP, CDP, CTP—цитидин-5'-моно-, ди- и трифосфаты
 CoA—коэнзим А
 CoASAc—ацетилкоэнзим А
 Cys—цистеин
 FAD, FADH₂—флавинадениндинуклеотид и его восстановительная форма
 FMN, FMNH₂—флавиномононуклеотид и его восстановительная форма
 Fuc—фукоза
 Fru—фруктоза
 Gal—галактоза
 Glc—глюкоза
 GlcA—глюкуроновая кислота (аналогично другим углеводным к-там)
 GlcN—глюкозамин
 GlcNAc—ацетилглюкозамин (аналогично другим дезоксисахарам и их ацетилпроизводным)
 Glp—глутамин
 Glu—глутаминовая кислота
 Glx—глутамин или глутаминовая кислота
 Gly—глицин
 GMP, GDP, GTP—гуанозин-5'-моно-, ди- и трифосфаты
 GSH, GSSG—глутатион и его окисленная форма
 His—гистидин
 Hyl—оксализин
 Hyp—оксипролин
 Ile—изолейцин
 IMP, IDP, ITP—инозин-5'-моно-, ди- и трифосфаты
 Leu—лейцин
 Lys—лизин

Man—манноза
 Met—метионин
 NAD, NADH—никотинамидадениндинуклеотид и его восстановительная форма
 NADP, NADPH—никотинамидадениндинуклеотидфосфат и его восстановительная форма
 NMN—никотинамидмононуклеотид
 Orn—орнитин
 Phe—фенилаланин
 P_i—неорганический фосфат
 PP_i—неорганический пиррофосфат
 Pro—пролин
 Q, QH₂—убихинон, убихинол
 Rib, dRib—рибоза, 2-дезоксирибоза
 Ser—серин
 Thr—треонин
 TMP, TDP, TTP—рибозилтимин-5'-моно-, ди- и трифосфаты
 Trp—триптофан
 Tyr—тирозин
 UMP, UDP, UTP—уридин-5'-моно-, ди- и трифосфаты
 Val—валин
 АКГГ—адренкортикотропный гормон
 АХ—ацетилхолин
 ГАМК—гамма-аминомасляная кислота
 ДДС-Na—додецилсульфат натрия
 ДОФА—диоксифенилаланин
 ДНК—дезоксирибонуклеиновая кислота
 ДОХ-Na—дезоксихолат натрия
 РНК—рибонуклеиновая кислота
 рРНК—рибосомная РНК
 мРНК—матричная (информационная, ядерная) РНК
 тРНК—транспортная РНК
 Glu-тРНК и т. п.—аминоацилпроизводные РНК
 ТХУ—трихлоруксусная кислота
 Трис—трис (оксиметил)—аминометан
 ЭГТА—этиленгликольтетраацетат
 ЭДТА—этилендиаминтетраацетат

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

** Соответствующие дезоксирибонуклеотиды обозначаются путем добавления латинской строчной буквы d перед трехбуквенным символом

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

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

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

СОДЕРЖАНИЕ

Брусованик В. И., Ерин А. Н., Селищева А. А., Горбунов Н. В., Тюрин В. А., Прилико Л. Л., Каган В. Е. Изменение физико-химических параметров синаптических мембран под действием фосфолипаз A_2 , C и D.	3
Сердеева М. Г., Курочкин И. Н., Склякина О. А., Зайцев С. В., Варфоломеев С. Д. Использование препаратов лиофилизированных мембран для радиорецепторного анализа опиатов и опиоидных пептидов.	11
Меленко В. И., Генгин М. Т., Рева А. Д. Выделение, очистка и физико-химические свойства аминотрипептидазы мозга кошек.	20
Жерносовых Д. Д. О гетерогенности энкефалингидролизующей мембраносвязанной аминотрипептидазы мозга человека.	29
Кричевская А. А., Горошинская И. А., Федоренко Г. М., Ходакова А. А. Активность МАО и ультраструктура головного мозга крыс при разных режимах гипероксии.	37

Краткие сообщения

Галоян А. А., Чифлякян М. Д., Мурадян М. Ш., Едигарян А. К., Абрамян С. С. Действие нейрого르몬а «С» на синтез, захват и высвобождение катехоламинов в мозгу крыс.	45
Годухин О. В. Влияние дибутирил сАМР и форсколина на высвобождение 3Н-глутамата и 3Н-дофамина из неостриатума мозга крысы.	49
Худоерков Р. М. Изменение обмена белков в отдельных структурах мозга крыс при воздействии тетрапептидамом (цитохимическое исследование).	53
Потапенко Р. И. Влияние ацетилхолина и норадреналина на активность Na^+ , K^+ -АТРазы синаптических мембран головного мозга взрослых и старых крыс.	57

Обзоры

Парфенова Е. В. Эндогенные ингибиторы ГАМК-рецепторов постсинаптических мембран.	61
Налбандян Р. М. Медьсодержащие белки мозга и их значение в этиологии шизофрении.	74

Хроника

Николай Николаевич Демин (к 75-летию со дня рождения).	85
Таранова Н. П. Симпозиум «Актуальные проблемы современной нейрохимии», посвященный 100-летию со дня рождения академика А. В. Палладина.	88
Галоян А. А. X Международное собрание по нейрохимии (Рива-дель-Гарда, Италия, 1985).	93

Рефераты статей, направленных на депонирование в ВИНТИ

Герштейн Л. М., Абилова Г. А., Сергутина А. В. Активность некоторых ферментов медиаторного и белкового метаболизма в структурах ЦНС при действии аргининвазопрессина и шпротептадина.	101
Никифоров А. Ф., Князев Г. Г., Михайлов В. В. Влияние электрокоагуляции вентрального норадренергического пути на реактивность дофаминергических структур мозга при воспроизведении оборонительных условно-рефлекторных реакций.	102

Давыдов В. В., Скурыгин В. П., Жежа В. В., Ступницкий Ю. Н., Якушев В. С.	
Обмен пирувата в больших полушариях головного мозга при экспериментальном инфаркте миокарда	103
Эмирбеков Э. З., Исмаилов И. А. Активность глутаминазы в головном мозгу зимоспящих и незимоспящих животных при самосогревании после перенесенной гипотермии	104
Колесниченко Л. С., Манторова Н. С. Ферменты метаболизма восстановленного глутатиона (ФМВГ) в головном мозгу и других тканях в норме и при голодании	104

CONTENTS

<i>Brusovanik V. Y., Erin A. N., Selisheva A. A., Gorbunov N. V., Tyurin V. A., Prilipko L. L., Kagan V. E.</i> Effect of phospholipases A ₂ , C and D on the physico-chemical characteristics of synaptic membranes.	3
<i>Sergeeva M. G., Kurochkin I. N., Sklyankina O. A., Zaitsev S. V., Varfolomeev S. D.</i> Lyophilized membranes: use for radioreceptor assay of opiates and opioid peptides.	
<i>Meleshko V. I., Gengin M. T., Reva A. D.</i> Purification and physico-chemical properties of aminotripeptidase from cat brain.	20
<i>Zhernosekov D. D.</i> On heterogeneity of human brain enkephalin-hydrolyzing membrane bound aminopeptidase.	29
<i>Krichevskaya A. A., Goroshinskaya I. A., Fedorenko G. M., Khodakova A. A.</i> Monoamine oxidase activity and brain ultrastructure in rats under different oxygen expositions.	37

Short communications

<i>Galoyan A. A., Chiftlikian M. D., Muradian M. Sh., Edigarian A. K., Abrahamian S. S.</i> Action of neurohormone „C“ on the synthesis, uptake and release of catecholamines in rat brain.	45
<i>Godukhin O. V.</i> Effect of dibutyl-cAMP and forskoline on the release of ³ H-Glutamate and ³ H-dopamine from rat neostriatum.	49
<i>Khudoerkov R. M.</i> Effect of tetrapeptide amide on protein turnover in rat brain different structures.	53
<i>Potapenko R. P.</i> Effect of acetylcholine (ACh) and noradrenaline (NA) on the activity of brain synaptic membrane Na ⁺ , K ⁺ -ATPase in grown up and senile rats.	57

Reviews

<i>Parfenova E. V.</i> Endogenous inhibitors of post-synaptic GABA receptors in mammalian brain.	61
<i>Naibandian R. M.</i> Copper-containing proteins of brain and their significance in etiology of schizophrenia.	74

Chronicles

<i>Doemin N. N.</i> (On his 75th Birthday)	85
<i>Taranova N. A.</i> All-Union symposium dedicated to the 100th anniversary of academician Palladin A. V. "Actual aspects of modern neurochemistry" (Kiev, September 1985)	88
<i>Galoyan A. A.</i> X-th International Meeting for Neurochemistry (Riva-del-Garda, Italy, May 1985)	93

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

<i>Gershteln L. M., Abilova G. A., Sergutina A. V.</i> Effect of Arg-vasopressin and Cyproheptadine on the activity of some enzymes of transmitter and protein turnover in CNS structures	101
---	-----

<i>Nikiforov A. F., Knyzev G. G., Mikhailov V. V.</i> Effect of ventral noradrenergic pathway electrocoagulation on the reactivity of DOPA-ergic brain structures under reproduction of defensive conditioned responses	102
<i>Davydov V. V., Skurygin V. P., Zhezha V. V., Stupnitskyi Ju. J., Yakushev V. S.</i> Turnover of pyruvate in brain big hemispheres in experimental myocardial infarction.	103
<i>Emirbekov E. Z., Ismailov Y. A.</i> Activity of brain glutaminase in hibernating and non-hibernating animals after hypothermia.	104
<i>Kolesnichenko L. S., Mantorova N. S.</i> Enzymes involved in metabolism of reduced glutathione in brain and other tissues in normal conditions and during famine.	104

Ст. редактор ХАЧАТУРОВА Э. А.

Лит. сотрудник ГРИГОРЯН Г. Р.

Техн. редактор АЗИЗБЕКЯН Л. А.

Сдано в набор 29.12. 1985 г. Подписано к печати 19.03. 1986 г. ВФ 04034
Бумага № 1, 70×108¹/₁₆. Высокая печать. Печ. лист. 7,0+2 вкл. Усл. печ. лист. 9,98.

Учет. изд. 8,22. Тираж. 615. Заказ 1397. Издат. 66707.

Адрес редакции: 375014, 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.