

том 5, № 2, 1986

ՀԱՅԿԱՆ ԲԱՆԴԱԿԱՆ ԳԱՐԿԱՆՈՒԹՅԱՆ ԳՐԱԴԱՐԱՆ

ISSN 0203-493X

# НЕЙРОХИМИЯ

## ՆԵՅՂՈՔԻՄԻԱ



АКАДЕМИЯ НАУК СССР  
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

АКАДЕМИЯ НАУК СССР  
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

# НЕЙРОХИМИЯ ՆԵՅՐՈՔԻՄԻԱ

ТОМ 5, ВЫП. 2  
Апрель—июнь

Журнал основан в 1982 году  
Выходит 4 раза в год

ИЗДАТЕЛЬСТВО АН АРМЯНСКОЙ ССР  
ЕРЕВАН 1986

Ст. редактор Э. А. ХАЧАТУРОВА  
Лит. сотрудник Г. Р. ГРИГОРЯН  
Техн. редактор Л. А. АЗИЗБЕКЯН

Сдано в набор 28.03.1986 г. Подписано к печати 9.06.1986 г. ВФ 04072.  
Бумага № 1, 70×108<sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Высокая печать. Печ. лист. 7,25. Усл.-печ. лист. 8,75.  
Учет.-изд. 8.08. Тираж 620. Заказ 338. Издат. 6773.

Адрес редакции: 375044, Ереван-44, ул. П. Севака 5/1, т. 28-17-70, 28-16-52.

Издательство АН АрмССР. Ереван, 375019, пр. Маршала Баграмяна, 24 г.

Типография Издательства Академии наук АрмССР. Ереван-19,

пр. Маршала Баграмяна, 24

**Редакционная коллегия**

**А. А. ГАЛОЯН**—главный редактор

Г. В. АПРИКЯН, А. В. АРУТЮНЯН (зам. главного редактора),  
Л. С. АРУТЮНЯН (отв. секретарь), Я. В. БЕЛНК, Н. Н. ДЕМИН (зам.  
главного редактора), Қ. Г. КАРАГЕЗЯН, П. Г. КОСТЮК, А. А. КРИ-  
ЧЕВСКАЯ, Р. М. НАЛБАНДЯН, М. Ш. ПРОМЫСЛОВ, В. Н. РОЗЕН-  
ГАРТ, Л. Я. ТЯХЕНЫЛД, Г. С. ХАЧАТРЯН

**Редакционный совет**

Н. Г. АЛЕКСИДЗЕ, С. В. ГАСТЕВА, Р. Н. ГЛЕБОВ, Б. А. КАЗАРЯН,  
Р. И. КРУГЛИКОВ, В. Қ. ЛИШКО, В. Г. МХИТАРЯН, В. С. ОГАНЕСЯН,  
М. И. ПРОХОРОВА, А. Д. РЕВА, Д. А. САХАРОВ, А. А. СИМОНЯН,  
Т. М. ТУРПЛЕВ, А. М. УТЕВСКИИ, Е. М. ХВАТОВА, Л. С. ЧЕРКАСОВА,  
Р. Н. ЭТИНГОФ



УДК 612.822.1+612.815.1

ВЛИЯНИЕ  $\text{Na}^+$  И  $\text{Ca}^{2+}$  НА РЕЦЕПТОРНОЕ СВЯЗЫВАНИЕ  
 $^3\text{H}$ -L-ГЛУТАМАТА С МЕМБРАНАМИ НЕРВНЫХ КЛЕТОК

ГОРОДИНСКИЙ А. И., ДАМБИНОВА С. А.

Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины  
АМН СССР, Ленинград

Исследовали специфическое связывание  $^3\text{H}$ -L-глутамата с разными типами мембран (свежевыделенными и предварительно замороженными синаптическими мембранами, митохондриальными и плазматическими мембранами гибридных клеток нейробластомы N 18) и его зависимость от  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$  в физиологических концентрациях. Показано, что  $\text{Na}^+$  подавляет связывание  $^3\text{H}$ -L-глутамата с предварительно замороженными синаптическими мембранами, увеличивая почти на порядок величину  $K_d$  комплекса рецептор-глутамат, но не влияет на связывание с митохондриальными мембранами. Предполагается, что повышение уровня специфического связывания после замораживания-оттаивания синаптических мембран эквивалентно активации связывания  $^3\text{H}$ -L-глутамата со свежевыделенными мембранами в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$  и обусловливается отделением регуляторной субъединицы пептидной природы, блокирующей узнающие участки рецептора. Обсуждается роль  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$  в эндогенной регуляции функции глутаматных рецепторов ЦНС.

В регуляции функционирования глутаматергических синапсов ЦНС немаловажную роль играют факторы, непосредственно влияющие на связывание глутамата с синаптическими рецепторами. К таким факторам в первую очередь следует отнести компоненты непосредственного ионного окружения рецептора— $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Cl}^-$ .

Рецепторное связывание L-глутамата *in vitro* изучается, как правило, с помощью радиолигандного метода на выделяемых из нервной ткани препаратах синаптических мембран. Несмотря на то, что эти исследования ведутся уже около 10 лет [1], влияние основного катиона ионного окружения рецептора— $\text{Na}^+$  (присутствующего во внеклеточной среде в концентрации 100—150 мМ) на связывание L-глутамата с рецептором до сих пор детально не изучено. Это объясняется тем, что при создании в среде инкубации физиологических концентраций  $\text{Na}^+$  происходит активация системы активного транспорта глутамата на синаптических мембранах и, соответственно, ассоциированных с ними так называемых  $\text{Na}^+$ -зависимых участков связывания [2]. На фоне подобных  $\text{Na}^+$ -активируемых транспорт-

ных участков практически не проявляются рецепторные (по принятой терминологии « $\text{Na}^+$ -независимые») участки связывания нейромедиатора, что создает серьезные методологические трудности для исследования влияния на них ионов  $\text{Na}^+$  в физиологических концентрациях.

Не менее важная роль в эндогенной регуляции функции глутаматных рецепторов ЦНС принадлежит ионам кальция, которые содержатся во внеклеточной среде в концентрации 2,5—5,0 мМ, но практически не встречаются в свободном состоянии внутри нервных клеток [3]. Ранее было показано, что  $\text{Ca}^{2+}$  в указанных концентрациях повышает специфическое связывание  $^3\text{H-L}$ -глутамата с синаптическими мембранами, выделенными из головного мозга крыс [4—6]. Однако вопрос о природе стимулирующего действия  $\text{Ca}^{2+}$  на рецепторное связывание  $^3\text{H-L}$ -глутамата в настоящее время остается невыясненным.

Согласно гипотезе Baudry, Lynch [7], активация рецепторного связывания происходит за счет действия  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых протеаз. Протеолитической активацией глутаматных рецепторов авторы объясняют явление длительной потенциации синаптического ответа, возникающей при повторяющейся электрической стимуляции срезов мозга [8].

Иной точки зрения придерживаются Fagg и соавт. [9, 10], которые предполагают существование различных популяций  $\text{Cl}^-/\text{Ca}^{2+}$ -зависимых и  $\text{Cl}^-/\text{Ca}^{2+}$ -независимых участков связывания, различающихся по локализации и фармакологическим характеристикам. Отметим, что сам по себе факт существования  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых и  $\text{Ca}^{2+}$ -независимых участков связывания еще не устанавливает природу стимулирующего действия  $\text{Ca}^{2+}$ , оставляя этот вопрос открытым.

Следует подчеркнуть, что понимание ионных механизмов активации функции глутаматных рецепторов ЦНС представляет существенный интерес не только для изучения регуляции эффективности синаптической передачи, но и имеет важное практическое значение в плане разработки адекватной модели для скрининга фармакологических препаратов, предназначенных для высокоизбирательного взаимодействия с глутаматергическими синапсами головного мозга.

Целью настоящей работы явилось сравнительное исследование характера влияния  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$  на специфическое связывание  $^3\text{H-L}$ -глутамата с синаптическими и митохондриальными мембранами, выделенными из коры головного мозга крыс, а также с плазматическими мембранами гибридных клеток нейробластомы N18.

### Материалы и методы

В опытах использовали синаптические и митохондриальные мембраны, выделенные из коры головного мозга крыс, как это было описано ранее [6]. Непосредственно после выделения мембранные фракции замораживали и хранили в жидком азоте в течение 1—3 недель.

Содержание белка в мембранных фракциях определяли методом Bradford [11], предварительно растворяя образцы в 2н. NaOH.

Связывание  $^3\text{H}$ -L-глутамата с мембранными фракциями определяли, инкубируя 0,1 мг препарата мембран в 0,25 мл среды, содержавшей 0,08 мкМ  $^3\text{H}$ -L-глутамата (21 Ки/ммоль, «Изотоп», СССР) и 30 мМ трис-HCl, pH 7,2. После 10 мин пренинкубации мембран при 37° (в присутствии неорганических катионов или без них) реакцию запускали добавлением  $^3\text{H}$ -L-глутамата. Через 15 мин инкубационную смесь фильтровали под вакуумом через целлюлозные микропористые фильтры Супрог (ЧССР) с диаметром пор 0,45 мкм. Фильтры промывали 10-кратным объемом ледяного буфера, сушили и растворяли в стандартной сцинтилляционной смеси, содержавшей метилцеллозоль. Значения специфического связывания получали путем вычитания из величин общей радиоактивности значений, полученных при наличии в инкубационной смеси избытка немеченого глутамата (0,1 мМ). Радиоактивность измеряли на счетчике «Rack-Beta» LKB (Швеция).

Клеточные культуры нейробластомы N 18 представляют собой линию нейробластомы C 1300 [12]. Клональные гибридные клетки, отмеченные как 78—45×8, являются соматическими гибридами, полученными при слиянии исходных клеток нейробластомы N 18 и фибробластов китайского хомячка. Клеточные линии были получены и любезно предоставлены нам Т. Н. Игнатовой (ЦИН АН СССР, Ленинград).

Клетки культивировали в стеклянных флаконах Карреля в среде Игла, содержащей 3% глутамина и 10% сыворотки крупного рогатого скота. Среду меняли через 1—3 дня. Время удвоения клеток составляло 18—24 ч. Исследования проводили на мембранах клеток, находившихся в логарифмической фазе роста. Выделение грубой фракции плазматических мембран проводили по методу Prasad и соавт. [13].

Кинетику диссоциации комплекса рецептор-глутамат исследовали, добавляя избыток немеченого глутамата после 20 мин инкубации мембран с радиоактивной меткой. Для увеличения времени диссоциации рецепторного комплекса эту серию экспериментов проводили при пониженной температуре (10—12°). Анализ данных проводили по методу Scatchard [14], статистическую обработку результатов—методом непараметрического анализа [15].

### Результаты исследования

*Влияние  $\text{Na}^+$  на связывание  $^3\text{H}$ -L-глутамата с синаптическими и митохондриальными мембранами.* Как было показано в предыдущей работе [6], создание в инкубационной среде физиологических концентраций  $\text{Na}^+$  приводит к повышению специфического связывания  $^3\text{H}$ -L-глутамата за счет активации транспортных участков связывания с  $K_d$  около 2 мкМ и  $V_{\max}$  40—45 пмоль/мг белка. Как уже отмечалось выше, эти участки связывания ассоциированы с системой активного транспорта медиатора. Исходя из этого, мы исследовали влияние  $\text{Na}^+$  на специфическое связывание  $^3\text{H}$ -L-глутамата с синаптическими мембранами, подвергнутыми процедуре замораживания-оттаивания, инактивирующей систему активного транспорта [16].

Как видно из рис. 1, ионы натрия полностью блокировали связывание  $^3\text{H}$ -L-глутамата с предварительно замороженными мембранами. Ингибирующее действие  $\text{Na}^+$  на специфическое связывание  $^3\text{H}$ -L-глутамата было характерным для синаптических мембран и не проявлялось на мембранах митохондриальной фракции.

Для выяснения природы ингибирующего действия  $\text{Na}^+$  было определено его влияние на процесс диссоциации связанного с мембрана-

ми глутамата. Диссоциацию связанного  $^3\text{H}$ -L-глутамата изучали, добавляя в инкубационную смесь избыток немеченого глутамата после достижения равновесия между прямой и обратной реакциями образования комплекса рецептор-нейромедиатор. Одновременное добавление  $\text{Na}^+$  (в конечной концентрации 150 мМ) приводило к значительному увеличению скорости диссоциации (рис. 2). Величины  $K_d$ , определенные в присутствии или отсутствии  $\text{Na}^+$ , составляли соответственно 0,51 и 0,064 мин $^{-1}$ .

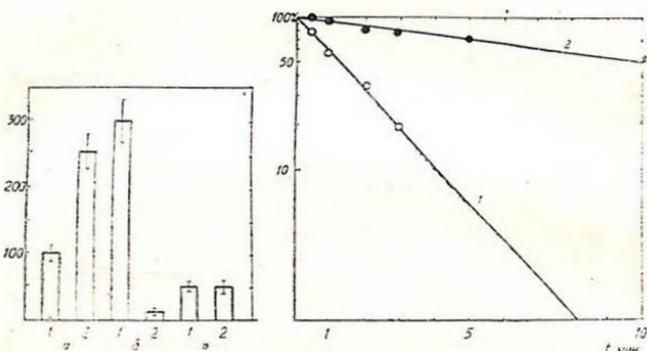


Рис. 1. Влияние  $\text{Na}^+$  на специфическое связывание  $^3\text{H}$ -L-глутамата (по оси ординат, в % от контроля) в отсутствие (1) и в присутствии (2) 150 мМ  $\text{Na}^+$ : а—свежевыделенные синаптические мембраны, б—предварительно замороженные синаптические мембраны, в—мембраны митохондриальной фракции

Рис. 2. Диссоциация комплекса  $^3\text{H}$ -L-глутамат-рецептор в присутствии (1) и в отсутствие (2) 150 мМ  $\text{Na}^+$ . По оси абсцисс—время (мин); по оси ординат—специфическое связывание  $^3\text{H}$ -L-глутамата (%)

Результаты экспериментов по исследованию диссоциации комплекса рецептор-нейромедиатор позволяют предположить, что подавление наблюдаемого специфического связывания  $^3\text{H}$ -L-глутамата ионами натрия происходит за счет ускорения процесса отделения медиатора от рецептора, что выражается в увеличении почти на порядок наблюдаемого значения  $K_d$ . Следует отметить, что эффект ингибирования связывания  $\text{Na}^+$  не специфичен для предварительно замороженных мембран, но проявлялся и на свежевыделенных препаратах, что следует из линейности графика Скэтчарда для  $\text{Na}^+$ -зависимого связывания [2, 6].

*Влияние  $\text{Ca}^{2+}$  на связывание  $^3\text{H}$ -L-глутамата с синаптическими и митохондриальными мембранами.* В соответствии с результатами нашей предыдущей работы [6],  $\text{Ca}^{2+}$  в концентрации 5 мМ повышал связывание  $^3\text{H}$ -L-глутамата со свежевыделенными синаптическими мембранами в 2,5—3 раза. Этот эффект был обусловлен увеличением значения  $V_{\text{max}}$  при неизменном значении  $K_d$  около 180 пМ (рис. 3).

После замораживания-оттаивания синаптических мембран стимулирующее действие  $\text{Ca}^{2+}$  пропадало (рис. 4), однако общий уровень специфического связывания при этом повышался приблизительно до значений, регистрируемых в экспериментах со свежесыведенными мембранами в присутствии 5 мМ  $\text{Ca}^{2+}$ .

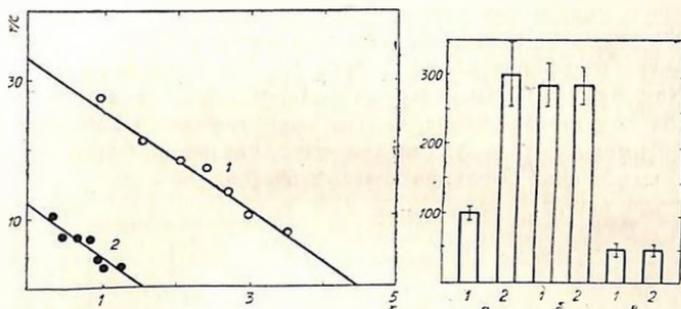


Рис. 3. График Скэтчарда для насыщения  $^3\text{H}$ -L-глутаматом участков связывания на свежесыведенных синаптических мембранах в присутствии (1) и в отсутствие (2) 5 мМ  $\text{Ca}^{2+}$ . По оси абсцисс—концентрация связанного  $^3\text{H}$ -L-глутамата (r, пмоль/мг белка), по оси ординат—отношение связанного  $^3\text{H}$ -L-глутамата к свободному (r/c, фмоль/нМ мг белка)

Рис. 4. Влияние  $\text{Ca}^{2+}$  на специфическое связывание  $^3\text{H}$ -L-глутамата. Обозначения те же, что и на рис. 1

Связывание  $^3\text{H}$ -L-глутамата с мембранами митохондриальной фракции характеризовалось значениями  $K_d$  около 180 нМ и  $V_{\text{max}}$  1.2 пмоль/мг белка (рис. 4). В этом случае  $\text{Ca}^{2+}$  так же как и  $\text{Na}^+$  не оказывал влияния на специфическое связывание.

Стимулирующее действие  $\text{Ca}^{2+}$  на связывание  $^3\text{H}$ -L-глутамата со свежесыведенными синаптическими мембранами согласуется с имеющимися литературными данными [4, 5]. Fagg и соавт. [17] при замораживании синаптических мембран наблюдали снижение уровня связывания  $^3\text{H}$ -L-глутамата и исчезновение зависимости связывания от  $\text{Ca}^{2+}$ , что позволило им сделать вывод об удалении  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой популяции участков связывания. В отличие от упомянутой работы, по нашим данным, процедура замораживания-оттаивания стимулирует специфическое связывание. Этот факт может свидетельствовать об эквивалентности активирующего действия замораживания-оттаивания и  $\text{Ca}^{2+}$  на свежесыведенные синаптические мембраны.

Связывание  $^3\text{H}$ -L-глутамата с плазматическими мембранами гибридных клеток нейробластомы N 18. В последние годы клетки нейробластомы широко используются в нейробиологии в качестве модельных систем для изучения функции нервных клеток [18]. Метод соматической гибридизации клеток позволяет усилить нейрональные признаки по сравнению с родительскими клонами и повысить степень дифференцировки клеток в культуре [19].

С помощью радиолигандного метода в работе Prasad и соавт. [13] было показано, что плазматические мембраны холинэргических и норадренэргических клонов нейробластомы обогащены  $\text{Na}^+$ -независимыми участками связывания  $^3\text{H}$ -L-глутамата. В настоящей работе на плазматических мембранах гибридных клеток нейтрального клона нейробластомы мы обнаружили участки связывания  $^3\text{H}$ -L-глутамата, обладающие такими же свойствами, как и на синаптических мембранах, выделенных из мозга,—сродством к лиганду ( $K_d$  около 180 нМ), активацией связывания в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$  и подавлением в присутствии  $\text{Na}^+$  (рис. 5). Концентрация обнаруженных участков связывания была существенно выше, чем на синаптических мембранах ( $V_{\max}$  около 40 пмоль/мг белка), что, очевидно, связано с большей гомогенностью выделенной фракции плазматических мембран.

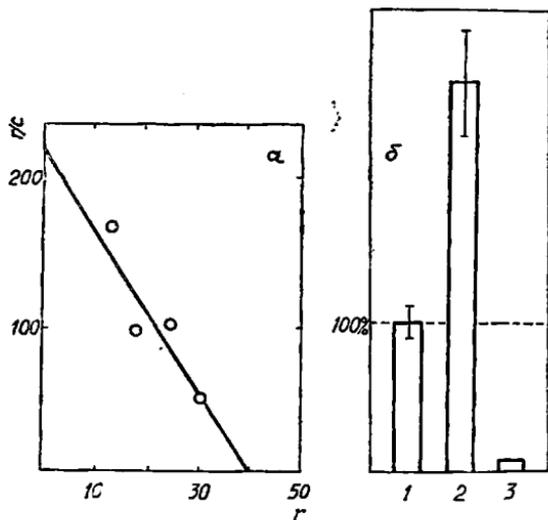


Рис. 5. Специфическое связывание  $^3\text{H}$ -L-глутамата с мембранами гибридных клеток нейробластомы 78—45×8. а—график Скэтчарда для насыщения участков связывания (обозначения по осям абсцисс и ординат те же, что и на рис. 3); б—влияние на специфическое связывание (по оси ординат, в % от контроля)  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$ . 1—в отсутствие неорганических катионов, 2—5 мМ  $\text{Ca}^{2+}$ , 3—150 мМ  $\text{Na}^+$

Наблюдаемое на свежевыделенных плазматических мембранах клеток нейробластомы подавление связывания  $^3\text{H}$ -L-глутамата  $\text{Na}^+$  свидетельствует об отсутствии  $\text{Na}^+$ -зависимых участков связывания на мембранах гибридных клеток.

В таблице суммированы данные по связыванию  $^3\text{H}$ -L-глутамата с мембранами различных типов. Сходство характеристик связывания с плазматическими мембранами нейробластомы и  $\text{Na}^+$ -независимого

связывания с синаптическими мембранами свидетельствует о возможном наличии глутаматных рецепторов на клетках нейробластомы. Вместе с тем, с одной стороны, видны значительные различия между характеристиками рецепторного связывания, с другой—связывания с мембранами митохондриальной фракции. Подчеркнем, что совпадение значений  $K_d$  для этих двух типов участков связывания обуславливает невозможность их селективного изучения при одновременном наличии в инкубационной смеси и свидетельствует о необходимости тщательной очистки синаптических мембран от возможных примесей митохондрий [6].

Таблица

Характеристики специфического связывания  $^3\text{H-L}$ -глутамата с различными мембранными фракциями

Вид мембран	$K_d$ , нМ	$V_{\text{max}}$ , пмоль/мг	Влияние $\text{Ca}^{2+}$	Влияние $\text{Na}^+$
Синаптические мембраны из коры головного мозга крыс, $\text{Na}^+$ -независимое связывание	180	4,5	активирует	подавляет
Плазматические мембраны клеток нейробластомы 78—45×8	180	40,0	активирует	подавляет
Синаптические мембраны из коры головного мозга крыс, $\text{Na}^+$ -зависимое связывание	2000	50,0	не влияет	активирует
Мембраны митохондриальной фракции	170	1,4	не влияет	не влияет

Наличие примесей митохондриальных мембран в исследуемых фракциях может привести к ошибочным заключениям. В частности, на синаптических мембранах обнаруживают  $\text{Cl}^-/\text{Ca}^{2+}$ -независимые участки связывания [9, 10]. По нашим данным, эти участки связывания локализованы предположительно на мембранах митохондрий.

### Обсуждение результатов

Полученные нами данные об активирующем действии  $\text{Ca}^{2+}$  на наблюдаемое связывание  $^3\text{H-L}$ -глутамата и его подавлении в присутствии  $\text{Na}^+$  свидетельствуют о том, что эти свойства характерны, по-видимому, для функционирования глутаматных рецепторов ЦНС. Обнаруженный эффект ускорения диссоциации рецепторного комплекса в условиях физиологических концентраций  $\text{Na}^+$  может иметь важное значение для эндогенной регуляции функции глутаматных рецепторов, расширяя роль  $\text{Na}^+$  в обеспечении эффективного удаления медиатора из синаптической щели. Можно полагать, что  $\text{Na}^+$  одновременно активирует отделение медиатора от рецептора и его последующее поглощение глнальными клетками.

Предположение о преимущественной локализации систем активного транспорта глутамата на мембране глнальных клеток высказыва-

валось в связи со сформировавшимися в последние годы представлениями о главенствующей роли глиальных элементов в метаболическом обеспечении функции глутаматергических синапсов. В качестве косвенного подтверждения этого предположения можно рассматривать результаты экспериментов по определению характеристик связывания  $^3\text{H-L}$ -глутамата с плазматическими мембранами гибридных клеток нейробластомы, представляющих собой однородную культуру нейрональных клеток. Неудачные попытки обнаружить на этих клетках  $\text{Na}^+$ -зависимые участки связывания могут свидетельствовать о возможном отсутствии систем активного транспорта или поглощения на мембранах нейронов. Это подтверждается предварительными результатами проведенных нами экспериментов по определению связывания  $^3\text{H-L}$ -глутамата с выделенными из мозга крысы очищенными мембранами изолированных нейронов и глиальных клеток.  $\text{Na}^+$ -зависимые участки связывания были обнаружены нами лишь на препаратах глиальных элементов.

Рассматривая возможные механизмы стимулирующего действия  $\text{Ca}^{2+}$  на связывание  $^3\text{H-L}$ -глутамата с синаптическими мембранами, нельзя не обратить внимания на идентичность влияния  $\text{Ca}^{2+}$  и процедуры замораживания-оттаивания мембран. Речь, по-видимому, может идти о  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимом отделении гипотетической регуляторной субъединицы, блокирующей узнающие участки для нейромедиатора. Вполне вероятно, что на роль подобной регуляторной субъединицы могут претендовать малые пептиды, обладающие высоким сродством к узнающим участкам [20]. Очевидно, что процедура замораживания-оттаивания приводит к необратимому отделению эндогенных факторов пептидной природы, как это описывалось для других типов клеточных рецепторов [21]. Наличие эндогенного ингибитора пептидной природы, связанного с  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимыми активирующими процессами, конкретизирует механизм регуляторного влияния  $\text{Ca}^{2+}$  на функционирование глутаматных рецепторов и не противоречит гипотезе Fagg и соавт. [10] о существовании  $\text{Cl}^-/\text{Ca}^{2+}$ -зависимых участков связывания. Следует подчеркнуть, что активация специфического связывания при замораживании-оттаивании мембран не может быть обусловлена протеолизом белковой молекулы рецептора, как это предполагают Baudry, Lynch [7], с помощью  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых протеаз.

Таким образом, можно заключить, что обнаруженные нами эффекты действия  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$  на специфическое связывание  $^3\text{H-L}$ -глутамата с синаптическими мембранами коры головного мозга крысы и плазматическими мембранами клеток нейробластомы характерны для истинного рецепторного связывания и могут быть использованы в дальнейшем как маркерные признаки для его идентификации в разнообразных модельных системах. В частности, эти результаты предполагаются использовать для разработки тестирующих *in vitro* систем для скрининга фармакологических препаратов, предназначенных для избирательного воздействия на глутаматергические пути ЦНС.

# EFFECT OF Na<sup>+</sup> AND Ca<sup>2+</sup> IONS ON <sup>3</sup>H-L-GLUTAMATE BINDING TO NEURONAL MEMBRANES

CORODINSKY A. I., DAMBINOVA S. A.

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

Binding of <sup>3</sup>H-L-glutamate to various membrane samples (fresh-prepared and freeze-thawed synaptic membranes, mitochondrial membranes, and hybride neuroblastoma № 18 cells plasma membranes) and its dependence from the physiological concentrations of Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> was investigated. It was shown that Na<sup>+</sup> inhibited apparent binding of <sup>3</sup>H-L-glutamate to freeze-thawed synaptic membranes increasing about 10-fold dissociation constant of glutamate-receptor complex but does not influence the binding to mitochondrial membranes. The increase of specific binding after freeze-thawing of synaptic membranes is suggested to be due to Ca<sup>2+</sup>-dependent activation of binding of <sup>3</sup>H-L-glutamate to freshprepared membranes and is caused by dissociation of the regulatory subunit that blocks the recognizing sites of receptor. Regulatory role of Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> in glutamate receptor function is discussed.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Foster A. G., Fagg G. E. Brain Res. Rev., v. 7, p. 103-164, 1984.
2. Baudry M., Lynch G. J. Neurochem., v. 36, p. 811-820, 1981.
3. Rosenberger L., Triggle D. J.—In: Calcium in drug action (ed. G. B. Weiss), p. 3-32, N. Y.—London, 1978.
4. Baudry M., Siman R., Smith E. K., Lynch G. Eur. J. Pharmacol., v. 90, p. 161-168, 1983.
5. Menna E. E., Fagg G. E., Monaghan D. T., Cotman C. W. Soc. Neurosci. Abstr., v. 8, p. 878, 1982.
6. Дамбинова С. А., Городинский А. И. Биохимия, т. 49, с. 67-74, 1984.
7. Baudry M., Lynch G. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 77, p. 2298-2302, 1980.
8. Baudry M., Lynch G. Exp. Neurol., v. 68, p. 202-204, 1980.
9. Fagg G. E., Foster A. G., Menna E. E., Cotman C. W. J. Neurosci., v. 2, p. 958-965, 1982.
10. Fagg G. E., Menna E. E., Cotman C. W.—In: CNS Receptors. From Molecular Pharmacol. to Behav., Adv. Biochem. Psychopharmacol., (eds. P. Mandel, F. V. De Feudis), v. 37, p. 199-209, 1983.
11. Bradford M. M. Analyt. Biochem., v. 72, p. 248-256, 1976.
12. Nelson P. G.—In: Tissue Culture of the Nervous System (ed. S. Gordon), 1973.
13. Prasad K. N., Nayak M., Edwards-Prasad J. E., Cummings S., Pattisapu K. Life Sci., v. 27, p. 2251-2259, 1980.
14. Scatchard G. Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 51, p. 660-672, 1949.
15. Ашмарин Н. П., Васильев Н. Н., Амбросов В. А. Быстрые методы статистической обработки и планирование эксперимента, Л., ЛГУ, 1975.
16. Evans W. H. Preparation and characterization of mammalian plasma membranes. Amsterdam, 1978.

17. Fagg G. E., Mena E. E., Monaghan D. T., Cotman C. W. *Neurosci. Lett.*, v. 33 p. 157—162. 1983.
18. De Laat S. W., Van der Saag P. T. *Intern. Rev. of Cytol.*, v. 74, p. 1—53, 1982.
19. Ринцерц Н., Сэвидж Р. Р. Гибридные клетки, М., Мир, 1979.
20. Дамбинова С. А., Беседин В. И., Городинский А. Н., Маргулис М. Н., Павлова О. Н. *Физиол. журн. СССР*, т. 70, с. 952—960. 1984.
21. Massotti M., Mazzari S., Schmid R., Guidotti A., Costa E. *Neurochem. Res.* v. 6, p. 551—565. 1981.

Поступила 21. XII 1985



## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ L-ДОФА С ВНУТРИКЛЕТОЧНЫМИ СТРУКТУРАМИ МОЗГА И ПЕЧЕНИ КРЫС

ТРЕТЬЯК Т. М., АРХИПОВА Л. В.

Институт биологической физики АН СССР, Пушкино

Обнаружено, что 3Н-ДОФА при внутрибрюшинном введении может проникать в клетки мозга и печени и взаимодействовать с белками хроматина. Предварительное насыщение организма перидоактивным ДОФА заметно снижает возможность взаимодействия хроматина с 3Н-ДОФА. Галоперидол, введенный крысам за 30 мин до инъекции 3Н-ДОФА, вызвал резкое понижение способности 3Н-ДОФА взаимодействовать с ядерными структурами клеток мозга. Присутствие экзогенного ДОФА в организме крысы повышает его способность акцептировать 3Н-лейцин субклеточными структурами.

Использование L-ДОФА в качестве лечебного средства при недостаточности катехоламинной системы головного мозга осуществляется на фоне неясной картины его вмешательства в клеточный метаболизм. В настоящей работе исследовали возможность взаимодействия экзогенного ДОФА с клеточными элементами мозга и печени крыс. Установлено, что 3Н-ДОФА, введенный внутрибрюшинно, прочно соединяется с белками хроматина, причем более интенсивное взаимодействие имеет место в ткани мозга.

### Материалы и методы

Опыты проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 200 г под эфирной анестезией. После перфузии охлажденным физиологическим раствором готовили гомогенат мозга в 1,9 М сахарозе. Для выделения клеточных ядер гомогенат разбавляли дистиллированной водой до концентрации сахарозы 0,32 М и трижды центрифугировали при 800 г. 15 мин (первое центрифугирование проводили с добавлением тритона X-100). Полученный осадок неочищенных ядер ресуспендировали в 1,6 М сахарозе, центрифугировали 20 мин при 3000 г, надосадочную жидкость отбрасывали, а осадок очищенных ядер отмывали 0,32 М раствором сахарозы.

Перфузированную печень (10 г) измельчали в 100 мл раствора следующего состава: 0,25 М сахарозы, 0,01 М  $MgCl_2$ , 0,02 М трис-HCl, pH 7,8 и гомогенизировали. Выделение ядер клеток проводили по методу Goldfine, Smith [1], их качество контролировали фазово-контрастной микроскопией и определяли содержание белка, РНК и ДНК [2, 3].

Хроматин выделяли по методу Huang C. C., Huang P. C. [4]. Негистоновые белки хроматина получали суспендированием свежесодержанного хроматина в ра-

створе, содержащем 2 М NaCl, 0,0007 М  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  и 0,0007 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,0 и перемешивали на холоду 18 ч, затем добавляли 4 объема 0,015 М боратного буфера, pH 9,0 и перемешивали еще 2 ч. После центрифугирования при 1000 г в течение 15 мин в супернатанте содержались негистоновые белки, а в осадке—комплекс ДНК и гистонов. Супернатант концентрировали высушиванием на холоду.

Гель-фильтрацию негистоновых белков проводили, используя рекомендации Burdman, Hagleid [5]. На колонку размером 1×75 см с сефадексом G-200 помещали негистоновые белки, сконцентрированные лиофильно и растворенные в 1,5 мл 0,0007 М фосфатного буфера, pH 7,0. Колонку уравнивали раствором следующего состава: 0,3 М NaCl, 0,001 М  $\beta$ -меркаптоэтанол, 0,001 М фосфат натрия, pH 7,0—7,5. Белки элюировали со скоростью 6 мл/ч, объем каждой фракции—1,5 мл. Во всех фракциях определяли содержание белка и величину радиоактивности, для чего 0,1 мл наносили на миллипоровый фильтр и подсчитывали на счетчике «Pieretechnik SL» (Франция).

При определении взаимодействия клеточных ядер мозга и печени с  $^3\text{H}$ -ДОФА их суспендировали в 0,32 М сахарозе (мозг), pH 6,5 или в трис-HCl буфере, pH 7,85 (печень) и добавляли 1 мкКи/мл  $^3\text{H}$ -ДОФА с удельной радиоактивностью 3,2 Ки/мм. Смесь инкубировали при 24° 30 мин, наносили на миллипоровые фильтры диаметром пор 0,4 мкм, промывали 20-ю объемами того же буфера и 20-ю объемами 96%-ного спирта. Высушенные фильтры анализировали, как описано выше.

При исследовании взаимодействия хроматина клеток мозга и печени с  $^3\text{H}$ -ДОФА хроматин разводили в растворе, содержащем 0,002 М ЭДТА, 0,05 М трис-HCl, 0,0001 М  $\beta$ -меркаптоэтанол, 5%-ный глицерин, 0,01  $\text{MgCl}_2$ , pH 7,6,  $^3\text{H}$ -ДОФА в концентрации 2 мкКи/мл и инкубировали при 24° 20 мин. Субклеточное фракционирование ткани мозга и печени осуществляли по De Duve и соавт. [6]. Во всех фракциях определяли содержание белка и величину радиоактивности.

### Результаты и обсуждение

При внутрибрюшинном введении крысам  $^3\text{H}$ -ДОФА и последующем выделении клеточных ядер мозга и печени было обнаружено, что  $^3\text{H}$ -ДОФА проникает в клеточные ядра, причем в ядра клеток мозга примерно в 4 раза интенсивнее (табл. 1). Для выяснения того, насколько проникновение специфично, крысам предварительно вводили нерадиоактивный ДОФА в концентрации 20 мг/кг массы, а через 20—30 мин—меченый моноамин, что снижало включение  $^3\text{H}$ -ДОФА в ядра клеток мозга в 6 раз, а печени—более чем в 4 раза.

Результаты экспериментов *in vitro* (табл. 1) показали, что ядра клеток мозга значительно более активны в отношении  $^3\text{H}$ -ДОФА, чем печени, а предварительное насыщение ядер нерадиоактивным препаратом ДОФА снижает включение  $^3\text{H}$ -ДОФА в ядра клеток мозга более чем в 2, а печени—1,5 раза.

С целью изучения распределения  $^3\text{H}$ -ДОФА по клеточным фракциям при внутрибрюшинном введении препарата проводили субклеточное фракционирование тканевого гомогената мозга и печени. При сравнении величин удельной радиоактивности клеточных фракций мозга и печени оказалось, что наибольшее количество метки сосредоточено в ядерной и митохондриальной фракциях, причем в мозгу метка преобладает в клеточных ядрах, а в печени—в лизосомной и митохондриальной фракциях (табл. 2). Вопрос о том, поступает ли ДОФА в клетки мозга через специфические рецепторные пути или минуя их

путем неспецифической диффузии, мы попытались решить, используя ингибитор дофаминовых рецепторов—галоперидол. Внутривнутрибрюшинное введение крысам галоперидола в концентрации 0,1 мг/кг массы резко снижало акцепцию тканью мозга  $^3\text{H}$ -ДОФА, введенного через 30 мин. Субклеточное фракционирование показало, что количество метки в ядрах клеток мозга уменьшалось примерно в 2 раза, а в митохондриальной и лизосомной фракциях практически не изменялось. В ядерной

Таблица 1

Включение  $^3\text{H}$ -ДОФА в ядра клеток мозга и печени *in vivo* и *in vitro* (имп/мин/мг белка)

	<i>In vivo</i>		<i>In vitro</i>	
	Внутрибрюшинное введение $^3\text{H}$ -ДОФА	Предварительное внутрибрюшинное введение ДОФА: через 30 мин $^3\text{H}$ -ДОФА	Взаимодействие $^3\text{H}$ -ДОФА с клеточными ядрами	Предварительная инкубация ядер с ДОФА: добавление через 30 мин $^3\text{H}$ -ДОФА
Мозг	$1,25 \cdot 10^4 \pm 6,2 \cdot 10^2$	$2,2 \cdot 10^3 \pm 1,03 \cdot 10^2$	$2,3 \cdot 10^6 \pm 10^5$	$9,4 \cdot 10^5 \pm 3,8 \cdot 10^4$
Печень	$3,2 \cdot 10^3 \pm 1,3 \cdot 10^2$ n=7	$7,0 \cdot 10^2 \pm 31$ n=9	$2,3 \cdot 10^5 \pm 8,9 \cdot 10^3$ n=8	$1,5 \cdot 10^5 \pm 7,0 \cdot 10^2$ n=8

Примечание.  $p < 0,01$  во всех вариантах опытов.

фракции, насыщенной галоперидолом, а затем  $^3\text{H}$ -ДОФА, влияние галоперидола не выявлялось: интенсивность радиоактивности ядер была на уровне контроля (табл. 3). На основании этих опытов можно предположить, что ДОФА проникает в клетку через дофаминовые рецепторы. Отсутствие полного ингибирования на фоне предварительного введения галоперидола можно расценить как наличие альтернативного механизма проникновения нейромедиатора в клетку.

Таблица 2

Включение  $^3\text{H}$ -ДОФА в различные фракции головного мозга и печени крыс при внутрибрюшинном введении (имп/мин/мг белка)

Ткань	Общий гомогенат	Ядерная фракция	Митохондриальная фракция	Лизосомная фракция
Мозг (n=7)	$430 \pm 48$	$759 \pm 60$	$300 \pm 27$	$382 \pm 41$
Печень (n=7)	$380 \pm 40$	$155 \pm 20$	$285 \pm 37$	$620 \pm 72$
	$p > 0,01$	$p < 0,01$	$p > 0,01$	$p < 0,01$

Для определения дальнейших путей внутриклеточного действия  $^3\text{H}$ -ДОФА из ядер мозга и печени после их взаимодействия с  $^3\text{H}$ -ДОФА выделяли хроматин, который диссоциировали на негистоновые белки и ДНК-гистоновый комплекс. При подсчете радиоактивности оказалось, что основное количество метки приходится на негистоновые белки, а на долю ДНК-гистонового комплекса—лишь 15% радиоактивности.

Гель-фильтрация негистоновых белков мозга, связавшихся с  $^3\text{H}$ -

ДОФА через сефадекс G-200, выявила, что основное количество метки принадлежало белку с величиной  $M_r$  200 кД (рис. 1, а). Изучение распределения  $^3\text{H}$ -ДОФА, связавшегося с белками печени, показало присутствие радиоактивного амина в комплексе с белками с величиной  $M_r$  25 кД (рис. 1, б). Из рис. 1 видно, что интенсивность взаимодействия  $^3\text{H}$ -ДОФА с белками хроматина мозга выражена значительно сильнее, чем с белками хроматина печени.

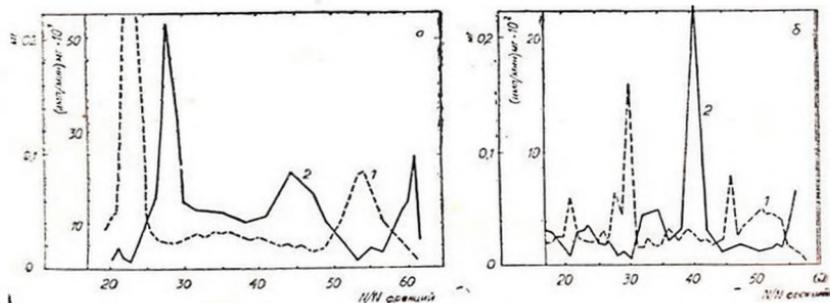


Рис. 1. Гель-фильтрация через сефадекс G-200 негистоновых белков хроматина клеток мозга (а) и печени (б). 1—белок  $A_{280}$ , 2—белок с  $^3\text{H}$ -ДОФА. По оси абсцисс—номера фракций, по оси ординат—содержание белка (в мг) связывания  $^3\text{H}$ -ДОФА (в имп/мин/мг белка)

Мы попытались определить функциональное значение взаимодействия моноамина с хроматином на модели с использованием радиоактивной аминокислоты.  $^3\text{H}$ -лейцин вводили крысам на фоне предварительного введения ДОФА в концентрации 10, 20, 40 и 80 мг/кг массы тела. Препараты вводили внутривентрикулярно с интервалом в 30 мин.

Таблица 3

Включение  $^3\text{H}$ -ДОФА в различные фракции головного мозга крыс на фоне предварительного внутривентрикулярного введения галоперидола (имп/мин/мг белка)

	Общий гомогенат	Ядерная фракция	Митохондриальная фракция	Лизосомная фракция
Опыт (n=9)	$7,6 \cdot 10^3 \pm 80$	$8,8 \cdot 10^3 \pm 60$	$5 \cdot 10^3 \pm 90$	$1,43 \cdot 10^4 \pm 160$
Контроль (n=8)	$2,04 \cdot 10^4 \pm 150$	$1,98 \cdot 10^4 \pm 140$	$4,4 \cdot 10^3 \pm 70$	$1,74 \cdot 10^4 \pm 180$
	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p > 0,01$	$p > 0,01$

Лейцин применяли в дозе 0,1 мКи/100 г массы тела. Затем из мозга и печени выделяли субклеточные фракции, в которых измеряли уровень радиоактивности. Результаты этих опытов представлены на рис. 2, из которого видно, что в присутствии ДОФА включение  $^3\text{H}$ -лейцина заметно нарастает во всех внутриклеточных фракциях мозговой ткани, оставляя без изменения уровень радиоактивности внутриклеточных фракций печени.

При сравнении действия различных использованных нами доз ДОФА оказалось, что доза 20 мг/кг массы обладает наиболее выраженным биологическим эффектом. Повышение дозы до 80 мг/кг приводило к противоположному действию: введение ДОФА в такой концентрации способствовало ингибированию белкового синтеза в мозгу.

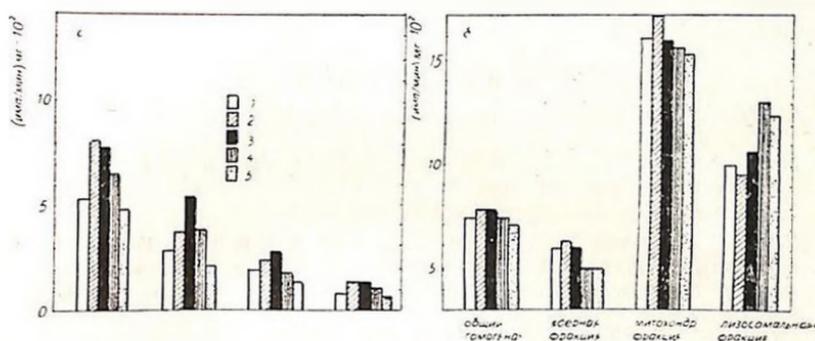


Рис. 2. Включение <sup>3</sup>H-лейцина в различные фракции головного мозга (а) и печени (б) крыс на фоне предварительного введения ДОФА: 1—контроль, 2—10 мг/кг, 3—20 мг/кг, 4—10 мг/кг, 5—80 мг/кг

Показано, что нейромедиаторы способствуют повышению синтеза сАМР или сGMP [7, 8]. Известно также, что нейромедиаторы могут взаимодействовать и с внутриклеточными структурами [9, 10]. В настоящей работе сделана попытка выяснить возможный молекулярный механизм влияния L-ДОФА на биосинтез белка.

На основании изложенного можно прийти к заключению, что взаимодействие с ДОФА является специфичным для ткани мозга. Использование ингибитора дофаминовых рецепторов—галоперидола резко снижало акцепторную способность ядер мозга по отношению к <sup>3</sup>H-ДОФА. Результаты наших опытов позволяют сделать вывод, что поступление ДОФА в клетки может происходить двумя способами: специфическим, через рецептор, и путем неспецифической диффузии.

В клетке ДОФА взаимодействует с белками хроматина и в определенных дозах оказывает влияние на способность клеток акцептировать аминокислоты. Специфичность влияния ДОФА на ткань мозга может интерпретироваться как свидетельство тканеспецифичного пути активации генома и последующей перестройки пластических процессов.

## INTERACTION BETWEEN L-DOPA AND INTRACELLULAR STRUCTURES IN RAT BRAIN AND LIVER

TRETYAK T. M., ARKHIPOVA L. V.

Institute of Biological Physics, Poustchino

It was found that L-DOPA, a dopamine precursor, when injected intraperitoneally could penetrate into brain and liver cells and interact

there with nonhistone proteins of chromatin. Preliminary injection of nonradioactive L-DOPA to experimental rats decreases the intensity of the interaction of chromatin with  $^3\text{H}$ -DOPA. Pretreatment with haloperidol blocking dopamine receptors drastically diminishes the interaction of L-DOPA with brain cells nuclear structures. DOPA substantially increases  $^3\text{H}$ -leucine incorporation into all subcellular brain fractions studied.

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Goldfine I. D., Smith G. J. Proc. Nat. Acad. Sci., USA., v. 73, № 5, p. 1427—1431, 1976.
2. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., v. 193, № 1, p. 423—434, 1951.
3. Спириш А. С. Биохимия, т. 23, № 5, с. 659—660, 1958.
4. Huang C. C., Huang P. C. J. Neurochem., v. 29 № 1, p. 5—12, 1969.
5. Burdman J. A., Hagleid K. J. Neurochem., v. 17, № 5, p. 669—674, 1970.
6. De Duve C., Pressman B. C., Gionetto R., Wattiaux R., Appelans F. J. Biochem., v. 60, № 4, p. 604—617, 1955.
7. Phillipson O. T., Horn A. S. Nature, v. 261, № 5559, p. 418—420, 1976.
8. Cohn M. L., Cohn M. L., Taylor F. H. Science, v. 199, № 4326, p. 319—321, 1978.
9. Roel L. E., Schwartz S. A., Weiss B. E., Munro H. N., Wurtman R. J. J. Neurochem., v. 23, p. 223—239, 1974.
10. Hogenauer C., Krell G., Bernheimer H. FEBS Lett., v. 88, № 1, p. 101—163, 1978.

Поступила 12. VII 1985



УДК 577.15.17:577.152:577.158

## АКТИВАЦИЯ МАО ТИПА Б ГОЛОВНОГО МОЗГА БЫКА 2-ИЗОПРОПОКСИФЕНИЛМЕТИЛКАРБАМАТОМ И НЕКОТОРЫМИ ЕГО СТРУКТУРНЫМИ АНАЛОГАМИ

\*ЗЕИНАЛОВ Т. А., ЕРМОЛАЕВ К. М., ПОЗДНЕВ В. Ф., КАМЫШАНСКАЯ Н. С.

Институт вирусологии, микробиологии и гигиены им. Г. М. Мусабекова МЗ АзССР,  
Баку; Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

В опытах с препаратами митохондриальной фракции головного мозга быка при преникубации с байгоном—пестицидом класса карбаматов была обнаружена избирательная активация реакции окислительного дезаминирования фенилэтиламина—субстрата МАО типа Б, но не серотонина—субстрата МАО типа А и тирамина, окисляющегося обоими типами МАО. Цинеб—другой пестицид класса карбаматов, не содержащий фенильного радикала, тормозил активность МАО в отношении всех исследуемых субстратов. Стимулирующий эффект байгона опосредован воздействием на интактную мембрану: нарушение структуры мембраны в процессе солиобилизации и очистки фермента устраняло активирующее действие байгона. Одним из условий, определяющих активирующее действие структурных аналогов байгона, по-видимому, является их высокая липофильность. Введение в структуру байгона полярных групп прелотращало появление стимулирующего эффекта.

МАО, моноамин:  $O_2$ —оксидоредуктазы (дезаминирующие) (содержащие флавин) (КФ 1.4.3.4)—группа родственных, близких по свойствам, но поддающихся препаративному разделению ферментов. Они катализируют ключевую реакцию метаболизма биогенных аминов, многие из которых являются важнейшими медиаторами и модуляторами нервных импульсов в синаптических окончаниях аминергических нейронов. Из них МАО типа А специфически катализируют дезаминирование серотонина и норадреналина; МАО типа Б—окисление 2-фенилэтиламина и бензиламина. Дофамин, триптамин, тирамин дезаминируют оба типа МАО. Нарушение каталитической активности МАО имеет важное значение в патогенезе многих нервных и психических расстройств, а также целого ряда заболеваний, связанных с накоплением в тканях продуктов перекисного окисления липидов [1]. МАО типа А, расположенные на внутренней поверхности наружной мембраны митохондрий, окружены молекулами ненасыщенных жирных кислот, которые при физиологических значениях температуры находятся в жидком состоянии; МАО типа Б, локализованные на внеш-

ней поверхности этой мембраны в непосредственной близости к полярному слою фосфолипидов, находящаяся в более жестком липидном окружении, по-видимому, состоящем преимущественно из насыщенных жирных кислот и холестерина, входящих при 37° в твердую фазу.

В настоящее время достигнуты большие успехи в создании и изучении свойств субстратно-избирательных, обратимо действующих ингибиторов MAO типа А и В, многие из которых нашли применение в клинике в качестве антидепрессантов [2]; активаторы же MAO еще мало изучены [3].

Недавно было обнаружено, что интоксикация пестицидами различного химического строения может сопровождаться нарушением реакций дезаминирования биогенных аминов [4]. В частности, при изучении влияния пестицидов класса карбаматов на активность MAO как в опытах *in vivo*, так и *in vitro* с митохондриальными мембранами, выделенными из головного мозга и печени крыс, было установлено, что инсектицид байгон (2-изопропоксифенилметилкарбамат) избирательно стимулировал окислительное дезаминирование фенилэтиламина [5]. Стимуляция активности MAO типа В была обратной и протекала по конкурентному механизму. Целью данной работы было исследование влияния байгона и некоторых его структурных аналогов на скорость окислительного дезаминирования фенилэтиламина митохондриальными мембранами и высокоочищенными препаратами MAO.

## Материалы и методы

**Выделение митохондриальных мембран.** Из стволовой части головного мозга быка готовили 10%-ный гомогенат на охлажденном 0,25 М растворе сахарозы. Ядра и фрагменты клеток осаждали центрифугированием при 600 г в течение 10 мин. Митохондриальную фракцию получали центрифугированием надосадочной жидкости при 12000 g; осадок промывали охлажденным 0,01 М  $K^+$ ,  $Na^+$ -фосфатным буфером, pH 7,4 (буфер А), суспендировали в том же буфере и вновь центрифугировали при 12000 g. Приготовленный таким образом препарат митохондриальной фракции сохраняли замороженными для дальнейшей работы при -20°.

**Очистка фермента.** Солюбилизацию, разделение и очистку препаратов MAO проводили по разработанному ранее методу [6], основанному на сочетании воздействия на препараты митохондрий неионного детергента 1,3%-ного тритона X-100 и 1,3 М мочевины в буфере А при концентрации белка в смеси 10 мг/мл. Суспензию перемешивали 30 мин при 4°, а затем центрифугировали в течение 30 мин при 40000 g. Мочевину удаляли, пропуская надосадочную жидкость через колонку с сефадексом G-50, уравновешенную буфером А. Элюат концентрировали в 6 раз методом ультрафильтрации на приборе «Амикон» (Голландия) с мембраной РМ-30. Концентрат наносили на колонку, содержащую АН-сефарозу 4 В, уравновешенную буфером А. Балластные белки удаляли промыванием колонки этим же буфером, содержащим 10%-ный тритон X-100. Высокоочищенный препарат MAO элюировали с колонки градиентом концентрации тритона X-100 (0,10—0,25%) в буфере А.

**Порядок проведения опытов.** В экспериментах были исследованы следующие соединения (табл. 3): цинне—Zn—N, N—этилен бис-дитиокарбамат (отечественный); байгон-2-изопропоксифенилметилкарбамат («Вауер», ФРГ); соединения, синтезированные в лаборатории органической химии Института биологической и медицинской химии

АМН СССР: № 1—2-гидроксибензилметилкарбамат, № 2-фенилметилкарбамат, № 3—*О,О'*-диацетилпирокатехин, № 4—*N,О,О'*-триацетил-3-аминопирокатехин, № 5—бромид *О,О'*-диацетил-3-пиридиниопирокатехина, 6—бромид 3-пиридиниопирокатехина, № 7—бромид 3-пиридинио-2-ацетокси-2-циклогексен-1-она, № 8—бромид 3-пиридинио-1-ацетокси-6-циклогексен-2-она. Фенилметилкарбамат (температура плавления 83—84°) и 2-гидроксибензилметилкарбамат (температура плавления 117—118°) были синтезированы обработкой соответственно дифенилкарбоната и пирокатехинкарбоната рассчитанными количествами метиламина в тетрагидрофуране. Синтез соединений №№ 4—8 многоэтапен и будет описан в отдельной статье.

Суспензию митохондриальной фракции (5 мг/мл) тщательно растирали и перемешивали с навесками указанных выше соединений (их конечная концентрация составляла 0,05 мМ) в гомогенизаторе Поттера и преникубировали в течение 30 мин при 37°. Об активности МАО судили по освобождению аммиака после инкубации при оптимальных условиях для исследуемого биологического материала с одним из аминов. Определение содержания аммиака в пробах проводили методом изотермической диффузии с последующей несслеризацией. Инкубацию проводили на воздухе в течение 10 мин. Пробы (конечный объем 1,8 мл) содержали 5 мг белка суспензии митохондриальной фракции, 0,1 М  $K^+$ ,  $Na^+$ -фосфатный буфер рН 7,4 и один из субстратов в следующих оптимальных концентрациях в пробе: тирамин гидрохлорид («Merck, ФРГ»)—1 мМ, серотонин креатининсульфат («Reanal», Венгрия)—1 мМ, 2-фенилэтиламин гидрохлорид (отечественный)—0,4 мМ. При указанных выше условиях реакция окислительного дезаминирования исследуемых субстратов протекала линейно.

## Результаты и обсуждение

В условиях наших опытов скорости дезаминирования тирамина, серотонина и фенилэтиламина при их инкубации с митохондриальной фракцией стволовой части головного мозга быка составляли 9,5, 5,6 и 4,7 нмоль/мг белка/мин. Преникубация митохондриальных фракций с байгоном приводила к значительной стимуляции реакции окислительного дезаминирования фенилэтиламина (в среднем в 2 раза), тогда как скорость окисления тирамина и серотонина оставалась без изменений (табл. 1). Преникубация же митохондриальной фракции с цине-

Таблица 1

Влияние карбаматных производных (0,05 мМ)—байгона и цинеба на скорость дезаминирования субстратов МАО при их инкубации с митохондриальной фракцией головного мозга быка (n=12)

Условия опыта	Дезаминирование в нмоль аммиака/мг белка/мин		
	тирамин	серотонин	2-фенилэтиламина
Контроль	9,5±1,4	5,6±0,7	4,70±0,07
Байгон	11,3±1,5	6,7±1,2	9,5±1,8*
Цинеб	5,1±1,3*	2,8±0,6*	2,70±0,05*

Примечание. \* $p < 0,05$ .

бом приводила к снижению скоростей дезаминирования всех исследуемых субстратов: тирамина—на 48%, серотонина—на 50% и фенилэтиламина—на 62% (табл. 1).

Таким образом, данные по исследованию влияния производных

карбамата цинеба и байгона на активность MAO митохондриальных фракций стволовой части головного мозга быка согласуются с полученными ранее результатами аналогичных опытов с MAO митохондрий мозга и печени крыс: байгон избирательно активировал процесс окисления фенилэтиламина субстрата MAO типа Б, но не влиял на реакции дезаминирования тирамина и серотонина; циниб тормозил скорость окисления всех исследованных субстратов.

Таблица 2.

Влияние байгона (0,05 мМ) на скорость дезаминирования субстратов MAO при их инкубации с высокоочищенными препаратами MAO головного мозга быка (n=5)

Условия опыта	Дезаминирование в нмоль аммиака/мг белка/мин		
	тирамина	серотонина	2-фенилэтиламина
Контроль	107	63	52
Байгон	96	67	58

В то же время в экспериментах с высокоочищенными препаратами митохондриальной MAO из стволовой части головного мозга быка не было отмечено стимулирующего действия байгона на скорость реакций окислительного дезаминирования не только тирамина и серотонина, но также и фенилэтиламина (табл. 2). В связи с этим полученные результаты дают основание предполагать, что избирательная активация байгоном дезаминирования фенилэтиламина была опосредована взаимодействием этого производного карбаминной кислоты с интактной митохондриальной мембраной: отделение MAO от её структурных элементов в процессе солюбилизации (в наших опытах путём сочетанного воздействия неионного детергента тритона X-100 и мочевины) полностью предотвращало стимулирующий эффект байгона.

Липидное окружение белковой части молекул MAO, находящихся в мембране, играет важную роль в формировании функционального состояния активного центра этих ферментов, в частности MAO типа Б. По литературным данным [7], частичная экстракция липидов метилэтилкетонем из митохондриальных мембран печени быка приводила к увеличению кажущейся  $K_m$  по отношению к фенилэтилмину более чем на порядок. В опытах с митохондриальными мембранами печени быка и крыс было обнаружено сильное и специфическое торможение активности MAO типа Б фосфатидилсеринном, ингибирующий эффект которого не предотвращала обработка мембран другими фосфолипидами, хаотропными агентами и ультразвуком, но частично устраняла обработка мембран поверхностно-активным веществом — октилглюкозидом. Далее следует особо отметить, что фосфатидилсерин не действовал на солюбилизированную MAO типа Б из печени быка; очевидно, для специфического взаимодействия этого фосфолипида с MAO необходимо нахождение фермента в интактной мембране [8].

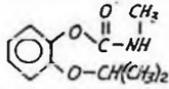
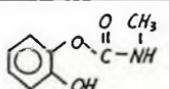
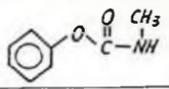
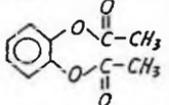
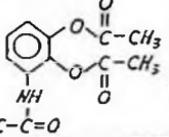
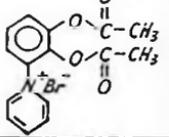
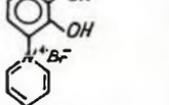
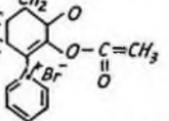
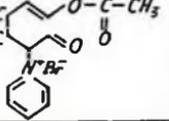
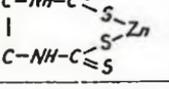
В наших опытах по изучению влияния некоторых структурных аналогов байгона на активность MAO типа Б в препаратах митохондриальной фракции мозга быка (табл. 3) было обнаружено, что четыре из них (№№ 2—5) обладают свойствами стимулировать реакцию окисления фенилэтиламина, однако эффект активации MAO типа Б этими соединениями был значительно ниже уровня активации, наблюдаемой при действии на мембраны митохондрий байгоном. Соединения №№ 1, 6—8 не изменяли скорости дезаминирования фенилэтиламина; отличительной особенностью этих веществ является наличие в их структуре заряженных группировок. Так, более простой по структуре, чем байгон, фенилметилкарбамат (№ 2) сохранял выраженную стимулирующую активность, тогда как введение в положение 2 гидроксильной группировки (соединение № 1) полностью предотвращало эффект стимуляции. Диацетилпирокатехин (№ 3) также проявлял активность. Введение в положение 3 ацетиламинной группы (соединение № 4) относительно мало изменяло активность MAO типа Б; наличие же в этом положении другого, более сильного электроотрицательного пиридинийбромидного остатка (соединение № 5) значительно увеличивало эффект стимуляции дезаминирования фенилэтиламина. С другой стороны, гидролиз этого соединения до бромида 3-пиридиниопирокатехина (соединение № 6) приводило к тому, что последний оказался полностью лишённым активности. Не обладали активностью также и соединения № 7 и 8, хотя они и содержат в своей молекуле группировки, характерные для препарата № 5.

Полученные данные подтверждают предположение о том, что в стимулирующем эффекте байгона и соединений №№ 2—5 главное значение имеет их взаимодействие с липидным окружением активного центра MAO типа Б. Введение гидроксильных группировок, снижающее липофильность соединений №№ 1, 6—8 полностью предотвращало появление у них свойства избирательно активировать окислительное дезаминирование фенилэтиламина после их преникубации с митохондриями мозга быка.

В опытах *in vivo* было показано [5], что байгон как сравнительно небольшое и жирорастворимое соединение [9] проникает через ГЭБ. Попав с кровотоком в ткани мозга, байгон, по-видимому, в первую очередь взаимодействует и активирует экстранейрональные MAO митохондрий глиальных клеток, которые содержат в основном MAO типа Б [10]. Глиальным MAO отводят важную роль в регуляции содержания не только минорного нейромедиатора фенилэтиламина, но и дофамина, модулирующего активность дофаминергических систем в данном случае путём внеснантического контакта. Возрастание активности MAO типа Б в тканях мозга наблюдали при замещении глиальными клетками нейронов, отмирающих в процессе старения [10] или разрушающихся под влиянием токсических и инфекционных агентов [11].

Все пестициды—производные карбаминной кислоты были синтезированы в расчёте на их антихолинэстеразные свойства [9]. По за-

Воздействие производных κ-Замшиной кислоты и их аналогов (0,1 мМ) на дезаминирование фенилэтиламина при его инкубации с препаратами митохондриальных фрак. мозга быка (n—не менее 12)

Условия	Дезаминирование фенилэтиламина (в нмоль аммиака/мг белка/мин)	Изменение активности МАО Б (в %)	
Контроль	4,7±0,07		
Добавленные вещества байгон		9,6±1,8	+100**
№ 1—2-гидроксифенилметилкарбамат		4,8±0,5	0
№ 2—фенилметилкарбамат		7,3±0,7	+55*
№ 3—O,O'-диацетилпирокатехин		5,8±0,5	+28*
№ 4—N,O,O'-триацетил-3-аминопирокатехин		5,7±0,8	+25*
№ 5—бромид O,O'-диацетил-3-пиридинпи-рокатехина		7,8±0,3	+58*
№ 6—бромид 3-пиридинопи-рокатехина		4,5±1,2	0
№ 7—бромид 3-пиридино-2-ацетокси-2-цикло-гексен-1-она		4,5±1,8	0
№ 8—бромид 3-пиридино-1-ацетокси-6-цикло-гексен-2-она		4,6±0,9	0
Циннеб		2,7±0,05	-62**

Примечание. Уровни достоверности—\*p<0,05; \*\*p<0,01.

включению экспертной комиссии Всемирной организации здравоохранения, инсектицид байгон как один из самых безопасных для человека, рекомендован для борьбы с насекомыми в закрытых помещениях [12]. Можно предполагать, что характерные для интоксикаций байгоном симптомы—тремор, головокружения, временная потеря памяти, быстрое проходящее на свежем воздухе и не сопровождающиеся изменением холинэстеразной активности сыворотки крови [13], обусловлены обратимым возрастанием активности MAO типа B [5]. Можно также предположить, что разрешенный к применению в клинике и вполне безопасный для человека избирательный ингибитор MAO типа B депренил [10] будет предотвращать появление функциональных расстройств ЦНС, характерных для интоксикаций пестицидами класса карбаматов. Изыскание новых активных соединений в ряду 2-фенилпропизольных байгона может привести к созданию лекарственных препаратов для лечения некоторых форм шизофрении, для которых характерно повышение содержания дофамина в лимбических структурах мозга [14].

## ACTIVATION OF BOVINE BRAIN MAO (TYPE B) BY 2-ISOPROPOXYPHENYL-METHYLCARBAMATE AND ITS ANALOGUES

\*ZEINALOV T. A., ERMOLAYEV K. M., POZDNEV V. F.,  
KAMYSHANSKAYA N. S.

<sup>\*</sup>Institute of Virology, Microbiology and Hygiene, Ministry of Health, Baku;  
Institute of Biological and Medical Chemistry, USSR Academy of Medical  
Sciences, Moscow

Preincubation of brain mitochondrial fraction with bigone—a carbamate group pesticide—results in the activation of oxidative deamination of phenylethylamine (substrate of MAO type B) and tyramine (substrate of both type of MAO). Cineb—another pesticide of this group without phenyl radical—inhibits activity of MAO against all these substrates. Damage of membrane structure abolishes the activating effect of bigone. Insertion of polar groups into its structure abolishes the stimulating effect of bigone.

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Горкин В. З., Москвитина Т. А., Камышанская Н. С. Вест. Акад. мед. наук СССР, № 8, с. 55—59, 1984.
2. Машковский М. Д., Андреева Н. И., Полежаева А. Н. Фармакология антидепрессантов, М., Медицина, 1983.
3. Сафразбекян Р. Р. Особенности изучения активации моноаминоксидазы, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1983.
4. Kadir H. A., Knowles C. O. Gen. Pharm., v. 12, p. 239—247, 1980.
5. Зейналов Т. А. Гигиена и санитария, № 6, с. 49—52, 1984.
6. Камышанская Н. С., Москвитина Т. А. Вопр. мед. химии, т. 27, № 2, с. 261—266, 1981.

7. *Yu P. H.*—In: Monoamine oxidase: structure, function and altered functions, p. 233—245, L.—N. Y., Academic Press, 1979.
8. *Buckman T. D., Eiduson S., Bogcia R.* Biochem. Pharm., v. 32, p. 3639—3647, 1983.
9. *Барнэ Ж. М.* Бюл. ВОЗ, т. 44, с. 421—423, 1972.
10. *Knoll J.*—In: Monoamine oxidase: basic and clinical frontiers, p. 221—230, Amsterdam, Elsevier, 1982.
11. *Salne D. B., Langston J. W.* Lancet, № 2, p. 1457—1459, 1983.
12. *Вандекар М., Плетшина Р., Вильгельм К.* Бюл. ВОЗ, т. 44, с. 255—264, 1972.
13. *Каляюнова-Симонова Ф.* Пестициды: токсическое действие и профилактика, М., Медицина, 1980.
14. *Горкин В. Э.* Амноксидазы и их значение в медицине. М., Медицина, 1981.

Поступила 22. VIII 1985



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

ОБ АКТИВАЦИИ ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ ЦИКЛИЧЕСКОГО  
ГУАНОЗИН-3', 5'-МОНОФОСФАТА ГИПОТАЛАМУСА  
МЕТИЛКСАНТИНАМИ И ПАПАВЕРИНОМ

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

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Исследование растворимой фосфодиэстеразы (ФДЭ) циклических нуклеотидов гипоталамуса быка, выделенной с помощью ПОХ, показало наличие нескольких пиков ферментативной активности, отличающейся субстратной специфичностью, кинетическими характеристиками и регуляторными свойствами.

Особый интерес представляет тот факт, что ФДЭ cGMP, являющаяся кальмодулинзависимой, активируется под действием cAMP (1—200 мкМ) в отсутствие тиоловых соединений, что сопровождается потерей чувствительности фермента к активации кальмодулином (КМ). Обнаружено, что в этих условиях известный конкурентный ингибитор ФДЭ циклических нуклеотидов теофиллин также активирует гидролиз cGMP. Аналогичным свойством обладали кофеин и папаверин. Обработка препаратов ФДЭ тиоловыми соединениями (дитиотрептолом или 2-меркаптоэтанолам) восстанавливала как чувствительность ФДЭ к КМ, так и ингибирование фермента под действием cAMP и теофиллина. Наблюдаемые обратимые эффекты, специфичные лишь для ФДЭ cGMP, коррелировали с изменениями ферментативной активности и были сопряжены с участием каталитического центра.

Парадоксальный активирующий эффект известных ингибиторов ФДЭ и сложный характер взаимовлияния субстратов при их гидролизе дают возможность рентерпретации ряда принятых классификационных признаков множественных форм ФДЭ циклических нуклеотидов.

Фермент катаболизма циклических аденозин- и гуанозин-3', 5'-монофосфатов—ФДЭ (КФ 3.4.1.17), наряду с ферментами их биосинтеза аденилат- и гуанилатциклазами, обеспечивает поддержание уровней циклических нуклеотидов в клетке, необходимых для осуществления важнейших клеточных процессов [1].

Проблема изучения механизмов действия ФДЭ тесно связана с проблемой регуляции множественных форм этого фермента, которые в настоящее время являются предметом многочисленных исследований. Выделенные из различных тканей формы растворимой ФДЭ, отличающиеся по сродству к субстратам, величине  $M_r$ , физико-химическим характеристикам и регуляторным свойствам, обычно сводят к двум основным: ФДЭ I— $Ca^{2+}$ -зависимой форме и ФДЭ II—цикло-

нуклеотидактивируемой. Существенным отличием ФДЭ I от других форм является ее способность активироваться в присутствии КМ. ФДЭ II характеризуется стимуляцией гидролиза сАМР под действием микромолярных концентраций сGMP, выступающего в роли аллостерического регулятора.

Однако на основании экспериментальных данных становится очевидной условность принятых классификационных признаков множественных форм ФДЭ не только потому, что были обнаружены ФДЭ, проявляющие одновременно как чувствительность к КМ, так и способность регулироваться циклическими нуклеотидами [2—4], но также в силу известной лабильности свойств фермента, зависящих от условий выделения, ионной силы, присутствия или отсутствия SH-реагентов, концентрации белка, возможности протекания протеолиза и т. д. [5, 6].

Подтверждением этому служат также приведенные в настоящей работе новые результаты исследований ФДЭ гипоталамуса быка, свидетельствующие об обратимых изменениях регуляторных свойств фермента в зависимости от наличия или отсутствия тиоловых реагентов. Показаны существенные функциональные различия центров ФДЭ, катализирующих гидролиз сАМР и сGMP.

### Материалы и методы

Ткань гипоталамуса гомогенизировали в 20 мМ трис-НСI буфере, рН 8,0 (1:2), содержащем 5 мМ  $MgCl_2$  и 0,1 мМ ЭГТА, в отсутствие или в присутствии 10 мМ дитиотрептола (ДТТ) (или 2-меркаптоэтанол). Супернатант гомогената (75 000 г, 60 мин), содержащий 50 мг белка, пропускали через колонку (1,2×27 см) с ДЭАЭ-целлюлозой. Элюцию проводили тем же буфером (по 4 мл на фракцию) с использованием градиента NaCl (0,05—0,4 М). Активность ФДЭ определяли в 10 мкл инкубационной среды, содержащей 20 мМ трис-НСI буфер, рН 8,0, 2 мМ  $MgCl_2$ , 0,5 мкКи  $^3H$ -сGMP и сGMP в различных концентрациях в опытах с ФДЭ сGMP (или 0,5 мкКи  $^3H$ -сАМР и сАМР в различных концентрациях в опытах с ФДЭ сАМР) и определенное количество ферментного белка из элюированных с колонки фракций. Инкубацию проводили при 30° в течение различных промежутков времени. После окончания инкубации пробы помещали в кипящую водяную баню, продукты реакции разделяли с помощью ТСХ на силикагеле, количество гидролизованного субстрата определяли с помощью жидкостного сцинтилляционного спектрометра. Содержание белка в пробах определяли по методу Lowry и соавт. [7].

В отдельных экспериментах использовали высокоочищенные и гомогенные препараты ФДЭ, полученные путем фракционирования гомогената сульфатом аммония, ионообменной хроматографии на ДЕАЭ-целлюлозе, двухступенчатой хроматографии на голубой сефарозе CL-6B, гель-фильтрации на сефарозе G-150 и на Тойоперле HW-55i и электрофорезом в ПААГ.

В работе были использованы следующие реактивы: сАМР, сGMP, теофиллин, папаверин, ЭГТА («Sigma», США); ДЭАЭ-целлюлоза («Pharmacia», Швеция) и («Reanal», Венгрия); ДТТ («Reanal», Венгрия); 2-меркаптоэтанол («Merck», ФРГ); пластины Силуфол UV-254 («Kavalier», Чехословакия); остальные препараты фирмы «Рехим» (СССР).

## Результаты и обсуждение

С помощью хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе растворимой фракции гипоталамуса быка с использованием градиента концентраций NaCl (0,05—0,4 М) выявлены несколько пиков активности ФДЭ циклических нуклеотидов (рис. 1, а). Показано, что профиль элюции ФДЭ сGMP существенно зависит от присутствия в элюируемых пробах сульфгидрильных соединений—ДТТ или 2-меркаптоэтанола. В их отсутствие проявляются три пика активности фермента, спады между которыми соответствуют двум пикам ФДЭ, гидролизующей сАМР. При добавлении тиоловых соединений активность ФДЭ сGMP значительно возрастает, проявляясь лишь в двух пиках, сопутствующих пикам ФДЭ сАМР. Большой интерес представляет тот факт, что профиль элюции, а также уровень активности ФДЭ сАМР при указанной концентрации субстрата не изменяется в присутствии ДТТ.

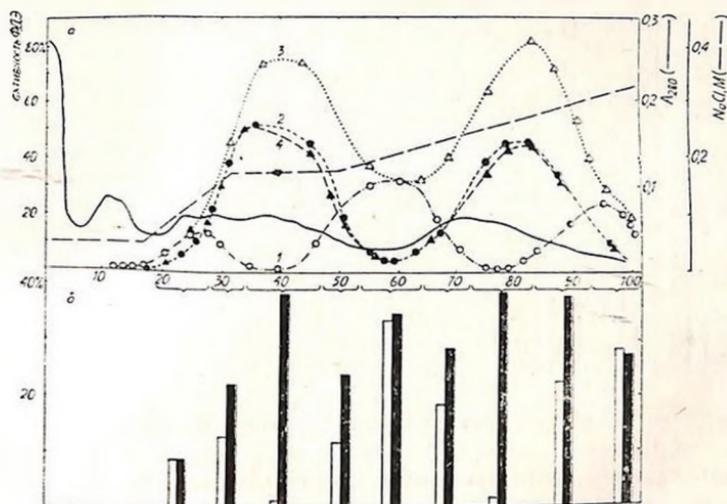


Рис. 1. а—хроматография ФДЭ сGMP (1, 3) и ФДЭ сАМР (2, 4) на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой в отсутствие (1, 2) и в присутствии (3, 4) ДТТ (10 мМ). Концентрация субстратов—3 мкМ; б—активность ФДЭ сGMP (в %) в отсутствие ( $\square$ ) и в присутствии ( $\blacksquare$ ) сАМР (50 мкМ) во фракциях, соответствующих различным участкам профиля элюции фермента, выделенного без ДТТ.

Обнаружено, что в отсутствие ДТТ ФДЭ сGMP обладала чувствительностью к активации под действием сАМР в концентрациях 1—200 мкМ во фракциях, содержащих активность ФДЭ сАМР; максимальный эффект проявлялся в пиках ФДЭ сАМР (рис. 1, б). Способность ФДЭ сGMP активироваться под действием сАМР усиливалась в процессе хранения фермента при 4° и наблюдалась в течение длительного времени. Однако ДТТ (или 2-меркаптоэтанола) обратимо-

восстанавливали свойство фермента конкурентно ингибироваться сАМР в том же диапазоне концентраций (рис. 2, а, б).

Необходимо отметить, что, в отличие от ФДЭ сGMP, ФДЭ сАМР не активировалась под действием сGMP (1—50 мкМ) в отсутствие тиолов ни в одной из фракций профиля элюции во всем исследованном диапазоне концентраций субстрата (0,1—100 мкМ). При этом наблюдался ингибирующий эффект сGMP по отношению к гидролизу сАМР, который сохранялся при добавлении ДТТ к препаратам фермента (рис. 2, в, г.).

Свойство аллостерически активироваться микромолярными концентрациями сGMP в присутствии ДТТ, присущее лишь ФДЭ сАМР,

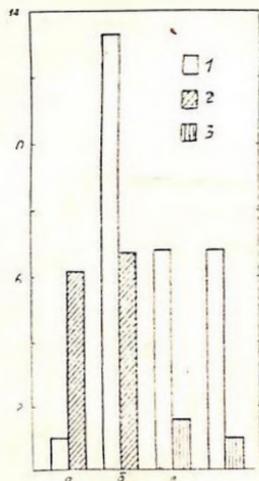


Рис. 2. Гидролиз сGMP (а, б) и сАМР (в, г) в отсутствие (а, в) или в присутствии (б, г) 10 мМ ДТТ во фракции № 45 профиля элюции ФДЭ (рис. 1, а) в контроле (1) и при добавлении сАМР (2) или сGMP (3). Концентрации субстратов и эффекторов—0,2 и 50 мкМ соответственно. По оси ординат—активность ФДЭ (нмоль/мин).

элюируемой во втором пике активности этого фермента, было нами продемонстрировано ранее [8]. Тем не менее это свойство, характерное для циклонуклеотидзависимых форм ФДЭ, отличается от активирующего действия сАМР, описанного в настоящей работе, тем, что последнее осуществляется в результате взаимодействия сАМР с каталитическими центрами ФДЭ.

Кинетический анализ ФДЭ сGMP, выделенной в отсутствие ДТТ, показал, что гидролиз сGMP происходит в соответствии с принципом положительной кооперативности по субстрату, которая, главным образом, проявляется во фракциях, сопряженных с пиками активности ФДЭ сАМР I и II (рис. 3 и 4) и характеризуется значениями коэффициента Хилла ( $n_H$  1,6 и 1,3) соответственно. Добавление сАМР к реакционной смеси линеаризует кинетическую кривую в координатах Лайнуивера-Берка дозозависимым способом. В присутствии 100 мкМ сАМР гидролиз сGMP подчинялся кинетике Михаэлиса-Ментен; значение  $K_m$  для сGMP составляет при этом 25 мкМ. Следует отметить, что эта кривая в исследованном диапазоне концентраций суб-

страта полностью совпадает с кинетической кривой, описывающей гидролиз сGMP под действием ФДЭ, элюируемой во фракциях 52—62, соответствующих второму пику активности ФДЭ сGMP, почти не содержащих ФДЭ сAMP (рис. 3).

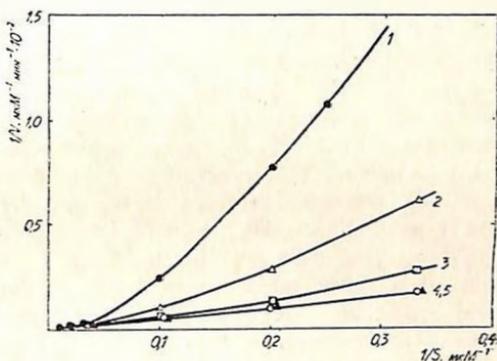


Рис. 3. Кинетические характеристики ФДЭ сGMP, выделенной в отсутствие ДТТ во фракции № 85 в контроле (1) и при добавлении сAMP в концентрациях 25 мкМ (2), 50 мкМ (3) и 100 мкМ (4). Кинетика гидролиза сGMP во фракции № 60 (5). Результаты представлены в координатах обратных величин Лайнувера-Берка

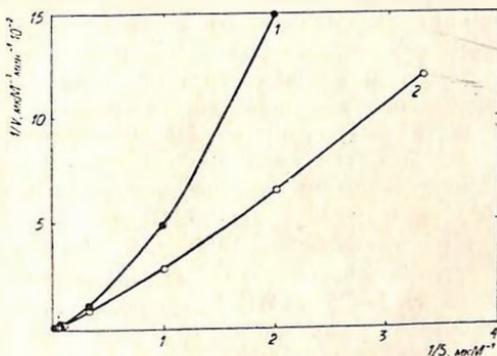


Рис. 4. Кинетические характеристики ФДЭ сGMP, выделенной в отсутствие ДТТ, во фракции № 35 в контроле (1) и в присутствии 50 мкМ сAMP (2). Результаты представлены в координатах обратных величин Лайнувера-Берка

Положительная кооперативность по субстрату не проявляется при гидролизе сGMP в присутствии ДТТ. Кинетика ФДЭ сGMP 1, однако, описывается нелинейным графиком, характеризующимся двумя значениями  $K_m$  для сGMP:  $K_{m_1} = 2 \text{ мкМ}$  и  $K_{m_2} = 25 \text{ мкМ}$ .

Кинетический анализ ФДЭ сAMP 1 также показал наличие центров высокого и низкого сродства к субстрату, которым соответствуют

значения  $K_{m_1} = 2$  мкМ и  $K_{m_2} = 25$  мкМ соответственно. При этом в отличие от ФДЭ сGMP, гидролиз сAMP в отсутствие и в присутствии ДТТ описывался сходными кинетическими характеристиками.

Ранее нами было установлено, что ФДЭ сGMP во всех выделенных пиках является KM-зависимой [9]. Однако чувствительность к активации в присутствии KM снижалась в отсутствие тиолов в реакционной смеси, что сопровождалось появлением активирующего действия сAMP на гидролиз сGMP. Увеличение активности ФДЭ сGMP во времени с момента добавления ДТТ сопровождалось превращением активирующего действия сAMP в ингибирующее, а также возникновением утраченной в отсутствие ДТТ чувствительности фермента к KM.

Полученные данные свидетельствуют о том, что регуляторные и каталитические свойства ФДЭ сGMP, но не ФДЭ сAMP, существенно зависят от присутствия тиолов в реакционной среде. Наблюдаемые обратимые регуляторные эффекты коррелировали с изменением активности фермента, что может свидетельствовать об участии каталитического центра в их осуществлении. Эти данные служат также аргументом в пользу представления о том, что сульфгидрильные группы, не подвергающиеся окислению в присутствии ДТТ, находятся в активном центре или близости от него.

Предварительные эксперименты с высокоочищенными и гомогенными препаратами ФДЭ, проведенные нами в плане изучения олигомерной структуры фермента, позволяют предположить, что в отсутствие ДТТ происходит ассоциация субъединиц или конформационные изменения молекулы ферментного белка, что сопровождается экранированием центра высокого сродства к сGMP. Иными словами, фермент в этом состоянии обладает пониженным сродством к сGMP. При этом может возникать кооперативное взаимодействие двух других каталитических центров, один из которых специфичен к сGMP ( $K_m = 25$  мкМ), а другой не обладает специфичностью в отношении субстратов и способен гидролизовать как сAMP, так и сGMP. При полном насыщении этого центра либо сAMP, либо сGMP положительная кооперативность устраняется; при этом можно наблюдать «работу» лишь одного центра ( $K_m = 25$  мкМ). В сущности, влияние сAMP на усиление гидролиза сGMP выражается в снятии положительной кооперативности и приобретении ферментом полной каталитической активности.

Резкое увеличение каталитической активности ФДЭ сGMP достигается также в присутствии добавленных тиолов, которые, вероятно, индуцируют изменения олигомерной структуры фермента, вызывающие нарушение связи между каталитическими центрами и реактивацию ранее экранированного центра высокого сродства к сGMP.

Итак, наличие спадов активности ФДЭ сGMP при концентрации субстрата 3 мкМ, выявленных с помощью НОХ во фракциях 35—43 и 75—82 (рис. 1, а), может быть объяснено экранированием центра высокого сродства к сGMP ( $K_m = 2$  мкМ) вследствие ассоциации моле-

кул ФДЭ в отсутствие ДТТ, которая наиболее выражена при повышенной концентрации ферментного белка (в пиках ферментативной активности). Эти спады в совокупности с выходящим во фракциях 55—65 пиком ФДЭ, проявляющим большую специфичность к сGMP, создают характерный профиль элюции ФДЭ сGMP с тремя пиками активности фермента. Подтверждением этому служат также результаты наших экспериментов, в которых подавление активности ФДЭ сGMP II (фракция 60) наблюдалось в присутствии фракций пиков активности ФДЭ сAMP I или ФДЭ сAMP II, сконцентрированных в ~ 10 раз (рис. 5).

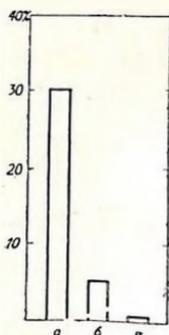


Рис. 5. Активность ФДЭ сGMP (в %), выделенной в отсутствие ДТТ, во фракции № 60 в контроле (а) и в присутствии фракций пика ФДЭ сAMP I (б) или фракций пика ФДЭ сAMP II (в), сконцентрированных в 10 раз. Концентрация субстрата 3 мкМ

Способность сAMP активировать гидролиз сGMP в указанных условиях создала весьма благоприятную возможность для изучения действия конкурентных ингибиторов ФДЭ. Было обнаружено, что теofilлин—широко известный ингибитор ФДЭ циклических нуклеотидов [10, 11]—в концентрациях  $5 \cdot 10^{-4}$ — $10^{-2}$  М значительно активирует ФДЭ сGMP в отсутствие ДТТ. Внесение ДТТ в инкубационную смесь приводило к превращению активирующего эффекта теofilлина в ингибирующий (рис. 6, а, б). При добавлении тиоловых соединений увеличивается чувствительность ФДЭ сGMP к активации как сAMP, так и теofilлином (рис. 6, б). Длительность этого переходного процесса при добавлении 10 мМ ДТТ измеряется часами. Аналогичным действием обладали и другие известные ингибиторы ФДЭ—кофеин и папаверин. По способности активировать ФДЭ исследованные соединения можно расположить в ряд: сAMP > папаверин > теofilлин > кофеин.

Как и следовало ожидать, указанные ингибиторы подавляли активность ФДЭ сAMP как в отсутствие, так и в присутствии ДТТ (рис. 6, в, г). Эти данные также подтверждают неравнозначность активных центров по отношению к гидролизу сAMP и сGMP.

Недавно было обнаружено активирующее действие 1-метил-3-изобутилксантина на циклоуклеотидзависимую ФДЭ сAMP из печени крыс [12]. Однако авторы указывают, что данный эффект специфичен лишь для этой формы ФДЭ и не проявляется в отношении КМ-зави-

симой ФДЭ из мозга быка. Кроме того, активация метилксантинами не была выявлена при использовании сGMP в качестве субстрата. Сообщалось также об активирующем действии метилксантинов на ассоциацию сGMP со специфичными к этому нуклеотиду некаталитическими связывающими участками ФДЭ ряда тканей; гидролиз сGMP при этом ингибировался [13—15].

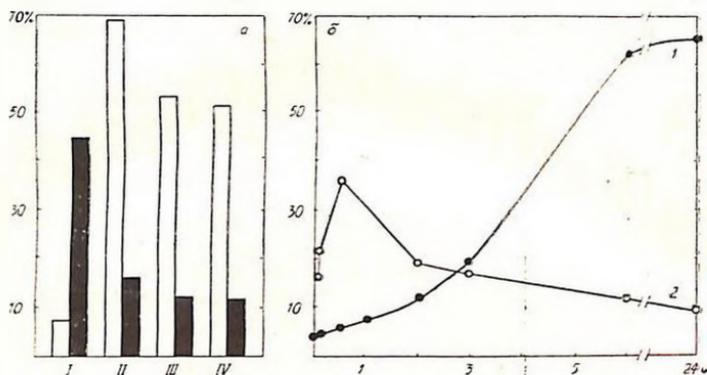


Рис. 6. а—активность ФДЭ сGMP (I, II) и сАМР (III, IV) во фракции № 44 (в %) в отсутствие (I, III) или в присутствии (II, IV) 10 мМ ДТТ в контроле (□) и при добавлении теофиллина (10 мМ) (■). Концентрация субстратов 3 мкМ; б—изменение активности ФДЭ сGMP (в %), выделенной в отсутствие ДТТ, в контроле (1) и в присутствии 10 мМ теофиллина (2) после добавления ДТТ (10 мМ). По оси абсцисс—время, прошедшее с момента добавления в пробу ДТТ

В данной работе впервые продемонстрированы условия, в которых наблюдается активация КМ-зависимой ФДЭ сGMP из гипоталамуса быка *in vitro* под действием метилксантинов, папаверина и сАМР. На основании приведенных данных можно сделать заключение о приобретении ферментом в отсутствие ДТТ нового качества, вероятно, обеспечивающего его способность подвергаться регуляторному влиянию тех или иных факторов. Можно предположить, что обнаруженные особенности субстратной специфичности ФДЭ являются естественным свойством фермента, которое теряется в процессе его выделения в присутствии ДТТ.

Предложенная выше кинетическая модель взаимодействия активных центров не является единственно возможной. Нельзя исключить участие в рассматриваемых процессах каких-либо отличных от ФДЭ белков или других факторов, сопутствующих ФДЭ в процессе ее выделения, однако, исходя из полученных нами результатов, приведенная выше интерпретация представляется наиболее вероятной. Выявленные свойства ФДЭ позволяют пролить свет на часто наблюдаемые реципрокные изменения уровней циклических нуклеотидов при различных патологических состояниях. Можно предположить, что в

условиях *in vivo* также эндогенные факторы, как ипстенин, глутатион и др., а также некоторые ферменты, в частности оксидоредуктазы, могут оказывать влияние на структурно-функциональное состояние ФДЭ в различных системах.

Применение таких фармакологических агентов, как теофиллин, кофеин, теобромин, трентал, папаверин, но-шпа и т. д. обычно тормозит гидролиз обоих циклических нуклеотидов. Выявленная нами противоположная направленность действия ингибиторов ФДЭ на гидролиз сАМР и сGMP в определенных условиях позволяет надеяться на возможность их использования для специфичной регуляции некоторых функций организма.

## METHYLXANTHINIS AND PAPAVERINE ACTIVATE PHOSPHODIESTERASE OF cGMP

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

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

Several peaks of soluble PDE of cyclic nucleotides from bovine hypothalamus that have been isolated by ion-exchange chromatography differ in substrate specificity, kinetic characteristics and regulatory properties.

It's of special interest that calmodulin activated cGMP PDE is activated by cAMP (1—200  $\mu$ M) in the absence of thiol-reducing agents with concomitant drop in the sensitivity to calmodulin. Under these conditions theophylline ( $10^{-4}$ — $10^{-3}$  M)—a competitive inhibitor of cyclic nucleotides PDE—also activates cGMP hydrolysis. Caffeine and papaverin exert analogous effect. Treatment of PDE by thiol reagents (DTT or 2-mercaptoethanol) restores its sensitivity to calmodulin as well as to cAMP and theophylline.

Data obtained make it possible to reconsider conventional classification of multiple forms of PDE of cyclic nucleotides.

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Cheung W. Y. Science, v. 207, p. 19—27, 1980.
2. Cheung W. Y., Lynch T. J., Wallace R. W., Tallant E. A. J. Biol. Chem., v. 256, p. 4439—4443, 1981.
3. Дудкин С. М., Агагарова М. Б. Циклические нуклеотиды. Тезисы докл. IV Всесоюз. симпозиума, с. 54—55, Минск, 1982.
4. Gurvitz B. Ya., Galoyan A. A. 16th Meeting of FEBS, Abstr., XXII—050, Moscow, p. 448, 1984.
5. Tucker M. M., Robinson J. B., Stellwagen E. J. Biol. Chem., v. 256, p. 905—958, 1981.
6. Этингоф Р. Н., Думлер Н. Л. Укр. биохим. журн., т. 53, с. 28—43, 1981.
7. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. I., Randall R. L. J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
8. Галоян А. А., Гурацц Б. Я. Вест. Акад. мед. наук СССР, т. 9, с. 64—69, 1982.

9. Галоян А. А., Гурвиц Б. Я., Шарова Н. П. Нейрохимия, т. 4, с. 56—60, 1985.
10. Sutherland E. W., Rall T. W. J. Biol. Chem., v. 232, p. 1077—1091, 1958.
11. Beavo J. A., Rogers N. L., Crofford O. B., Hardman J. G., Sutherland E. W., Newman E. V. Mol. Pharmacol., v. 6, p. 597--503, 1970
12. Erneux C., Couchie D., Dumont J. E., Jastorff B.—In: Advances in Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Research (eds. S. J. Strada, W. J. Thompson), v. 16, p. 107—118, Raven Press, N. Y. 1984.
13. Coquil J.—F., Franks D. J., Wells J. N., Dupuis M., Hamet P. Biochim. et biophys. acta, v. 631, p. 148—165, 1980.
14. Francis S. H., Lincoln T. M., Corbin J. D. J. Biol. Chem., v. 255, p. 620—626, 1980.
15. Yamazaki A., Sen J., Bitensky M. W., Casnellie J. E., Greengard P. J. Biol. Chem., v. 255, p. 11619—11624, 1980.

Поступила 17. XI 1985



УДК 591.543.42+612.822.1

## БЕЛКИ И РНК В СИСТЕМЕ НЕЙРОН-НЕЙРОГЛИЯ СУПРАОПТИЧЕСКОГО ЯДРА ГИПОТАЛАМУСА ГОЛОВНОГО МОЗГА СУСЛИКА В ДИНАМИКЕ ЗИМНЕЙ СПЯЧКИ

ДЕМИН Н. Н., \*ШОРТАНОВА Т. Х., \*ГОЛОВИНА Т. Н., РУБИНСКАЯ Н. Л.

Лаборатория функциональной нейрохимии Института физиологии им. И. П. Павлова АН СССР, Ленинград; \*Кафедра биохимии Кабардино-Балкарского государственного университета, Нальчик

В цитоплазме нейронов супраоптического ядра гипоталамуса сусликов в период глубокой зимней спячки (в декабре) выявлено значительное снижение концентрации белков и особенно их содержания в расчете на одну клетку. В глиальных клетках-сателлитах в декабре концентрация белков была такой же, как у контрольных, не впадавших в это время в спячку животных, а абсолютное содержание белков несколько снижалось. В цитоплазме нейронов количество РНК снижалось параллельно изменению количества белков; уменьшалось оно и в глиоцитах. Незадолго до пробуждения (в марте) концентрация белков в цитоплазме нейронов падала еще ниже при неизменной величине уменьшения абсолютного содержания белков; была сниженной в это время и концентрация белков в глиоцитах. Содержание РНК на 1 клетку в цитоплазме нейронов в марте немного возросло при стабильно сниженной их концентрации. В глиоцитах в марте содержание РНК на одну клетку достигало августовского уровня при оставшейся немного пониженной их концентрации.

Зимняя спячка (естественный гипобноз) у ряда теплокровных животных в противоположность холодному оцепенению низших и искусственной гипотермии высших (включая человека), является состоянием, характеризующимся весьма эффективной терморегуляцией на определенном сниженном уровне. Согласно удачному определению Тимофеева [1], гипобноз—это «устойчивое функциональное состояние сниженной жизнедеятельности и обязательно со стабилизированным теплообменным гомеостазом». В то же время, благодаря определенным нейроэндокринным механизмам в соответствии с генетически закрепленным цирканнуальным ритмом, зимоспящие животные обладают способностью в надлежащее время спонтанно самосогреваться и выходить из состояния гибернации [2, 3].

Детальное изучение динамики зимней спячки привлекает все большее внимание не только с общепсихологической точки зрения, но и учитывая практическое значение такого стабильного обратимого есте-

ственного состояния с глубоким торможением метаболических процессов. Однако именно в нейрехимическом отношении зимняя спячка еще мало изучена, имеются лишь фрагментарные данные, в частности в области белково-нуклеинового метаболизма в различных структурах головного мозга [4]. При этом особый интерес вызывает его стволовая часть.

Ранее нами была дана количественная характеристика белков и РНК в нейронах и их глиальных клетках-сателлитах дорзального ядра шва при зимней спячке [5]. Эта серотонинергическая структура привлекала внимание, поскольку ее активность играет особо важную роль в механизмах как естественного сна [6], так и зимней спячки [3, 7]. Казалось желательным для сопоставления именно у тех же самых подопытных животных провести подобное исследование клеток супраоптического ядра (СОЯ) гипоталамуса, нейросекреторной структуры, белково-нуклеиновый метаболизм которой значительно активируется при действии стрессорных факторов, существенно блокируемого при гибернации с ее выраженной сенсорной депривацией. Результаты такого исследования и изложены в настоящей статье. Некоторые из полученных данных были опубликованы ранее в предварительных сообщениях [8, 9].

### Материалы и методы

Опыты проводили на малых кавказских сусликах (*Citellus pygmaeus* Pall.). Животные были отловлены в августе в районе Чегемского ущелья Кабардино-Балкарской АССР на высоте 500—600 м над уровнем моря. Результаты, полученные при исследовании проб, взятых сразу после отлова у группы таких сусликов, служили общим контролем как летние данные ( $K_1$ ). Позднее, при содержании группы животных при 4—10° (температуре, близкой в то время к наружной), в естественные сроки (в середине октября) эти животные впадали в спячку. Часть контрольных сусликов, оставленных в виварии при 21° и не впадавших в связи с этим в спячку, исследовали одновременно со спавшими в декабре ( $K_2$ ), а другую часть—в марте ( $K_3$ ). Ректальная температура у этих контрольных животных составляла 36—37°, тогда как у сусликов, находящихся в эти сроки в состоянии зимней спячки—4—6°. В декабре имел место период глубокой зимней спячки, а в марте уже наступал период подготовки к пробуждению. В эти сроки соответствующих контрольных и спавших сусликов быстро декапитировали.

Небольшие кусочки мозга, включавшие гипоталамус, фиксировали в течение 1,5 ч в фиксаторе Бродского, затем обезживали по общепринятой схеме и заливали в парафин. Срезы участков, в которых находилось СОЯ (толщиной 6—8 мкм), окрашивали галлоцанином—хромовыми квасцами для выявления нуклеиновых кислот или амидо-черным 10 Б для выявления общих белков. Концентрацию этих компонентов отдельно в нейронах (в их цитоплазме) и в их глиальных клетках-сателлитах (в клетках целиком) СОЯ определяли цитоспектрофотометрически. Для этого оптическую плотность объектов исследования измеряли на МУФ-5 при длинах волн 585 нм для нуклеиновых кислот и 620 нм для белков. Абсолютное содержание данных компонентов на одну клетку рассчитывали как произведение величины оптической плотности на величину определяемого в этих целях объема цитоплазмы нейронов или целого глиоцита и выражали в относительных единицах [10, 11]. На срезах проб мозга в клетках СОЯ каждого из 5—6 входивших в одну группу животных исследовали по 20 клеток. Так как содержание ДНК в отдельных клетках постоян-

но, то все изменения количества нуклеиновых кислот относили за счет РНК. Статистический анализ полученных данных проводили по Стьюденту-Фишеру. Исследования клеток СОЯ проводили в головном мозгу тех же сусликов, у которых, как было уже указано, исследовали клетки дорзального ядра шва [5].

### Результаты и обсуждение

Как показали проведенные нами исследования, величины концентрации и содержания на одну клетку белков и нуклеиновых кислот в цитоплазме нейронов и в глиоцитах СОЯ животных групп  $K_2$  и  $K_3$  отличаются от величины  $K_1$ . Полученные средние величины концентрации и содержания на 1 клетку белков и нуклеиновых кислот представлены в табл. 1, а результаты определений соответствующих величин объема — в табл. 2. (см. ниже). В декабре у не спавших в это время сусликов содержание на 1 клетку белков в цитоплазме нейронов СОЯ заметно снижалось по сравнению с  $K_1$ , но благодаря сокращению объема цитоплазмы концентрация белков уменьшалась не так выражено (табл. 1). В марте при таком же снижении concentra-

Таблица 1

Концентрация и содержание на 1 клетку белков и нуклеиновых кислот в цитоплазме нейронов и в их глиальных клетках-спутниках супраоптического ядра гипоталамуса головного мозга сусликов, невапавших в зимнюю спячку в декабре-марте (в усл. ед.)

Время исследования	Концентрация	Содержание	Концентрация	Содержание
<b>Цитоплазма нейронов</b>				
	<b>Белки</b>		<b>Нуклеиновые кислоты</b>	
Август ( $K_1$ )	$0,79 \pm 0,01$	$639 \pm 21$	$0,41 \pm 0,01$	$332 \pm 12$
Декабрь ( $K_2$ )	$0,73 \pm 0,01$	$545 \pm 18$	$0,41 \pm 0,01$	$306 \pm 11$
% к $K_1$	$-8\%$ , $p < 0,01$	$-15\%$ , $p < 0,001$	$\pm 0\%$	$-8\%$ , $p > 0,05$
Март ( $K_3$ )	$0,73 \pm 0,01$	$588 \pm 18$	$0,41 \pm 0,01$	$330 \pm 10$
% к $K_1$	$-8\%$ , $p > 0,05$	$-8\%$ , $p > 0,05$	$\pm 0\%$	$\pm 0\%$
<b>Глиоциты</b>				
Август ( $K_1$ )	$0,69 \pm 0,01$	$90 \pm 3$	$0,33 \pm 0,01$	$43 \pm 2$
Декабрь ( $K_2$ )	$0,58 \pm 0,01$	$74 \pm 3$	$0,35 \pm 0,01$	$45 \pm 2$
% к $K_1$	$-16\%$ , $p < 0,001$	$-17\%$ , $p < 0,001$	$+6\%$ , $p > 0,05$	$+4\%$ , $p > 0,05$
Март ( $K_3$ )	$0,57 \pm 0,01$	$68 \pm 2$	$0,35 \pm 0,01$	$42 \pm 2$
% к $K_1$	$-17\%$ , $p < 0,001$	$-24\%$ , $p < 0,001$	$+6\%$ , $p > 0,05$	$-3\%$ , $p > 0,05$

ции белков их содержание на 1 клетку в цитоплазме нейронов несколько повышалась, и его отличие от августовских данных ( $K_1$ ) становилось уже недостоверным. В то же время в глиоцитах сниженное в декабре содержание белков в марте падало еще больше. Как в декабре, так и в марте в глиоцитах уменьшалась и концентрация белков. Что же касается РНК, то и в декабре, и в марте как их концентрация, так и абсолютное содержание не изменились по сравнению с летними данными и в нейронах, и в глиоцитах.

Тем не менее у бодрствовавших в декабре и марте сусликов проявился ряд отличий по сравнению с августовскими данными, причем они касались количества белков в клетках СОЯ—распад белков превалировал над их синтезом при стабильности количественных характеристик РНК. При этом данные, установленные в тот период, когда в естественных условиях суслики, находящиеся в зимней спячке, готовятся к выходу из нее (в марте), практически не отличались от найденных в декабре, когда суслики в обычных условиях их существования находятся в глубокой зимней спячке.

Есть основания полагать, что сниженные величины абсолютного содержания (на 1 клетку), а также и концентрации белков (особенно в глиальных клетках-сателлитах) при нормальных количественных характеристиках РНК могут свидетельствовать [12] об определенном подавлении метаболизма белков в нейронах СОЯ у бодрствовавших сусликов в тот период, когда в естественных условиях они должны были бы находиться в состоянии зимней спячки.

Средние данные о содержании на 1 клетку и концентрации белков и РНК в цитоплазме нейронов СОЯ и в их глиальных клетках-сателлитах в динамике развития зимней спячки у сусликов в процентах от контрольных величин ( $K_1$ ,  $K_2$  и  $K_3$ ) приведены на рис. 1.

Эти данные показывают, что в период глубокой спячки (в декабре) значительно снижалось абсолютное содержание белков в цитоплазме нейронов как по отношению к августовским данным ( $K_1$ ), так и по сравнению с декабрьским контролем ( $K_2$ ); концентрация белков снижалась в меньшей степени (из-за одновременного сокращения объема цитоплазмы). В глиоцитах же в декабре также было отмечено выраженное снижение абсолютного содержания белков по сравнению с  $K_1$ , но достигавшее лишь предела достоверности по сравнению с  $K_2$ ; по концентрации белков глиоциты в декабре не отличались от  $K_2$ .

В период, предшествующий выходу из спячки (в марте), содержание белков на 1 клетку в цитоплазме нейронов продолжало оставаться на том же низком уровне, что и в декабре, на фоне существенного дополнительного падения их концентрации. Приблизительно такую же картину наблюдали и в глиоцитах.

В декабре в нейронах были установлены количественные изменения РНК, практически полностью аналогичные описанным для белков. В марте же происходило некоторое повышение содержания РНК на 1 клетку, а концентрация РНК дополнительно не падала вместе с концентрацией белков, оставаясь на уровне декабрьских величин. В глиоцитах в декабре снижалось не только абсолютное содержание РНК (приблизительно на столько же, как и в нейронах), но и их концентрация (по сравнению с  $K_2$ , и с  $K_1$ ). В марте при относительной стабильности сниженной величины концентрации РНК абсолютное их содержание, возрастая, практически достигало контрольных величин ( $K_1$  и  $K_3$ ).

Итак, в период глубокой зимней спячки резкое падение абсолютного содержания как белков, так и РНК в цитоплазме нейронов СОЯ четко коррелировало с близкими по величине изменениями количественных характеристик РНК также и в глиоцитах, но на фоне близких к соответствующему контролю ( $K_2$ ) количественных величин белков в последних. Такие отношения в системе нейрон—нейроглия могут указывать на выраженное угнетение белково-нуклеинового метаболизма в нейронах, несмотря на поддержание достаточно высокой

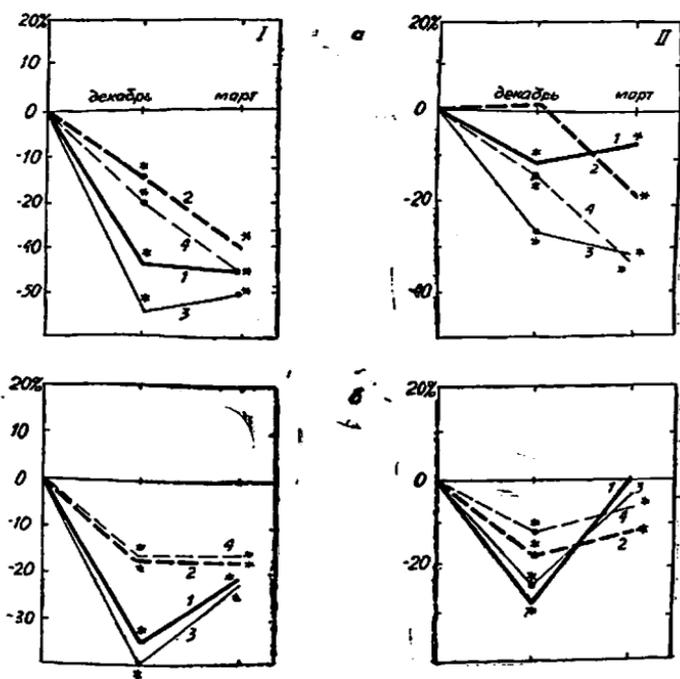


Рис. 1. Содержание на 1 клетку (1 и 3) и концентрация (2 и 4) белков (а) и РНК (б) в цитоплазме нейронов (I) и в их глиальных клетках-сателлитах (II) супраоптического ядра гипоталамуса головного мозга в динамике зимней спячки у сусликов. По оси абсцисс—время исследования—декабрь (XII) и март (III); по оси ординат—% от величины у контрольных животных в августе (3 и 4) и, соответственно, в декабре и в марте (1 и 2)

концентрации белков в глиальных клетках-сателлитах. В свою очередь, это может быть связано с торможением функциональной активности нейронов СОЯ при глубокой зимней спячке. В мартовский же период подготовки к выходу из спячки на фоне все еще сниженного абсолютного содержания белков в цитоплазме нейронов и уменьшенной их концентрации в глиоцитах уже происходило накопление РНК в нейронах, и особенно в глиоцитах. Только это последнее явление и может служить показателем подготовки к нормализации белково-ну-

кленового метаболизма СОЯ для выполнения его высокой нейросекреторной активности в условиях действия многих стрессорных факторов вслед за выходом животных из состояния зимней спячки.

Полученные нами данные, касающиеся содержания РНК в цитоплазме нейронов СОЯ на 1 клетку при зимней спячке у сусликов, частично согласуются с результатами работы Семешинной и Певзнера [13], в частности с констатацией значительного его снижения в декабре в процентах от  $K_2$  в нашей работе и в процентах от средней годовой величины в работе указанных авторов. Но нами не было установлено столь большого подъема (выше средней годовой величины) содержания РНК в марте, который, как указано в вышеприведенном исследовании, наблюдали в апреле [13]. Главное, в наших экспериментах не был подтвержден факт резкого подъема (приблизительно на 80% выше средней величины) содержания РНК в глиоцитах в декабре. Чем объясняется такое значительное расхождение результатов, предположить трудно—это вряд ли может быть связано с различными контролями, а также и с видовыми различиями исследованных сусликов (*Citellus erythrogenus* в опытах Семешинной и Певзнера и *Citellus pygmaeus*—в наших).

Системы нейрон-нейроглия СОЯ по заторможенности белково-нуклеинового метаболизма в них в динамике зимней спячки значительно отличаются по тем же показателям от дорзального ядра шва [5]. В последнем в период глубокой спячки в нейронах и глиоцитах снижались величины абсолютного содержания и концентрации лишь белков, тогда как эти количественные показатели РНК в нейронах оставались на уровне контрольных данных (как  $K_1$ , так и  $K_2$ ), а в глиоцитах в это время концентрация и абсолютное содержание РНК даже существенно превышали контрольные величины. В марте же в цитоплазме нейронов дорзального ядра шва происходило такое накопление белков и особенно РНК, что соответствующие величины становились значительно выше контрольных; тогда как в глиоцитах концентрация и абсолютное содержание РНК нормализовались. Накопление РНК в цитоплазме нейронов в это время, возможно, шло за счет РНК, предварительно накопленных в глиоцитах.

Эти нейрохимические данные отчетливо подчеркивают глубокие различия в функциональной активности СОЯ гипоталамуса и дорзального ядра шва при зимней спячке. Роль последнего, видимо, действительно активна при этом состоянии, тогда как роль СОЯ именно в цитохимическом отношении более пассивна—метаболизм белков в его нейронах явно заторможен.

В табл. 2 сведены средние результаты определений величины объема цитоплазмы нейронов и цельных глиоцитов СОЯ у бодрствовавших сусликов в августе, декабре и марте и у животных при зимней спячке в последние два срока, а также результаты определений объема и клеточных ядер исследованных нейронов. Величины объема цитоплазмы нейронов и объема глиоцитов были необходимы для вычисле-

ния содержания белков и РНК на 1 клетку. Но кроме этого, результаты определения объема цитоплазмы нейронов и их ядер в отдельности вызывают и некоторый самостоятельный интерес. Сдвиги объема клеток в целом и их морфологических составных частей могут служить одним из механизмов регуляции концентрации в них биохимических компонентов, а тем самым и интенсивности тех биохимических процессов, в которых они принимают участие.

Таблица 2

Величина объемов клеточных ядер и цитоплазмы нейронов, а также цельных глионтов супраоптического ядра гипоталамуса головного мозга сусликов при бодрствовании в августе, декабре и марте и при зимней спячке (в декабре и марте), мкм<sup>3</sup>

Время исследования	Нейроны		Глионты
	ядра	цитоплазма	
При бодрствовании:			
Август (K <sub>1</sub> )	176±9,0	809±28,0	130±4,0
Декабрь (K <sub>2</sub> )	178±10,0	747±25,0	128±4,0
% к K <sub>1</sub>	+1%, p>0,05	-8%, p>0,05	-2%, p>0,05
Март (K <sub>3</sub> )	298±17,0	805±21,0	119±3,0
% к K <sub>1</sub>	+69%, p<0,001	±0%	-8%, p>0,05
При зимней спячке:			
Декабрь	175±9,0	582±25,0	112±3,0
% к K <sub>1</sub>	-1%, p>0,05	-28%, p<0,001	-14%, p<0,001
% к K <sub>2</sub>	-2%, p>0,05	-22%, p<0,001	-12%, p<0,01
Март	299±18,0	748±24,0	135±3,0
% к K <sub>1</sub>	+70%, p<0,001	-7%, p>0,05	+4%, p>0,05
% к K <sub>3</sub>	±0%	-8%, p>0,05	+12%, p<0,01

Данные, приведенные в табл. 2, показывают, что величины объема как цитоплазмы, так и ядер нейронов в декабре у контрольных сусликов, избежавших зимней спячки в это время (K<sub>2</sub>), практически не отличались от летних данных (K<sub>1</sub>). Но обращает на себя внимание чрезвычайно резкое повышение объема ядер нейронов у контрольных не спавших в марте животных (K<sub>3</sub>) при фактически полном совпадении величин объема цитоплазмы в этот период с величинами K<sub>1</sub>. Объем глиальных клеток-сателлитов у контрольных животных (K<sub>2</sub> и K<sub>3</sub>) как в декабре, так и в марте, не отличался от августовских данных (K<sub>1</sub>).

Глубокая зимняя спячка у сусликов в декабре сопровождалась существенным сокращением объема цитоплазмы нейронов по сравнению как с величиной K<sub>1</sub>, так и K<sub>2</sub>. тогда как объем ядер нейронов в это время не отличался от K<sub>1</sub>. Вызывает интерес тот факт, что при отсутствии достоверных отклонений величины объема цитоплазмы нейронов в марте по сравнению и с мартовским (K<sub>3</sub>), и с августовским (K<sub>1</sub>) контролями величина объема ядер нейронов при зимней спячке в марте оказалась увеличенной по сравнению с K<sub>1</sub> ровно на столь же большую величину (70%), как и объем ядер у соответствующих контрольных, не спавших в это время сусликов (K<sub>3</sub>). Следовательно, при

этом проявилось ведущее значение именно сезонного цикла—величина объема ядер нейронов СОЯ незадолго до пробуждения животных одинаково резко повышалась как при нормотермии и других проявлениях активной жизнедеятельности, так и у сусликов, находившихся еще в состоянии зимней спячки со значительно сниженной температурой тела. Объем глинцинтов при зимней спячке в декабре был ниже соответствующих контролей ( $K_1$  и  $K_2$ ), но в марте уже не отличался от  $K_1$  и превышал мартовский контроль ( $K_3$ ).

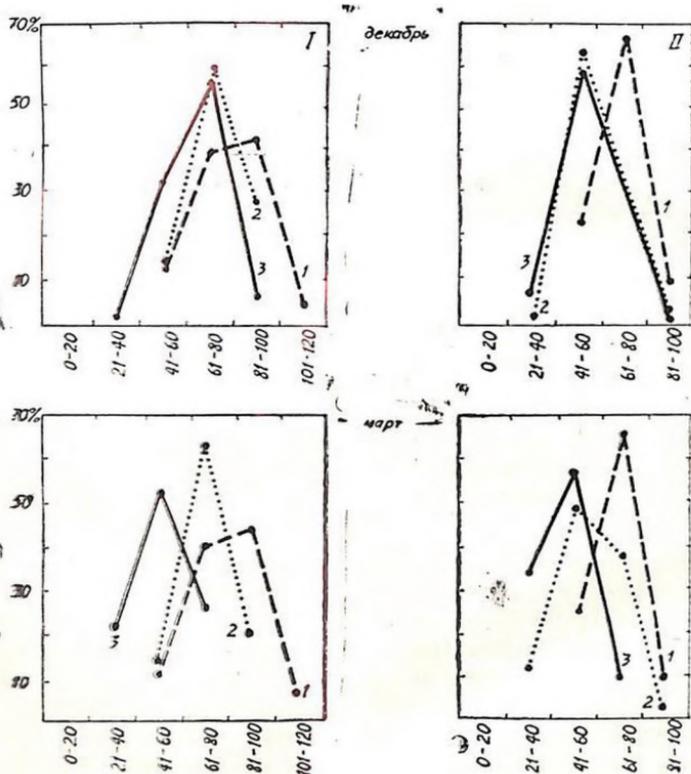


Рис. 2. Вариационные кривые величины концентрации (оптической плотности) белков в цитоплазме нейронов (I) и в их глиальных клетках-сателлитах (II) супраоптического ядра гипоталамуса головного мозга сусликов при бодрствовании в августе (1), в декабре и в марте (2) и при зимней спячке в декабре и марте (3). По оси абсцисс—концентрация в усл. ед.; по оси ординат—число клеток в % от общего числа исследованных клеток, принятого за 100

Определения объема ядер нейронов СОЯ при зимней спячке сусликов (*Citellus erithrogenys*) в связи с изучением сезонной динамики состояния их гипоталамо-гипофизарной нейросекреторной системы были ранее произведены Юрисовой [14]. Согласно данным этого автора,

при глубокой спячке в декабре объем ядер был ниже по сравнению с августовскими величинами приблизительно на 20%. Позднее он начинал повышаться, достигая в марте максимальной величины, приблизительно на 30% превышавшей установленную в августе. Таким образом, результаты определений величины объемов клеточных ядер СОЯ в нашей работе совпадают с приведенными данными в отношении на-

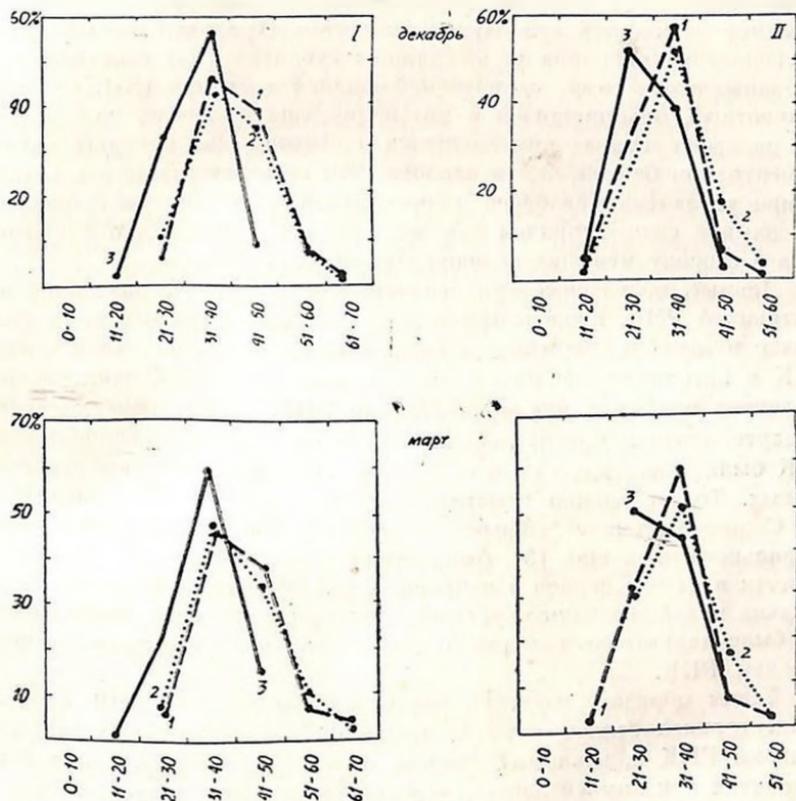


Рис. 3. Вариационные кривые величины концентрации (оптической плотности) нуклеиновых кислот в цитоплазме нейронов (I) и в их глиальных клетках-сателлитах (II) супраоптического ядра гипоталамуса головного мозга сусликов при бодрствовании в августе (1), в декабре и в марте (2) и при зимней спячке в декабре и в марте (3). По оси абсцисс—концентрация в усл. ед.; по оси ординат число клеток в % от общего числа исследованных клеток, принятого за 100.

правленности сдвигов при спячке от декабря до марта. Следует, однако, отметить, что проведенные нами исследования не подтвердили описанного в цитируемой работе уменьшения объема ядер в декабре.

Привлекают также внимание и данные о соотношениях между числом клеток (нейронов и глиоцитов) с различной концентрацией

белков и РНК в условиях наших опытов. Данные, полученные при исследовании распределения клеток по концентрации белков, приведены на рис. 2. Можно видеть, что период глубокой спячки сопровождался заметным уменьшением разброса нейронов с разной концентрацией белков в их цитоплазме, характеризуюсь отчетливым пиком, смещенным в сторону с меньшей концентрацией. При этом кривая распределения напоминала таковую у контрольных животных в декабре. То же самое наблюдали и в случае глиоцитов. В марте же пик кривой распределения нейронов у не спавших сусликов ( $K_2$ ) был близок по расположению к тому, который наблюдался в августе ( $K_1$ ), тогда как у животных, находившихся в это время еще в спячке, при увеличении разброса данных пик смещался в сторону еще меньших величин концентрации белков, чем в декабре. Что касается глиоцитов в марте, то при увеличении разброса данных в контроле он увеличивался и при зимней спячке, причем так же, как и в нейронах, со смещением пика в сторону меньших величин концентрации белков.

Данные, полученные при подсчете числа клеток с различной концентрацией РНК, приведены на рис. 3. Оказалось, что при глубокой спячке в декабре уменьшался также разброс величин концентрации РНК в цитоплазме нейронов, но при меньшем сдвиге пика влево. В глиоцитах при этом пик концентрации РНК также сдвигался влево. В марте картина распределения нейронов с разной концентрацией РНК была такой же, как и в декабре, но с еще меньшим разбросом данных. То же можно отметить и в отношении глиоцитов.

Соответствующие данные, полученные при исследовании клеток дорзального ядра шва [5], были существенно иными: пик мартовских величин в случае белков в нейронах даже превышал величину  $K_1$  при близких к ней величинах, установленных при изучении глиоцитов. То же было характерным и для распределения клеток с разной концентрацией РНК.

Таким образом, изучение распределения клеток СОЯ с разной концентрацией белков и РНК, также указывает на угнетение метаболизма РНК и, главным образом, белков как в нейронах, так и в глиоцитах при зимней спячке, особенно в периоде, близком к выходу из нее.

## PROTEINS AND RNA IN THE SUPRAOPTIC NUCLEUS SYSTEM NEURON-NEUROGLIA IN GROUND SQUIRRELS DURING HYBERNATION

DOEMIN N. N., SHORTANOVA T. Kh., GOLOVINA T. N.,  
RUBINSKAYA N. L.

Laboratory of Functional Neurochemistry, I. P. Pavlov Institute of Physiology,  
USSR Academy of Sciences, Leningrad; Chair of Biochemistry,  
Kabardino-Balkarsk State University, Nalchik

Protein concentration and protein amount per cell decreased drastically in the cytoplasm of n. supraopticus neurons at the peak of hi-

bernation—in December; in glial cells-satellites protein concentration did not change, the protein amount per cell being a bit diminished. The RNA amount per cell diminished in neuron cytoplasm as well as in gliocytes. On the eve of waking (in March) protein concentration in neurons diminished some more, the amount of protein per cell remaining unaltered; protein concentration in gliocytes dropped as well. The RNA amount per cell increased a bit in neurons in March, its concentration remaining at low level; in gliocytes in March RNA amount per cell nearly reached the August level, its concentration being a little low.

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Тимофеев Н. Н. Искусственный гипобиоз, М., Медицина, 1983.
2. Механизмы сезонных ритмов кортикостероидной регуляции зимоспящих (под ред. М. Г. Колпакова), Новосибирск. Наука, 1974.
3. Механизмы зимней спячки млекопитающих (под ред. Ю. Ф. Пастухова и С. Р. Чаплыгина), Владивосток, ДВНЦ АН СССР, 1977.
4. Эмирбеков Э. Э., Львова С. П. Нейрохимия, т. 3, с. 306—317, 1984.
5. Головина Т. Н., Мадиков У. М., Шортанова Т. Х., Демин Н. Н. Физiol. журн. СССР, т. 71, с. 945—951, 1985.
6. Jouvet M. Erg. Physiol., В. 64, S. 166—307, 1972.
7. Попова Н. К., Науменко Е. В., Колпаков В. Г. Серотонин и поведение, Новосибирск, Наука, 1978.
8. Карманова И. Г., Попова Д. И., Рубинская Н. Л., Хомуецкая О. Е., Шортанова Т. Х., Головина Т. Н. Докл. АН СССР, т. 278, с. 495—497, 1984.
9. Головина Т. Н., Мадиков У. М., Рубинская Н. Л. Нейрохимия, т. 4, с. 185—189, 1985.
10. Бродский В. Я. Трофика клетки, М., Наука, 1966.
11. Демин Н. Н., Козак А. Б., Моисеева Н. И. Нейрофизиология и нейрохимия сна, Л., Наука, 1978.
12. Певзнер Л. З. Функциональная биохимия нейроглии, Л., Наука, 1972.
13. Семешина Т. М., Певзнер Л. З. Цитология, т. 17, с. 354—358, 1975.
14. Юрисова М. Н.—В кн.: Зимняя спячка и сезонные ритмы физиологических функций, Новосибирск, Наука, с. 8—27, 1971.

Поступила 14. XI 1985



УДК 577.115.7.

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГАНГЛИОЗИДОВ С МЕДЬЮ

ТУМАШОВА С. Ю., НАЛБАНДЯН Р. М.

Физиологический институт им. А. А. Ухтомского ЛГУ им. А. А. Жданова, Ленинград  
Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Ганглиозиды из мозга свиньи и больного с диагнозом «болезнь Тея-Сакса» имеют два центра связывания меди, которые различаются по сродству. Методом ЭПР показано, что наблюдаются существенные изменения в сродстве к меди одного из этих центров в случае ганглиозидов из патологического мозга.

Значение меди для НС не исчерпывается ее важной ролью в функционировании окислительно-восстановительных ферментов, таких как цитохромоксидаза, супероксиддисмутаза, дофамин- $\beta$ -гидроксилаза. В последнее десятилетие из нервной ткани были выделены новые медьсодержащие белки (альбокупренин, нейрокупренин), роль которых пока не выяснена [1]. Эти белки не обнаружены в других животных тканях. Наличие специфических медьсодержащих белков дает основание предположить, что обмен меди в нервной ткани имеет свои особенности, для выяснения которых представляется необходимым изучение взаимодействия ионов меди с различными компонентами нервной ткани.

Как известно, гликолипиды, и в частности ганглиозиды, являются теми компонентами нервной ткани, которые во многом определяют поверхностные свойства клеток [2]. Поэтому изучение взаимодействия ионов меди с гликолипидами может представлять интерес для выяснения механизма транспорта меди между клетками. Кроме того, многие медьсодержащие белки и ферменты являются гликопротеидами. Значение их углеводной компоненты в связывании меди является проблематичным, и взаимодействие меди с различными углеводсодержащими компонентами клеток заслуживает также более подробного исследования. В данном сообщении мы приводим результаты изучения взаимодействия ионов меди с ганглиозидами.

## Материалы и методы

В работе использованы ганглиозиды, полученные из мозга свиньи и больного подростка с диагнозом «болезнь Тея-Сакса» [3]. Содержание индивидуальных ганглиозидов в препаратах из этих источников сравнено в табл. 1.

Ганглиозиды растворяли в деионизированной воде в концентрации 20—25 мг/мл, и эти растворы титровали  $10^{-2}$  М  $\text{Cu}^{+2}$ . После добавления аликвотов меди смесь инкубировали в течение 5—10 мин при комнатной температуре. Затем регистрировали сигналы ЭПР смесей, содержащих различные концентрации меди. Запись сигналов ЭПР проводили на приборе Е-4 («Varian», США) в кварцевых трубках с внутренним диаметром 4 мм. Условия регистрации сигналов были подобраны таким образом, чтобы избежать эффектов, связанных с насыщением образцов и «перемодуляцией» (мощность—10 мВт, амплитуда модуляции—6,3 гс). Частота микроволнового излучения составляла 9,37 ГГц, постоянная времени—0,3 с, температура—160°.

Оптические спектры растворов ганглиозидов и их комплексов с медью регистрировали на спектрофотометре М-26 («Bechman», Австрия) в кварцевых кюветках с длиной оптического пути 1 см. Спектры получены при комнатной температуре. Добавление меди к растворам ганглиозидов не приводило к появлению заметного помутнения.

### Результаты исследования

В отличие от гидратированной меди (раствор хлорида меди в воде), медь в присутствии ганглиозидов обнаруживает сигнал ЭПР аксиальной формы с выраженной сверхтонкой структурой в параллельной области спектра (низкие поля). Сигналы ЭПР гидратированной меди и меди в присутствии ганглиозидов сравнены на рис. 1. Уже непосредственно из сравнения форм наблюдающихся сигналов можно заключить, что ионы меди взаимодействуют с ганглиозидами, то есть образуют комплексы типа двухвалентная медь—ганглиозид, о чем свидетельствуют также оптические спектры. В присутствии ганглиозидов в оптическом спектре появляется широкая асимметричная полоса с максимумом вблизи 620—660 нм.

При более подробном рассмотрении спектров ЭПР смесей ганглиозиды—медь было выявлено, что число компонент сверхтонкой структуры в параллельной области спектров превышает 4. Если бы в этих смесях обнаруживался один тип комплексов меди с ганглиозидами, то наблюдалось бы только 4 линии, поскольку ядерный спин меди равен  $3/2$ . Как видно из низкочастотной части спектра, показанной на рис. 2, отчетливо наблюдаются 6—7 компоненты сверхтонкой структуры. Это означает, что в смесях медь—ганглиозиды образуются по меньшей мере 2 типа комплексов, различающихся по параметрам сигналов ЭПР (g-факторы, величины сверхтонких расщеплений, ширины линий). Характерно, что для ганглиозидов из мозга свиньи была получена аналогичная картина, свидетельствующая об образовании двух типов комплексов с медью.

Мы попытались определить стехиометрию образовавшихся комплексов, титруя растворы ганглиозидов медью и регистрируя изменения формы сигнала ЭПР, в частности в низкочастотной (параллельной) области. На рис. 3 приведены наблюдающиеся изменения формы линии крайней компоненты при увеличении концентрации меди в смеси. Эта компонента содержит два максимума, соотношение интенсивностей между которыми значительно изменяется с изменением концентрации меди. В исследованном диапазоне концентраций меди (от  $10^{-4}$  до

$10^{-3}$  М) соотношение между интенсивностями этих двух максимумов изменяется примерно в 3 раза, причем увеличивается интенсивность, главным образом, левого из этих двух максимумов, тогда как интенсивность правого практически не возрастает. Таким образом, правый максимум принадлежит комплексу меди с ганглиозидами, характеризующемуся более высоким сродством к меди, а левый максимум — комплексу со сравнительно низким сродством.

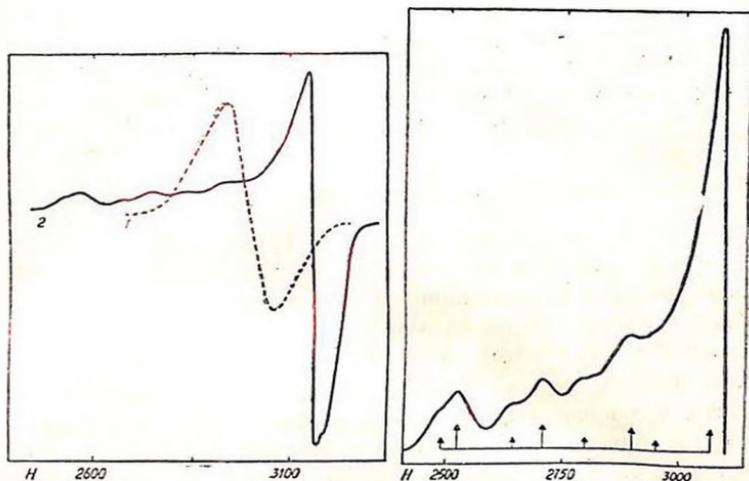


Рис. 1. Сравнение форм сигналов ЭПР гидратированной меди (1) и комплекса меди с ганглиозидами свиньи (2). Содержание меди  $2 \cdot 10^{-4}$  М.  
Рис. 2. Низкопольная область спектра ЭПР комплекса меди с ганглиозидами свиньи. Стрелки одинаковых размеров указывают на компоненты, принадлежащие одному и тому же типу комплекса меди.

Для комплекса с высоким сродством к меди удалось определить его стехиометрию. Если среднюю величину  $M_r$  ганглиозида принять за 1500, то этот комплекс соответствует примерно стехиометрии 1:1, то есть один атом меди связан с каждой молекулой ганглиозида. Увеличение концентрации меди не изменяет концентрации этого комплекса, однако способствует ее взаимодействию с другими медьсвязывающими участками в ганглиозидах. Таким образом, при более высоких концентрациях меди возникают также комплексы со стехиометрией медь/ганглиозид больше 1,0. Последние характеризуются меньшей величиной константы сверхтонкого расщепления ( $A_{II} = 150$  э), тогда как комплексы с высоким сродством (правый максимум) имеют большую величину константы сверхтонкого расщепления ( $A_{II} = 180$  э). При добавлении к ганглиозидам мозга свиньи меди в крайне высоких концентрациях ( $10^{-2}$  М и выше) помимо двух рассмотренных сигналов в спектре ЭПР появляется широкая одиночная линия, соответствующая свободным (не связанным с ганглиозидами) ионам меди. Следовательно, указанные два центра связывания, по-видимому, исчерпывают возможности взаимодействия меди с ганглиозидами.

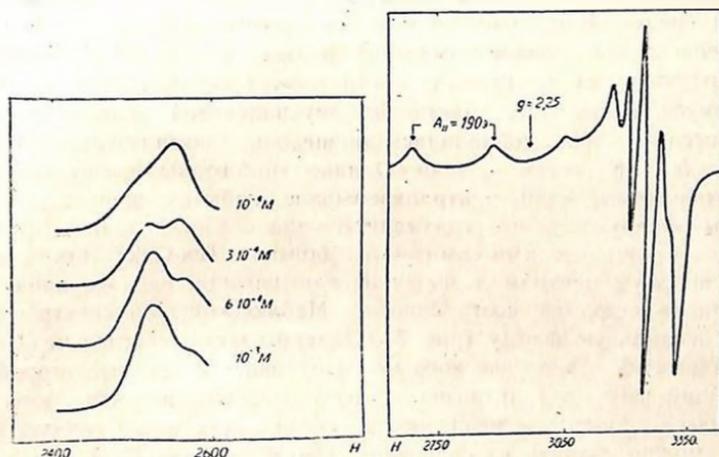


Рис. 3. Изменение формы крайней низкочастотной компоненты сигнала ЭПР в присутствии различных концентраций меди. Ганглиозиды из мозга свиньи

Рис. 4. Сигнал ЭПР, наблюдающийся при щелочной обработке комплексов меди с ганглиозидами свиньи

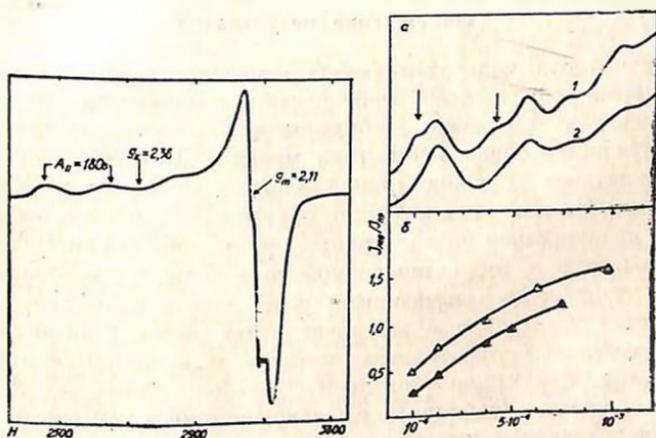


Рис. 5. Спектр ЭПР комплекса меди с патологическим набором ганглиозидов. Содержание меди  $10^{-4}$  М

Рис. 6. Сравнение формы низкочастотной части сигналов ЭПР комплексов меди с патологическими ганглиозидами (2) и ганглиозидами свиньи (1) при одной и той же концентрации меди ( $2 \cdot 10^{-4}$  М) (а) и кривых титрования медью ганглиозидов свиньи ( $\triangle$ ) и ганглиозидов мозга больного  $\blacktriangle$ , прослеженное по изменению отношения интенсивностей левого и правого максимума крайней низкочастотной компоненты (б)

Комплексы меди с ганглиозидами были устойчивы лишь в слабых кислых средах. В щелочной среде они быстро разрушались, о чем свидетельствовало резкое изменение формы сигнала ЭПР. Возникающий при этом сигнал (рис. 4) соответствует сигналу, обычно наблюдающемуся в щелочных растворах двухвалентной меди. Его форма не зависела от того, добавлялась ли щелочь к комплексам с высоким или низким сродством к меди. Однако наблюдающиеся изменения были обратны, если нейтрализовывали избыток щелочи.

Мы обнаружили, что связывание меди с ганглиозидами из мозга больного с клиническими симптомами болезни Тея-Сакса также происходит по двум центрам в молекуле ганглиозида, как это характерно для ганглиозидов из мозга свиньи. Наблюдающийся спектр также имеет аксиальную форму (рис. 5). Однако взаимодействие меди с ганглиозидами из патологического мозга отличается тем, что второй связывающий центр в ганглиозидах мозга больного, вероятно, имеет более низкое сродство к меди, чем в ганглиозидах мозга свиньи. Такой вывод можно сделать из сравнения формы низкочастотной компоненты сверхтонкой структуры спектров ЭПР изученных ганглиозидов и зависимости отношения интенсивностей двух максимумов низкочастотной компоненты (рис. 6). Как видно, при одной и той же концентрации меди ганглиозиды мозга больного слабее связывают медь по второму центру.

### Обсуждение результатов

Наличие двух медьсвязывающих центров в растворах ганглиозидов, вероятно, обусловлено особенностями молекулярного строения ганглиозидов, а не связано с образованием в растворах ганглиозидов надмолекулярных образований типа мицелл. Действительно, хотя величины критических концентраций мицеллообразования (ККМ) для ганглиозидов весьма низки [4] и образование мицелл наблюдается уже при сравнительно низких ионных силах, однако описанные опыты были проведены в дистиллированной воде в отсутствие солей. По-видимому, двумя медьсвязывающими участками в молекуле ганглиозида являются углеводная и жирнокислотная части. Способность углеводов связывать многие тяжелые металлы и, в частности медь, хорошо известна. Структурные различия между ганглиозидами мозга свиньи и больного (таблица), вероятно, способны объяснить наблюдавшиеся различия в связывании ионов меди ганглиозидами нормального и патологического мозга. Однако в настоящее время трудно выдвинуть какие-либо конкретные предположения о структуре этих комплексов об участии тех или иных групп ганглиозидов в связывании меди. Тем не менее, представление о вовлеченности в комплексобразование ацетилнейраминавой кислоты представляется очевидным. В частности, участие карбоксильных групп ацетилнейраминавой кислоты в связывании  $\text{Ca}^{2+}$  было четко показано [5]. Изучение электрических

свойств пленок ганглиозидов из нормального и патологического мозга также выявило определенные различия этих ганглиозидов в связывании  $\text{Ca}^{2+}$  [6]. На основании имеющихся данных [7, 8] можно утверждать, что комплексообразование с медью у ганглиозидов, содержащих N-ацетилгалактозамин, будет отличаться от ганглиозидов, не имеющих его в своем составе.

Сравнительно высокое сродство ганглиозидов к меди позволяет предполагать, что они могут принимать участие в связывании меди *in vivo*. В пользу такой возможности косвенно свидетельствует также тот факт, что все выделенные ганглиозиды содержали медь, которую можно определить методом ЭПР, а также атомно-абсорбционной спектроскопией. Однако содержание меди в препаратах ганглиозидов было в 10—20 раз ниже насыщающих концентраций. Таким образом, проведенные опыты подтверждают возможность того, что ганглиози-

Таблица

Состав индивидуальных ганглиозидов головного мозга исследуемых объектов

Ганглиозиды	Мозг больного	Мозг свиньи
Тетрасиалоганглиозид $G_Q$	9,8	—
Трисиалоганглиозид $G_{T_1}$	23,7	16,3
Дисиалоганглиозид $G_{D_1b}$	20,7	18,1
Дисиалоганглиозид $G_{D_1a}$	13,6	37,4
Дисиалоганглиозид $G_{D_2}$	5,9	—
Дисиалоганглиозид $G_{D_3}$	5,1	—
Моносиалоганглиозид $G_{M_1}$	12,1	21,7
Моносиалоганглиозид $G_{M_2}$	5,8	0,9
Моносиалоганглиозид $G_{M_3}$	3,3	—

ды могут принимать участие в транспорте ионов меди между клетками. У ганглиозидов из патологического мозга способность к связыванию меди оказывается, по крайней мере частично, измененной. Последствия этого факта для организма трудно оценить в полной мере, однако очевидно, что нарушения обмена меди вовлекаются в общую картину развития патологического процесса при ганглиозидозах, приводящего к летальному исходу.

Полученные данные ясно показывают, что медьсвязывающие центры мозга не ограничены белками. Как установлено, гликолипиды также могут принимать участие в связывании меди. Исходя из этого, следует иметь в виду возможные влияния ганглиозидов на обмен меди. В частности, заслуживает подробного изучения взаимодействие ганглиозидов с медьсодержащими белками и ферментами мозга.

# INTERACTION OF GANGLIOSIDES WITH COPPER

TUMANOVA S. Y., NALBANDYAN R. M.

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

Two copper-binding sites differing substantially in their affinity for copper ions have been detected in gangliosides isolated from both porcine brain and the brain of Tay-Sachs patients. EPR data point out that in pathology the affinity for copper in one of these copper-binding sites is changed drastically.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Nalbandyan R. M.* Neurochem. Res., v. 8, № 10, p. 1211—1232, 1983.
2. *Туманова С. Ю.* Биохимия, т. 43, № 3, с. 387—398, 1978.
3. *O'Brien J. S.* Adv. Human Genetics, v. 3, p. 39—98, 1972.
4. *Formisano S., Johnson M. L., Lee G., Aloj G. M., Edelhoch H.* Biochemistry, v. 18, p. 1119—1124, 1979.
5. *Gatt S., Gazit B., Cestaro B., Barenholz J.* Adv. Exp. Med. Biol., v. 125, p. 135—146, 1980.
6. *Tumanova S. Yu., Badjinian S. A., Nalbandyan R. M.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 84, p. 520—526, 1978.
7. *Harris P. L., Thornton E. R.* J. Amer. Chem. Soc., v. 100, p. 6738—6745, 1978.
8. *Schauer R., Veh R. W., Sander M., Gorfteld A. P., Wiegandt H.* Adv. Exp. Med. Biol., v. 125, p. 283—294, 1980.

Поступила 3. IX 1985.



УДК 577.15.591.48:89

ГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ  
В МОЗЖЕЧКЕ КРЫСЫ

РОСТОМЯН М. А.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Гистохимическим методом исследована локализация аденилатциклазы (АЦ) в мозжечке и ее чувствительность к различным медиаторам. Наибольшая активность АЦ выявлена в коре мозжечка, в многочисленных нервных окончаниях и вдоль нервных волокон. Внутримозжечковые ядра также обладают АЦ активностью.

Норадреналин активизирует АЦ в нервных структурах коры, тогда как активирующий эффект дофамина выражен в нервных волокнах белого вещества междольковых пластинок мозжечка.

Вопрос о роли системы аденилатциклазы—циклический аденозинмонофосфат (АЦ-сАМР) в нейротрансмиссии мозжечка детально изучали Bloom и соавт. [1—4], которые на основании экспериментальных данных, полученных биохимическими, электрофизиологическими, иммуноцитохимическими и фармакологическими методами показали, что сАМР является вторым посредником в медиации ингибиторного эффекта норадреналина (НА) на клетки Пуркинье мозжечка.

В исследованиях, проведенных на синапсомных мембранах, выделенных из мозжечка собаки под влиянием катехоламинов наблюдали активацию АЦ, приводящую к повышению уровня сАМР [5]. Наибольший эффект оказывали изопротеренол, адреналин и НА, тогда как действие дофамина (ДА) было весьма слабо выражено и проявлялось при довольно высоких концентрациях (1 мМ). Активирующий эффект ДА не отмечался в препаратах неочищенных мембран мозжечка крупного рогатого скота [6]. Отсутствие сдвигов в уровне сАМР под влиянием галоперидола (антагонист ДА) позволило допустить, что дофамин не играет существенной роли в функциях мозжечка [7]. Однако биохимические методы из-за гетерогенности ткани не всегда позволяют уловить изменения в локальных областях органов. Разнонаправленные сдвиги, возникающие в различных клеточных структурах органа, могут инвентироваться при биохимическом анализе всего объема ткани.

В настоящем сообщении приводятся результаты изучения локализации гистохимически выявляемой АЦ в мозжечке и исследование ее чувствительности к адреналину, НА и ДА.

## Материалы и методы

Выявление АЦ проводили по методу, предложенному ранее [8, 9], с некоторыми модификациями состава инкубационной среды, приведенными ниже. Предпосылкой для разработки метода послужили данные электрохимических исследований АЦ [10] и приемы визуализации солей фосфата, применяемых при исследовании фосфатаз.

Исследования проведены на продольных и поперечных серийных срезах мозжечка крысы, фиксированных перфузией через аорту. Наркотизированных животных перфузировали физиологическим раствором (около 200 мл), а затем фиксатором (2,5%-ный глютаральдегид, забуференный 0,1 М какодилатным или трис-малеатным буфером pH 7,4) с 4,5%-ной сахарозой со скоростью 35—45 мл/мин в течение 5—6 мин. Зафиксированный таким образом мозг осторожно извлекали и дополнительно фиксировали погружением в фиксатор такого же состава.

Инкубацию замороженных срезов толщиной 30—40 мкм проводили при температуре 32—34° в течение 2—3 ч. Инкубационную среду готовили на 0,1 М какодильном или трис-малеатном буфере pH 7,4, содержащем 8% глюкозы. В ее состав входили также (в мМ) сернистый магний—4, теофиллин—2, АТФ—0,5 с примесью ванадия («Sigma», США) для ингибции АТФаз, азотнокислый свинец—1—2. Последний добавляли перед употреблением и после тщательного перемешивания смесь фильтровали.

После инкубации срезы промывали несколько секунд в дистиллированной воде, 1 мин—в 1%-ной уксусной кислоте для удаления остатков несвязавшегося свинца и 3—5 мин в 0,5%-ном растворе сульфида натрия для визуализации реакции на АЦ. В пробы, предназначенные для исследования локализации АЦ, добавляли тартраты (конечная концентрация 1%), усиливающие специфическую окраску на АЦ. Чувствительность к медиаторам исследовали в среде, не содержащей этой соли.

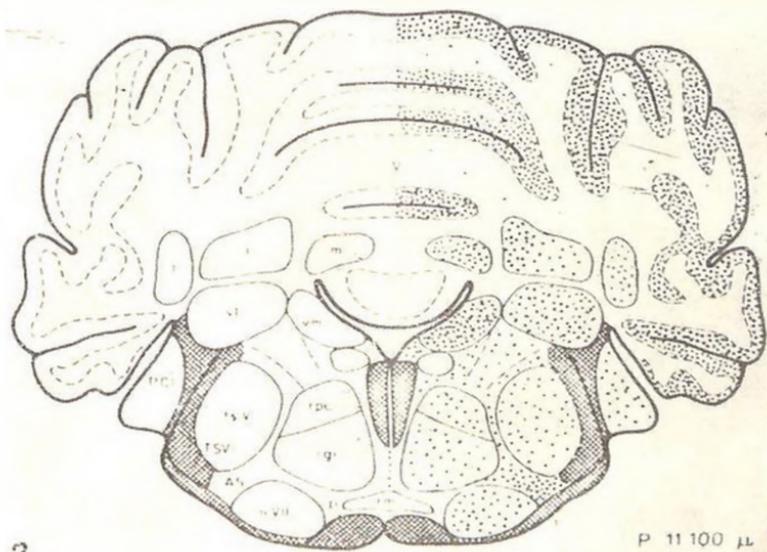
Контрольные инкубации проводили с использованием той же инкубационной среды и времени, но без субстрата или одного из компонентов среды. Гистохимическое выявление АЦ основано на обнаружении не сАМР—специфического продукта ферментативной реакции, а солей фосфата, поэтому для определения специфичности реакции и возможного участия других ферментативных систем в образовании осадка вместо АТФ были использованы и другие фосфатсодержащие субстраты (АМР, АДР), а также ингибиторы для кислой, щелочной фосфатаз и нуклеозидтрифосфатаз (уабаин, ЭДТА, тартрат). Для тестирования гормональной стимуляции и действия медиаторов в инкубационную среду добавляли адреналин, НА ( $10^{-5}$ М) и ДА (3 мМ).

## Результаты и обсуждение

Исследование локализации гистохимически выявляемой АЦ в серийных срезах мозга показало, что наиболее интенсивные отложения продукта ферментативной реакции проявляются по всему молекулярному слою коры мозжечка (рис. 1). Реакция обнаруживается и в других отделах мозжечка, но ее интенсивность ниже, чем в коре. Выявляемый продукт реакции следует отнести к проявлению специфической активности АЦ на следующем основании: а) контрольные эксперименты без субстрата показали, что осадки образуются не за счет неспецифического отложения свинца; б) другие фосфатсодержащие субстраты—АМР, АДР не являются источниками фосфата для преципитации в использованных условиях; в) добавление специфических и неспецифических ингибиторов для фосфатаз, нуклеозидтрифосфатаз и нуклеозиддифосфатаз подтвердило, что эти ферменты не участвуют в образовании осадка.



1



2

Рис. 1. Продольный срез мозжечка с реакцией на АЦ. Ув.: 15X  
 Рис. 2. Схематическое изображение поперечного среза мозжечка на уровне P 11100 мкм. Точками обозначены области, проявляющие положительную реакцию на АЦ. Плотность расположения точек соответствует интенсивности реакции. Условные обозначения: i—nucleus interpositus cerebelli, l—nucleus lateralis cerebelli, m—nucleus medialis cerebelli, nVII—nucleus motorius nervifacialis, P—tractus corticospinalis (tractus pyramidalis), PCl—pedunculus cerebellaris inferior, rgt—nucleus reticularis gigantocellularis, rm—nucleus raphe magnus, rpc—nucleus reticularis parvicellularis, tsV—nucleus tractus spinalis nervi trigemini, V—vermis cerebelli, VI—nucleus vestibularis lateralis, vm—nucleus vestibularis medialis



*Рис. 3.* Первые контакты клеток радиарного типа в коре мозжечка. Ув.: об. 63, ок. 8

*Рис. 4.* Активация норадреналином МС в дендритных волокнах молекулярного слоя. Ув.: об. 63, ок. 8

*Рис. 5.* Активация адреналином МС в дендритах молекулярного слоя. Ув.: об. 12,5, ок. 8

*Рис. 6.* Активация дофамином МС в дендритах молекулярного слоя в межзольковой пластинке белого вещества. Ув.: об. 63, ок. 8

На рис. 2 приведено схематическое изображение поперечного среза мозжечка крысы на уровне Р 11100 мкм (номенклатура и схема— по атласу Palkovits [11]). Как видно из рис. 1, довольно интенсивная реакция проявляется в медиальном вестибулярном ядре (vm), несколько слабее в латеральном вестибулярном ядре (vl) и далее в медиальном (m), промежуточном (i) и латеральном (l) ядрах. Хорошо выражена реакция в области 5 поля катехоламинергических клеток (А5), в области ретикулярной формации—она весьма умеренная.

При больших увеличениях можно видеть, что реакция преимущественно выражена по ходу нервных волокон и в нервных окончаниях. Нередко можно видеть контактирующие нервные окончания, принадлежащие клеткам различных типов (рис. 3). Особенно четко реакция проявляется в дендритах различных нейронов и несколько напоминает препараты, импрегнированные серебром. Локализация реакции, проявляющейся в дендритах, настолько специфична, что позволяет изучать особенности морфологии дендритного отдела нервных клеток различного типа и при необходимости вести учет числа, толщины, длины дендритов различного порядка, а также количества шпиков и других измеряемых параметров.

Наличие АЦ в дендритах и их шпиках свидетельствует о постсинаптической локализации этого фермента. Интересно отметить, что аналогичные результаты на светомикроскопическом уровне были получены не только с помощью гистохимической реакции на АЦ [9], но и иммуоцитохимическими методами, выявившими массовый характер локализации  $\beta$ -адренергических рецепторов в молекулярном слое мозжечка и, в частности в дендритах клеток Пуркинье [12]. Как известно, АЦ сопряжена с  $\beta$ -адренергическими рецепторами и сходство картин, получаемых различными методами, свидетельствует о хорошей корреляции данных и убедительности полученных результатов. Хорошо согласуются с ними и результаты электронномикроскопических исследований, выполненных с помощью кобальтового метода на коре мозга, хвостом ядре [13] и в культивируемых нейронах симпатического ганглия [14], а также в изолированных синапсомных фракциях, выделенных из коры [15] и гипоталамуса крыс [16]. В этих исследованиях было выявлено, что АЦ имеет также пресинаптическую локализацию.

Исследование влияния нейроактивных веществ—адреналина, НА и ДА показало, что изменение активности АЦ характеризуется определенной направленностью и неодинаково проявляется в различных отделах мозжечка. НА оказывает стимулирующее влияние на АЦ нервных волокон молекулярного слоя (рис. 4), активирующее действие адреналина проявляется преимущественно на эндотелии микроциркуляторного русла (рис. 5).

Специфическое и выраженное активирующее влияние оказывает ДА. Его действие проявляется в дендритах клеток Пуркинье, в нервных волокнах корзинчатых и горизонтальных клеток. Наиболее приме-

чательным является активация АЦ первых волокон в пластинках белого вещества (рис. 6), которые при обычных условиях инкубирования не выявляются. Этот факт свидетельствует о наличии в различных слоях мозжечка структур, чувствительных к ДА, который наряду с НА может иметь определенное значение в функциях мозжечка.

Изменение активности АЦ под воздействием вышеуказанных соединений проявляется далеко не во всех извилинах мозжечка, что, по-видимому, отражает функциональное разнообразие участков коры мозжечка и связанную с этим мозаичность реактивных ответов АЦ на действие тех или иных медиаторов.

Функциональная значимость указанных различий, вероятно, может быть выяснена при изучении влияния определенных физиологических или фармакологических нагрузок, которые можно соотносить к изменению в определенных структурных образованиях мозжечка. И в этом случае исследование серийных срезов мозжечка и картирование сдвигов по критерию изменения активности АЦ в известной мере содействовало бы получению дополнительной информации о внутри- и немозжечковых связях и механизмах нервной передачи в мозжечке.

## HISTOCHEMICAL STUDIES OF ADENYLATE CYCLASE IN RAT CEREBELLUM

ROSTOMIAN M. A.

[Institute of Biochemistry of Armenian Academy of Sciences, Yerevan, USSR

Cerebellar adenylate cyclase and its sensitivity to different mediators was studied by histochemical methods. The highest level of adenylate cyclase activity was found in the cerebellar cortex, in numerous nervous endings and along the nervous fibers. Cerebellar nuclei, especially n. vestibularis medialis and A5 catecholaminergic cell group also demonstrated adenylate cyclase activity.

Noradrenaline activated adenylate cyclase in nervous structures of the cortex, while the activating effect of dopamine was pronounced also in the subcortical structures of cerebellum.

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Bloom F. E. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol., v. 74, p. 1—103, 1975.
2. Bloom F. E. Fed Proc., v. 38, p. 2203—2207, 1979.
3. Siggins G. R., Battenberg E. P., Hoffer B. J., Bloom F. E., Steiner A. Science, v. 179, № 4073, p. 585—588, 1973.
4. Siggins G. R., Henriksen S. J. Science, v. 189, № 4202, p. 559—561, 1975.
5. Nishikori K., Maeno H. Arch. Biochem. and Biophys., v. 195, № 2, p. 505—507, 1979.
6. Воейков В. Л., Виленская Н. Д. Тезисы докл. III Всесоюз. симпозиума «Циклические нуклеотиды», с. 28—29, Киев, 1980.
7. Palmer G. C., Jones D. J., Medina M. A., Palmer S. J., Stavinova W. B. Neuropharmacology, v. 17, № 7, p. 491—498, 1978.

8. *Rostomyan M. A., Abramyan K. S.* Arch. anat., т. 76, № 1, с. 56—59, 1979.
9. *Rostomyan M. A.*, Вопр. биохимии мозга, т. 14, с. 116—120, Ереван, Изд.-во АН АрмССР, 1980.
10. *Reik L., Petzold G. L., Higgins J. A., Greengard P., Barnet R. J. J.* Histochem. Cytochem., в. 20, р. 382—384, 1970.
11. *Palkovits M.* Utmutató és atlasz patkányagy sejtesportjainak izolált kivételére. Akadémiai Kiadó, Budapest, 1980.
12. *Strader C. D., Pickel V. M., Joh T. H., Strohsacker M. W., Shorr R. G. L., Lefkowitz R. J., Caron M. G.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, в. 80, р. 1840—1844, 1983.
13. *Rechardt L., Härkönen M.* Histochemistry, в. 51, р. 113—119, 1977.
14. *Hervonen H., Rechardt L.* Histochemistry, в. 48, р. 43—50, 1976.
15. *Rostomyan M. A., Abramyan K. S., Hajos F.* Histochemistry, в. 70, р. 167—171, 1980.
16. *Rostomyan M. A., Abramyan K. S.* Proc. of the 7th European Congress on Electron Microscopy. в. 2, р. 31—32, Hague, The Netherlands, 1980.

Поступила 20. V 1985



УДК 616.894.02:615.711.1

## ИССЛЕДОВАНИЕ СЕКРЕЦИИ НОРАДРЕНАЛИНА МЕТОДОМ ПЕРЕНОСА СРЕЗОВ КОРЫ МОЗГА КРЫС

БАЗЯН А. С., КРУГЛИКОВ Р. П.

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии АН СССР, Москва

Описана установка для исследования секреции медиаторов методом переноса срезов, которая позволяет провести многочасовое исследование этого процесса параллельно на 4—8 срезах мозга. Описаны результаты исследования секреции 3Н-норадреналина (НА) параллельно из 4 горизонтальных срезов коры мозга крыс. 5-кратное исследование секреции 3Н-НА с интервалом 30 мин у всех 4 срезов одновременно позволяет провести статистическую обработку полученных результатов индивидуально для каждого животного.

Показано, что деполяризация срезов 20 мМ КСl приводит к  $Ca^{2+}$ -зависимому усилению секреции 3Н-НА. При исследовании влияния различных концентраций экзогенного НА на секрецию 3Н-НА показано, что НА в низких концентрациях ( $10^{-11}$ — $10^{-9}$ М) усиливает, а при более высоких ( $10^{-8}$ — $10^{-7}$ М)—тормозит секрецию. Полученные результаты объясняются активацией пресинаптических  $\beta$ - и  $\alpha$ -адренорецепторов соответственно.

Для изучения секреции медиаторов из срезов мозга и других тканей используется ставший уже классическим метод перфузии исследуемых образцов инкубационной средой. Однако, из-за трудности равномерной прокачки инкубационной среды через параллельно подключенные камеры перфузии к единой инкубационной среде и равномерной продувки карбогеном (95%  $O_2$  и 5%  $CO_2$ ) инкубационных сред возможно исследование только одного образца ткани в одной установке. Для устранения этого недостатка и была разработана установка для исследования секреции медиаторов методом переноса ткани.

## Материалы и методы

Установка для исследования секреции медиаторов (рис. 1) состоит из термостатов (1), держателей образцов инкубируемой ткани (2), системы автоматической подачи инкубационных сред (7, а, б), делителя карбогена (4) и источника карбогена (5).

Держатели образцов—полые стеклянные трубки диаметром 10 мм, длиной 70 мм (рис. 2)—предназначены для быстрого переноса исследуемой ткани из одной инкубационной среды в другую. Алмазной пилкой в нижней части трубки под струей воды выпиливаются два окошка шириной 4—5 мм, длиной 6—7 мм (1). На 3—4 мм выше них выпиливаются 4 отверстия диаметром 1—2 мм (2). К нижней части трубки при помощи силиконового кольца (5) прикрепляется нейлоновая сетка (4); на

которую и помещают образец ткани. Силиконовые трубки (6) от делителя карбогена фиксируются в держателе резиновой пробкой (7). При переносе держателей в инкубационную среду (9 и 10) трубки, подающие карбоген (6), не погружаются в нее. Поскольку среда предварительно насыщена карбогеном, то газ, поступающий в держатель через 4 отверстия в корпусе, полностью вытесняет воздух с поверхности среды, тем самым препятствуя обмену карбогена, растворенного в среде с воздухом. Данный способ поддержания насыщенности среды позволяет использовать одновременно несколько держателей.

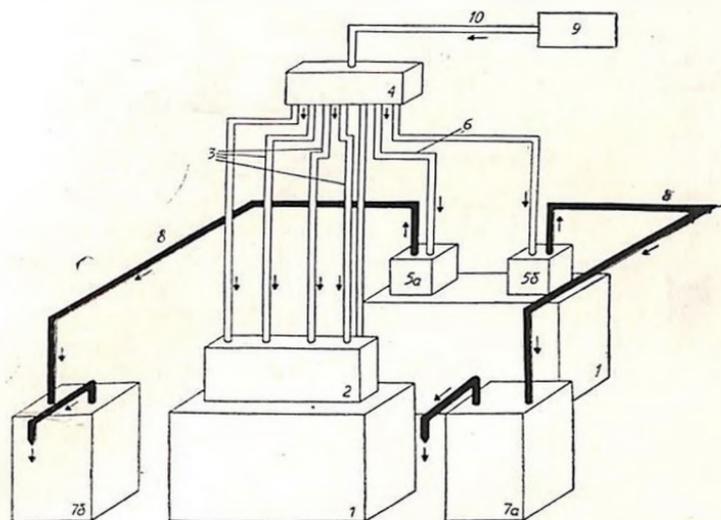
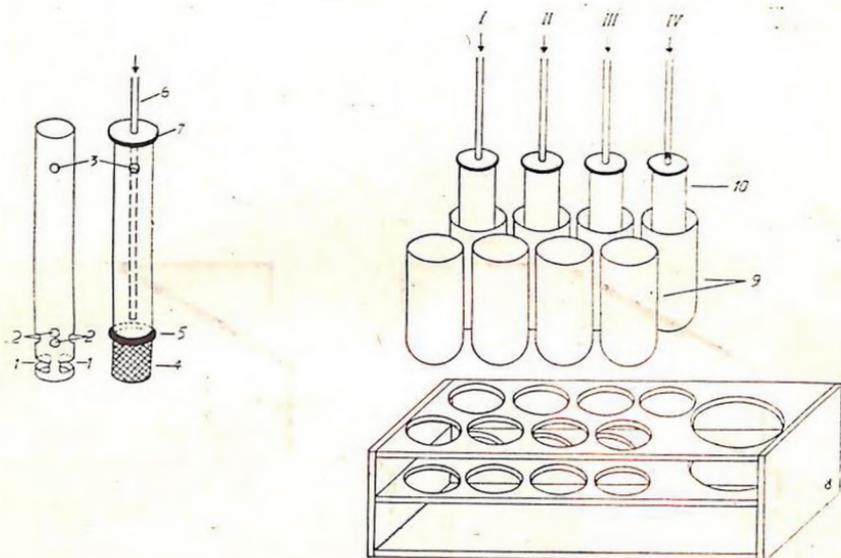


Рис. 1. Схема установки для исследования способом переноса секрети медиаторов из срезов мозга и других тканей. 1—термостаты; 2—термостатируемый блок держателей образцов (подробнее на рис. 2); 3, 6, 10—трубки, подающие карбоген; 4—делитель карбогена; 5—термостатируемые сосуды инкубационной среды (а) и среды деполаризации (б); 7—автоматические дозаторы, подающие среду инкубации (а) и среду деполаризации (б); 8—трубки, подающие среды деполаризации и инкубации; 9—источник карбогена

Для термостатирования исследуемых образцов ткани и основных инкубационных сред использовали два отечественных серийных термостата для гемокоагуляции. В середине ванны первого термостата прикреплен подвешенный, свободно качающийся штатив (рис. 2, 8), справа на корпусе термостата прикреплен мотор для встряхивания штатива. В ванну второго термостата поместили герметически закрытые объемы основных инкубационных сред (рис. 1, 5, а, б), соединенные силиконовыми трубками (рис. 1, 6) с делителем карбогена и с системой автоматической подачи инкубационных сред. Такая система соединения обеспечивает замену использованной инкубационной среды на карбоген. Автоматическая подача инкубационных сред осуществлялась при помощи двух отечественных автоматических дозаторов А2.

Делитель карбогена состоит из сосуда, наполненного водой и соединенного с тройником. Через сосуд пропускается карбоген. Первый выход тройника связан с основным объемом инкубационной среды, второй—с основным объемом среды деполаризации, через третий выход карбоген подается на 4 параллельных держателя срезов (рис. 2, 10).

**Методика исследования секреции.** Для инкубации срезов использовали среду 1, содержащую (в мМ): NaCl—118, KCl—4,8, CaCl<sub>2</sub>—1,3, MgSO<sub>4</sub>—1,2, глюкоза—11,1, ЭДТА—0,004, аскорбиновая кислота—0,11, Na-фосфатный буфер (рН 7,3)—1, NaHCO<sub>3</sub>—15 (при насыщении карбогеном рН 7,25—7,3). Для деполяризации срезов использовали среду 2, отличающуюся от среды 1 только тем, что концентрация в ней NaCl и KCl составляла соответственно 109,8 и 20 мМ.



**Рис. 2.** Блок держателей образцов. 1—окошки для обмена инкубационных сред; 2—отверстия для обмена карбогена; 3—отверстие для выхода излишка карбогена; 4—нейлоновая сетка; 5—силиконовое кольцо; 6—трубка подачи карбогена; 7—пробка фиксации трубки в держателе; 8—штатив-встряхиватель; 9—пробирки для инкубации; 10—держатели образцов

Четыре горизонтальных среза коры мозга крысы размером 10×5 мм, толщиной 0,3 мм помещали в 4 держателя и инкубировали 15 мин в 4 мл среды 1 при 37°. Все дальнейшие процедуры проводили при данной температуре. Далее в общий объем добавляли 10 или 20 мкКи D-L-3H-НА («Amersham», Англия, удельная радиоактивность—10 или 20 Ки/ммоль) с конечной концентрацией 2,5·10<sup>-10</sup>М НА на 1 мл и инкубировали 10 мин.

**Первый цикл.** После инкубации каждый держатель со срезом промывали отдельно 30 мин. Промывка представляет собой параллельный перенос всех держателей со срезами в пробирки, содержащие 2 мл среды 1 (рис. 2, 9, 10), и инкубацию в течение 2 мин. Эту процедуру повторяли 10 раз. В процедурах с 11-ой по 16-ую инкубацию срезов проводили в 1 мл среды 1 в течение 2 мин. После 16-ой процедуры инкубационные среды от всех 4 срезов сохраняли для последующего исследования радиоактивности в них, определяя таким путем степень отмывки и уровень спонтанной секреции. Во время 17-ой процедуры инкубационные пробирки наполняли 1 мл среды 2 и срезы инкубировали 2 мин. Эти среды также сохраняли для последующего исследования радиоактивности, определяя таким путем вызванную секрецию.

**Второй цикл.** Срезы промывали 8 раз 2 мл среды 1 по 2 мин и 7 раз 1 мл среды 1 по 2 мин, с дальнейшим исследованием при 16- и 17-ой процедурах спонтан-

гой и вызванной секреции (I и III срезы). Для II и IV срезов после 8-ой процедуры параллельной промывки в инкубационные среды добавляли по  $10^{-11}$  М немеченого НА (9—15-ая процедуры, за 14 мин до спонтанной секреции). Спонтанную и вызванную секрецию проводили тоже при данной концентрации НА.

Третий, четвертый и пятый циклы полностью повторяли второй с той лишь разницей, что в этих циклах применяли  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$  или  $10^{-7}$  М немеченого НА соответственно.

Для исследования радиоактивности из проб отбирали по 0,2 мл среды и добавляли к 10 мл сцинтиллятора (РРО—4 г, РОРОР—0,2 г, нафталин—60 г, метанол—100 мл, диоксан—до 1 л), радиоактивность измеряли на счетчике «RakBeta», LKB (Швеция). Результаты обрабатывали статистически:  $r_1$  — критерий Стьюдента,  $r_2$  — критерий Вилкоксона для сопряженных пар.

### Результаты исследований

Показателем насыщенности инкубационной среды карбогеном является рН среды, равный 7,25—7,3 после насыщения и 7,4—7,5 до насыщения. Держатели срезов помещали в 4 мл насыщенной среды I и инкубировали 25 мин (время преникубации и инкубации с меткой), после чего измеряли рН среды. В ряде случаев измеряли также рН среды после 2-минутных промывок. Все измерения показали, что величина рН оставалась без изменения. Это указывает на сохранение насыщенности среды карбогеном при использовании данного способа продувки.

Опыты проводили на 7—8-месячных самцах беспородных белых крыс массой 300—350 г.

Параллельное исследование 4 срезов из мозга одного животного обеспечивает статистическую обработку результатов индивидуально у каждого животного. В табл. 1 приведены результаты, полученные при исследовании одного животного. Из таблицы видно, что калевая деполяризация (20 мМ KCl) приводит к усилению секреции. Усредненные величины спонтанной (среда I) и вызванной (среда 2) секреции составляют  $279 \pm 37$  и  $513 \pm 69$  распад/мин соответственно,  $r_1 < 0,01$ . Влияние экзогенного НА на секрецию  $^3\text{H}$ -НА вычисляли следующим образом: интенсивность секреции получали делением уровня вызванной секреции к уровню спонтанной и обозначали через  $S_n$  ( $n=1...5$ ) для всех 4 срезов. Затем вычисляли соотношение последующих секреций к первой  $S'_n = S_n/S_1$ , где  $n=2...5$  также для 4-х срезов. Например,  $S'_1 - \text{I срез} = 1,59/2,17 = 0,73$  (табл. 1). Влияние различных концентраций экзогенного НА на интенсивность секреции  $^3\text{H}$ -НА вычисляли усреднением частных от деления величин  $S'_n$  II и IV срезов на величину  $S'_n$  I и III срезов. Например, с  $10^{-8}$  М НА  $= [(S'_2 - \text{II}/S'_2 - \text{I}) + (S'_2 - \text{IV}/S'_2 - \text{III})]/2 = [(1,37/0,86) + (1,02/1,13)]/2 = (1,59 + 0,90)/2 = 1,25$  (табл. 1). Средняя величина интенсивности секреции для данного животного составляет  $1,84 \pm 0,07$ . Коэффициент вариации интенсивности секреции  $\text{CV} = 13,8\%$ .

Исследования показали зависимость процесса вызванной секреции НА от  $\text{Ca}^{2+}$ . Увеличение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в инкубационной

среле с 1,3 до 2.6 мМ увеличивает интенсивность секреции с  $2.18 \pm 0.11$  (8 животных) до  $3.14 \pm 0.26$  (8 животных),  $p_1 < 0.01$ .

Таблица 1

Одновременное исследование секреции ЭН-норадреналина (НА) из 4-х срезов коры мозга одной крысы

Сре- зы	Про- бл	Состав среды	ДМР распад мин	Среда 2 среда 1	$S_n S_1$	$C_{(НА)} = S'_{n(НА)} / S'_n$
I	1	1	411	$S_1 = 2,17$	$S'_1 = 0,73$	
	2	2	390			
	3	1	263	$S_2 = 1,59$	$S'_2 = 0,86$	
	4	2	426			
	5	1	186	$S_3 = 1,37$	$S'_3 = 0,67$	
	6	2	348			
	7	1	182	$S_4 = 1,45$	$S'_4 = 0,95$	
	8	2	264			
	9	1	132	$S_5 = 2,00$		
	10	2	272			
II	11	1	331	$S_1 = 1,85$	$S'_1 = 1,02$	
	12	2	613			
	13	1 ( $10^{-10}$ М НА)	256	$S_2 = 1,88$	$S'_2 = 1,37$	
	14	2 ( $10^{-10}$ М НА)	482			
	15	1 ( $10^{-9}$ М НА)	161	$S_3 = 2,53$	$S'_3 = 0,82$	
	16	2 ( $10^{-9}$ М НА)	408			
	17	1 ( $10^{-8}$ М НА)	165	$S_4 = 1,51$	$S'_4 = 0,65$	
	18	2 ( $10^{-8}$ М НА)	249			
	19	1 ( $10^{-7}$ М НА)	276	$S_5 = 1,21$		
	20	2 ( $10^{-7}$ М НА)	333			
III	21	1	575	$S_1 = 1,53$	$S'_1 = 1,12$	
	22	2	879			
	23	1	292	$S_2 = 2,18$	$S'_2 = 1,13$	
	24	2	637			
	25	1	223	$S_3 = 1,73$	$S'_3 = 1,30$	
	26	2	395			
	27	1	177	$S_4 = 1,99$	$S'_4 = 1,06$	
	28	2	352			
	29	1	173	$S_5 = 1,62$		
	30	2	231			
IV	31	1	392	$S_1 = 2,05$	$S'_1 = 0,97$	
	32	2	802			
	33	1 ( $10^{-10}$ М НА)	270	$S_2 = 1,99$	$S'_2 = 1,02$	
	34	2 ( $10^{-10}$ М НА)	537			
	35	1 ( $10^{-9}$ М НА)	188	$S_3 = 2,09$	$S'_3 = 0,87$	
	36	2 ( $10^{-9}$ М НА)	392			
	37	1 ( $10^{-8}$ М НА)	184	$S_4 = 1,79$	$S'_4 = 0,61$	
	38	2 ( $10^{-8}$ М НА)	330			
	39	1 ( $10^{-7}$ М НА)	274	$S_5 = 1,26$		
	40	2 ( $10^{-7}$ М НА)	316			

Примечание. С—коэффициент регуляции интенсивности секреции (S) различными концентрациями НА. Средняя величина интенсивности секреции—сумма  $S_1 \cdot S_5$  I среза и III среза,  $S_1 \cdot S_2$  среза и IV среза. n—номер цикла.

Анализ интенсивности секреции от  $S_1$ — $S_5$  без воздействия экзогенного НА показал самоусиление секреции (табл. 2). Вследствие того, что наблюдается зависимое от времени самоусиление интенсивности секреции, исследование одних и тех же концентраций экзогенного НА в разных опытах проводили при различных значениях n, где (n=2...5).

Результаты по влиянию различных концентраций экзогенного НА

Соотношение интенсивности секреции  $^3\text{H}$ -НА

Параметр	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5
$S_n$	$1,93 \pm 0,1$	$2,07 \pm 0,12$	$2,43 \pm 0,16^*$	$2,36 \pm 0,15^*$	$2,19 \pm 0,11$
Количество животных	12	12	12	12	6
$S_n/S_1$		$1,03 \pm 0,04$	$1,26 \pm 0,05^{**}$	$1,25 \pm 0,03^{**}$	$1,21 \pm 0,03^{**}$
Количество животных		19	13	12	6

Примечание: n—номер цикла; \* $p_1 < 0,05$  по сравнению с  $S_1$ . \*\* $p_1 < 0,05$  по сравнению с параметром  $S_2/S_1$ .

Таблица 3

Влияние различных концентраций экзогенного НА на интенсивность секреции  $^3\text{H}$ -НА из срезов коры мозга крыс

Концентрация НА, М	$S_n/S_1$	$S_n(\text{НА})/S_1$	p	C(НА)	Количество животных
$10^{-11}$	$0,96 \pm 0,07$	$1,33 \pm 0,09$	$p_z = 0,05$	$1,38 \pm 0,09$	5
$10^{-10}$	$1,13 \pm 0,07$	$1,35 \pm 0,07$	$p_1 < 0,05$	$1,21 \pm 0,05$	6
$10^{-9}$	$1,12 \pm 0,07$	$1,27 \pm 0,07$	$p_z < 0,05$	$1,18 \pm 0,03$	11
$10^{-8}$	$1,16 \pm 0,06$	$0,95 \pm 0,06$	$p_1 < 0,001$	$0,83 \pm 0,05$	11
$10^{-7}$	$0,97 \pm 0,07$	$0,49 \pm 0,05$	$p_1 < 0,001$	$0,52 \pm 0,05$	8

на интенсивность секреции  $^3\text{H}$ -НА суммированы в табл. 3. Как видно из таблицы, низкие концентрации экзогенного НА ( $10^{-11}$ — $10^{-9}$  М) усиливают, а более высокие ( $10^{-8}$ — $10^{-7}$  М)—тормозят секрецию  $^3\text{H}$ -НА.

### Обсуждение результатов

Таким образом, каллевая деполяризация приводит к значительному усилению выхода  $^3\text{H}$ -НА из срезов мозга в омывающую инкубационную среду. Используемая нами исходная концентрация  $^3\text{H}$ -НА при его насыщении срезами, равная  $2,5 \cdot 10^{-10}$  М, а также зависимость выхода  $^3\text{H}$ -НА от  $\text{Ca}^{2+}$  при деполяризации указывают на то, что мы наблюдаем секрецию НА из адренергических терминалей коры больших полушарий мозга крыс под влиянием деполяризации аналогично процессу, протекающему в условиях *in situ*.

Влияние экзогенного НА на вызванную деполяризацией секрецию  $^3\text{H}$ -НА опосредовано, в основном, аутоадренорецепторами. Поскольку тела центральных адренергических нейронов локализованы главным образом в *locus coeruleus*, то использование горизонтальных срезов коры мозга исключает влияние соматодендритных адренорецепторов центральных адренергических нейронов. На отсутствие влияния «постсинаптических» адренорецепторов на секрецию  $^3\text{H}$ -НА адренергическими варикозными расширениями было указано ранее [1, 2]. В условиях нашего эксперимента возможно влияние на изучаемый процесс

неадренергических нейронов коры мозга, обладающих томаходендритными адренорецепторами, медиаторы которых могут деполяризовать центральные адренергические варикозы наподобие предполагаемого действия Н-холинергических агонистов [3]. Но в этом случае на основании данных, представленных в табл. 3, экзогенный НА, деполяризующий эти терминали, должен был при меньших концентрациях вызывать дозозависимое усиление спонтанной секреции и, по крайней мере, не влиять на спонтанную секрецию при более высоких концентрациях. В литературе отсутствуют указания на подобного рода изменения спонтанной секреции под влиянием экзогенного НА, которое не проявляется также в наших исследованиях.

Остается рассмотреть возможное влияние неадренергических нейронов в период деполяризации. Медиаторы, секретируемые из терминалей этих нейронов в момент деполяризации, могут активировать соответствующие рецепторы на адренергических терминалях [3], модулируя секрецию НА. Это влияние минимально, так как имеет место и в контрольных срезах, не инкубирующихся с экзогенным НА. Далее экзогенный НА, активируя адренорецепторы на неадренергических нейронах, по-видимому, может влиять на степень вызванной деполяризации, модулируя секрецию других медиаторов. Степень связывания этих медиаторов с соответствующими рецепторами на адренергических терминалях—нарастающий во времени процесс, который запускается началом деполяризации и заканчивается его прекращением (2 мин в условиях наших опытов). Активация аутоадренорецепторов протекает в равновесных условиях (15 мин до деполяризации), что может перекрыть вклад в общий ответ первого процесса.

Тот факт, что НА в низких концентрациях ( $10^{-11}$ — $10^{-9}$  М) усиливает, а при более высоких ( $10^{-8}$ — $10^{-7}$  М)—тормозит секрецию  $^3$ H-НА, указывает на наличие соответственно  $\beta$ - и  $\alpha$ -пресинаптических адренорецепторов на адренергических терминалях срезов коры мозга крыс. Отсюда можно предположить, что НА в концентрации  $10^{-11}$ — $10^{-9}$  М активирует пресинаптические  $\beta$ -адренорецепторы, а в концентрации  $10^{-8}$ — $10^{-7}$  М—пресинаптические  $\alpha$ -адренорецепторы.

## SLICE TRANSFER METHOD TO STUDY NA SECRETION

BAZVAN A. S., KRUGLIKOV R. I.

Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, USSR  
Academy of Sciences, Moscow

A special device for a long-term study of transmitter secretion by the method of slice transfer is described. It makes possible to study this process on 4—8 brain slices simultaneously.  $^3$ H-noradrenaline (NA) secretion has been studied on 4 slices from rat brain cortex at once, the aliquots from each slice have been taken with 30 min interval (5 times) that makes possible to use statistics for each animal. Depolarization of

slices by KCl (20 mM) leads to increase in  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent secretion of  $^3\text{H}$ -NA. Low concentrations of exogenous NA ( $10^{-11}$ — $10^{-9}$  M) stimulate secretion while high doses ( $10^{-8}$ — $10^{-7}$  M) inhibit it. Data obtained are due to activation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -presynaptic adrenoreceptors respectively.

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Бизли А. С. Успехи соврем. биол., т. 92, № 4, с. 115—123, 1981.
2. Ланге С. З.—В кн.: Освобождение катехоламинов из адренергических нейронов (под ред. Д. М. Патона), с. 59—81. М., Медицина, 1982.
3. Старк К.—В кн.: Освобождение катехоламинов из адренергических нейронов (под ред. Д. М. Патона), с. 135—176. М., Медицина, 1982.

Поступила 26. II 1986



## ДЕЙСТВИЕ ТЕТРАПЕПТИДА ТАФЦИНА НА СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКОВ В НЕЙРОНАХ ДВИГАТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ МОЗГА КРЫС

ЧЕБОТАРЕВА Т. Л., ГЕРШТЕИН Л. М.

НИИ мозга ВНЦ психического здоровья АМН СССР, Москва

Тетрапептид тафцина (Thr-Lys-Pro-Arg) является природным стимулятором фагоцитоза и иммуногенеза [1—3]. Однако в ряде исследований выявлено его стимулирующее действие на ЦНС и, прежде всего, на эмоциональную и поведенческую сферы, двигательную активность, восприимчивость к болевому раздражителю, агрессивность [4, 5]. Это заставляет предполагать направленное влияние тафцина на важнейшие регуляторные системы мозга.

По данным поведенческого и нейрохимического анализа реализация центрального стимулирующего действия тафцина осуществляется посредством катехоламинергической системы мозга. Известно, что при непосредственном взаимодействии тафцина с тирозингидроксилазой — ключевым ферментом обмена катехоламинов — он угнетает ее активность [6]. Вместе с тем при введении тафцина в желудочки мозга крыс не было обнаружено достоверных изменений в содержании биогенных аминов [7], также как не отмечено изменений активности MAO при послыном исследовании сенсомоторной коры [8]. В отдельных субфракциях митохондрий С и Д синантосом сенсомоторной коры установлены существенные изменения активности MAO [5].

Цель настоящей работы — выяснение специфичности реакций отдельных микроструктур мозга на кратковременное (15 мин) воздействие тафцина. Исходя из того, что наиболее ярким внешним проявлением действия тафцина является повышение двигательной активности животных, в данном исследовании мы изучали состояние нейронов двигательной системы как коркового (слой III и V), так и подкоркового звеньев (хвостатое ядро). Были исследованы нейроны отдельных морфофункциональных групп: в слое V — крупные пирамидные нейроны — интегративно-пусковые элементы и нейроны слоя III и хвостатого ядра, которые в основном представлены элементами ассоциативно-

Использовали половозрелых крыс-самцов линии *Wistar* массой 160—200 г. Тафцин (*Thr-Lys-Pro-Arg*) („Serva“, ФРГ) вводили животным внутривентрально из расчета 300 мкг/кг массы в физиологическом растворе. Через 15 мин крыс декапитуировали, мозг фиксировали в жидкости Карнуа и заливали в парафин. Методом интерферометрии на микроскопе БИНАМ-Т 212 в нейронах слоев III и V сенсомоторной коры и нейронах хвостатого ядра определяли сухую массу плотных веществ, которые на фиксированном материале отражают содержание структурированных белков [11]. Определение плотных веществ проводили в монохроматическом свете при длине волны 535 нм с использованием поворотного анализатора Спирармона (объектив 40, окуляр 10).

Одновременно измеряли площадь профильных полей цитоплазмы клеток и их ядер с помощью винтового окулярмикронметра МОВ-1-15. При заданной толщине среза (7 мкм) концентрацию белка выражали отношением содержания к площади профильного поля цитоплазмы. Статистическую обработку по критерию Стьюдента проводили на ЭВМ М-6000.

Результаты проведенного исследования (таблица) показали, что через 15 мин после введения крысам тафцина в цитоплазме нейронов всех изучавшихся образований происходит существенное повышение содержания структурированных белков: в цитоплазме нейронов хвостатого ядра оно возрастает на 39,8%, в цитоплазме нейронов слоя III сенсомоторной коры—на 40,3%, а в цитоплазме нейронов слоя V—на 36,4%.

Кроме этого, наблюдаются изменения размеров цитоплазмы и ядер нейронов, а также концентрации белков в них. Так, в слое V через 15 мин после введения тафцина на 31,4% увеличивается площадь цитоплазмы нейронов. При этом, несмотря на повышение содержания белков в цитоплазме, концентрация их не меняется.

В слое III сенсомоторной коры и в хвостатом ядре размеры тел нейронов и площадь их цитоплазмы достоверно не изменялись. Повышение содержания белков при неизменной площади цитоплазмы приводит к тому, что их концентрация в цитоплазме повышается на 26,3% как в хвостатом ядре, так и в слое III сенсомоторной коры. Площадь ядер нейронов уменьшается на 28,3% в хвостатом ядре и на 22,9% в слое III сенсомоторной коры.

Важно отметить, что в ядрах нейронов хвостатого ядра и слоя III сенсомоторной коры происходит уменьшение содержания белка на 13,7 и 11,3% соответственно.

Анализ полученных данных об изменениях всех изучавшихся показателей в нейронах исследованных образований двигательной системы показал, что у крыс через 15 мин после внутривентрального введения тафцина в сенсомоторной области коры и хвостатом ядре происходят не только функциональные, но и цитохимические изменения, которые взаимообусловлены.

Известно, что повышение содержания белков в цитоплазме, увеличение размеров нейронов являются следствием повышения их функционального функционального состояния [12, 13]. Исходя из этого, обнаруженное нами увеличение размеров нейронов и содержания белков в их

Таблица 1

Изменение содержания, концентрации белка и размеров нейронов слоев III и V сенсомоторной коры больших полушарий и хвостатого ядра мозга крыс через 15 мин после введения тафшина

*Образования мозга	**Вариант	Площадь (мкм <sup>2</sup> )		Содержание белка (нг)		Концентрация белка(нг/мкм <sup>3</sup> )	
		ядра	цитоплазмы	в ядре	в цитоплазме	в ядре	в цитоплазме
Слой III р	К	89,52±2,03	91,73±4,52	69,03±2,08	215,30±5,37	0,77±0,88	2,35±0,08
	О	69,02±1,94 <0,05	102,05±5,48 >0,1	61,23±1,78 <0,05	302,07±8,48 <0,05	0,89±0,06 <0,05	2,96±0,09 <0,05
Слой V р	К	118,8±2,26	261,86±5,22	141,32±3,78	640,70±17,98	1,19±0,02	2,44±0,03
	О	121,65±2,74 >0,1	341,14±7,49 >0,1	146,85±4,50 >0,2	875,03±20,45 <0,05	1,21±0,02 0,2	2,55±0,02 0,1
Хвостатое ядро р	К	62,62±1,13	84,48±2,41	58,92±5,14	165,34±8,55	0,97±0,07	1,90±0,08
	О	44,52±1,21 <0,05	91,92±2,91 >0,2	50,85±2,33 <0,05	231,13±10,29 <0,01	1,12±0,01 <0,02	2,41±0,05 <0,01

Примечание. \*Исследовано по 150 нейронов каждого образования мозга 3-х крыс в контроле и опыте; \*\*К—контроль, О—опыт; р—критерий достоверности отличий от контрольного значения.

цитоплазме можно также рассматривать как результат повышенной функциональной активности.

Таким образом, можно заключить, что в первые 15 мин после введения тафцина усиливает функциональную активность нейронов слоя V сенсомоторной коры, что проявляется в увеличении двигательной активности животных. Повышение содержания белков в цитоплазме нейронов при неизменной их концентрации—одно из проявлений общего повышения уровня обменяемости белков (как синтеза, так и распада).

Реакция нейронов рассмотренных групп на введение тафцина имеет свои особенности в слоях V и III сенсомоторной коры и в хвостатом ядре. Только в нейронах слоя V изменения проявляются в увеличении размеров нейронов, площади их цитоплазмы и содержания белков, то есть состояние повышенной активности в полной мере характерно только для нейронов слоя V сенсомоторной коры. Возможно, что указанные изменения показателей белкового обмена в сенсомоторной коре в ответ на введение тафцина не являются первичными. Имея в виду литературные данные о модулирующем влиянии тафцина на дофаминергические процессы мезолимбической системы [6], можно предположить, что функциональная активация интегративно-пусковых нейронов слоя V отражает быстро развивающиеся адаптивные процессы в коре, связанные с возрастанием (или появлением новой) биологически значимой импульсации. Именно активация этих нейронов позволяет животному правильно ориентироваться в пространстве в первое время действия тафцина.

В ассоциативных нейронах слоя III и хвостатого ядра увеличение содержания белков, вероятно, связано с повышением концентрации белка в цитоплазме. При этом уменьшается площадь ядер нейронов и содержание белка в них. Такое состояние нейронов может отражать превалирование процессов синтеза белка над распадом, следовательно, с точки зрения функциональной активности, может быть охарактеризовано как «относительно» тормозное. Нужно учесть, что активация нейронов как естественным, так и искусственным путем почти всегда сопровождается усилением не только возбуждающего, но и тормозного процессов, и эта закономерность прослеживается для ядра клетки в начальный период, а для цитоплазмы—в более поздние сроки [13]. Уменьшение площади ядер нейронов слоя III сенсомоторной коры и хвостатого ядра, возможно, свидетельствует о большем влиянии тормозных процессов, которые на данном сроке только начинают проявляться в ассоциативных слоях сенсомоторной коры и в хвостатом ядре по сравнению со слоем V. Тем не менее, интеграция всех этих процессов, а также измененная импульсация, исходящая из зрительной коры [8], приводит к активации крупных пирамидных нейронов слоя V сенсомоторной коры, стоящих на выходе моторных сигналов.

Таким образом, на основании полученных данных можно сделать вывод о том, что вызванное тафцином через 15 мин после введения

увеличение двигательной активности крыс определяется изменением интенсивности обмена белков как в сенсомоторной коре. Так и в хвостатом ядре.

В данном исследовании повышение функциональной нагрузки проявляется наиболее четко в нейронах, выполняющих интегративно-пусковые функции (слой V). Эти нейроны характеризуются повышенным содержанием белка и увеличенными размерами. Интерпретация изменений в нейронах ассоциативного типа (слой III и хвостатое ядро) сложна и требует дополнительных исследований.

## EFFECT OF TUFTSIN ON PROTEIN CONTENT IN RAT BRAIN MOTOR NEURONS

CHEBOTARIOVA T. L., GERSTEIN L. M.

Brain Research Institute, USSR Medical Academy of Sciences, Moscow

Cytoplasmic and nuclear protein content in sensomotor cortex and nucleus caudatus of rat brain has been measured by interferometric method after intraperitoneal administration of immunostimulator tuftsins (Thr-Lys-Pro-Arg—300 mcg/kg b. w.). Protein content in cytoplasm of all the neurons examined increased during 15 minutes after injection as well as in the area of the neurons of layer V. These changes were most pronounced in the efferent neurons of layer V and in associative neurons of layer III and n. caudatus. The mechanism of tuftsins effect on functional condition of neurons and level of protein metabolism is discussed.

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Nishtoka K., Babcock G. F., Philips J. H., Naves R. D. Mol. and Cell. Biochem., v. 41, p. 13—18, 1981.
2. Bruley-Rosset M., Florentin J., Mathe G. Mol. and Cell. Biochem., v. 41, p. 112—118, 1981.
3. Stabinsky J., Bar-shavit L., Fridkin M., Goldman R. Mol. and Cell. Biochem., v. 30, № 2, p. 71—77, 1980.
4. Вальдман А. В., Козловская М. М., Лизмарин И. П., Минеева М. Ф., Анохин К. В. Биол. эксперим. биол. и мед., т. 92, № 7, с. 31—33, 1981.
5. Доведова Е. Л., Качалова Л. М., Орлова Е. П. Журн. невропатол. и психиатрии, т. 86, № 7, с. 1056—1061, 1986.
6. Вальдман А. В.—В сб.: Фармакология нейропептидов, с. 9—30, М., ВНИИ фармациологии МЗ СССР, НИИ фармакологии АМН СССР, 1982.
7. Клауша Е. С., Свиркис Ш. В., Хим.-фармацевт. журн., т. 7, с. 23—31, 1979.
8. Шишова М. Б., Сергутина А. В., Герштейн Л. М. Нейрохимия, т. 3, с. 353—357, 1984.
9. Арушанян Э. Б., Отеллин В. А. Хвостатое ядро. Л., Наука, 1976.
10. Поляков Г. И.—В сб.: Нейронный анализ интегративной деятельности мозга, с. 134—141, М., Наука, 1974.
11. Бродский В. Я. Трофика клетки. М., Наука, 1966.
12. Санкова Е. И., Арефьева А. М. Онтогенез, т. 4, № 2, с. 193—196, 1973.
13. Гейнисман Ю. Я., Ларина В. П., Мац В. П., Персина Н. С. Физiol. журн. СССР, т. 59, с. 535—540, 1973.

Поступила 14. XII 1985



УДК 57.053:576.535.5

СТИМУЛЯЦИЯ ПРОЛИФЕРАЦИИ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ  
ФИБРОБЛАСТОВ ФАКТОРОМ РОСТА НЕРВОВ ИЗ  
СЕМЕННОЙ ПЛАЗМЫ БЫКАМОВСЕЯН В. А., КОНДРАТЬЕВ А. Д., \*МАГАКЯН Ю. А.,  
\*КОЛТУХЧЕВА Н. А., \*\*ГАСПАРЯН Г. Г., СЕВЕРИН Е. С.

Институт молекулярной биологии АН СССР, Москва

\*Институт экспериментальной биологии АН АрмССР,

\*\*Институт зоологии АН АрмССР, Ереван

Фактор роста нервов (ФРН)—белок, играющий важную роль в процессах дифференцировки, поддержания жизнеспособности и ориентации симпатических и сенсорных нейронов [1].

В настоящее время всесторонне изучается действие ФРН на развитие и функционирование клеток нейронального происхождения как *in vivo*, так и *in vitro* на таких модельных системах, как первичные культуры ганглиев куриного эмбриона, клональная линия феохромоцитомы крысы РС-12 и др. [2—5]. В то же время практически не исследован вопрос о возможном влиянии фактора на клетки, составляющие окружение нервной ткани.

Целью данной работы было изучение влияния ФРН на пролиферативную активность клеток ненейронального происхождения. ФРН выделяли из семенной плазмы быка в гомогенном состоянии. Полученный фактор сходен с  $\beta$ -ФРН из подчелюстных желез мыши [6] и, как было показано нами ранее, обладает способностью вызывать рост нейритов у клеток феохромоцитомы РС-12 [7].

ФРН выделяли по методу Nagler и соавт. [6] в модификации Кондратьева и соавт. [8]. В качестве модели для исследования ненейрональных клеток *in vitro* использовали стационарную культуру фибробластов куриного эмбриона. Первичную культуру клеток получали по стандартной методике [9]. В эксперименте применяли вторичную культуру, растущую на покровных стеклах во флаконах, содержащих по 2 мл среды 199 с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС). Плотность посева составляла  $1-1,5 \cdot 10^5$  кл./мл. Стационарную культуру получали с помощью длительно (7 суток) содержания клеток без смены среды. Проллиферацию клеток стимулировали добавлением в среду ФРН в концентрациях от 1 нг/мл (0,034 нМ) до 1 мкг/мл (34 нМ), а также путем смены среды на свежую, содержащую 10% ЭТС с добавлением ФРН (0,9 нМ) и без него. Одновременно в среду вводили ЗН-тимидин в концентрациях

1 мкКи/мл для ранних (до 8 ч) и 0,1 мкКи/мл для более длительных сроков инкубации. На разных сроках покровные стекла с клетками промывали 0,9%-ным раствором NaCl, pH 7,2 и фиксировали в смеси этанол—ледяная уксусная кислота (3:1) 15 мин с последующей промывкой в этаноле 10 мин. Для радиоавтографии препараты покрывали жидкой эмульсией марки «М» (НИИХимфотопроект, Москва), после 7-суточной экспозиции проявляли, фиксировали, промывали в проточной воде и окрашивали красителем Гимза. Количество клеток, включивших  $^3\text{H}$ -тимидин, подсчитывали с помощью светового микроскопа при увеличении  $\times 1300$  (для каждого случая—2—3 тысячи клеток). Статистическую обработку проводили по общепринятой методике.

Протеазную активность препарата ФРН определяли по методу Kunitz [10], урокиназную активность—по методу Husain и соавт. [11]. Электрофорез в ПААГ в присутствии ДДС-Na проводили по методу Laemmli [12] с применением серебряного окрашивания [13].

Из данных, полученных в ходе эксперимента (рис. 1, а), следует, что после четкого выраженного лаг-периода длительностью 16—20 ч с момента введения ФРН (28 нг/мл) происходит стимуляция пролиферации клеток стационарной культуры фибробластов куриного эмбриона.

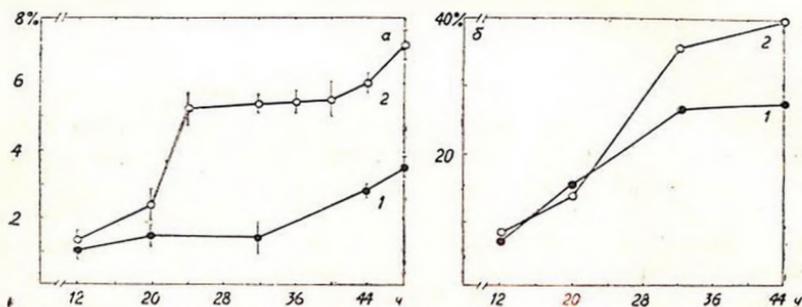


Рис. 1. Изменение индекса меченых клеток в стационарной культуре фибробластов куриного эмбриона на разных сроках инкубации. а—контроль (1), ФРН (2); б—смена среды на свежую (1), смена среды+ФРН (2). По оси абсцисс—время инкубации (ч), по оси ординат—индекс меченых клеток (%)

на. Максимум стимуляции приходится на период с 24 по 32 ч инкубации в присутствии ФРН, когда наблюдается более чем 3-кратное ( $p < 0,01$ ), по сравнению с контролем, увеличение числа клеток, вступивших в S-период клеточного цикла. Из экспериментальной кривой видно, что после 32 ч инкубации клеток с фактором соотношение индекса меченых клеток к контрольному уровню более не возрастает. Это свидетельствует о том, что новые группы клеток, по-видимому, не вовлекаются в пролиферативный процесс.

Смена среды на свежую значительно повышала включение  $^3\text{H}$ -тимидина в клетки. В то же время добавление ФРН (28 нг/мл) в сочетании со сменой среды (рис. 1, б) приводило к еще большему увеличению числа меченых клеток (35,7% на 32-ом часу инкубации), по сравнению со стимуляцией только сменой среды (26,8%,  $p < 0,01$ ). Судя по полученным результатам, действие ФРН и свежей среды по-

сит, по-видимому, аддитивный характер, поскольку при совместном действии двух факторов общее число меченых клеток близко к сумме их прироста под влиянием каждого из стимулов в отдельности. Возможно, в основе описанной аддитивности лежит реакция разных фракций клеточной популяции на различные пролиферативные стимулы.

При обработке культур в течение 28 ч ФРН в концентрациях от 1 нг/мл до 1 мкг/мл обнаруживалось зависящее от дозы фактора увеличение числа меченых клеток (рис. 2). Достоверные отличия от уровня меченых клеток в контрольных культурах, составляющего в данном

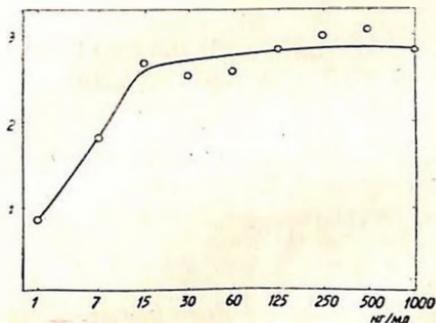


Рис. 2. Зависимость числа меченых клеток от концентрации ФРН в культуре фибробластов курного эмбриона (28 ч инкубации). По оси абсцисс—концентрация ФРН в среде, по оси ординат—отношение числа включившихся  $^3\text{H}$ -тимидин клеток к контрольному уровню (принят за 1)

опыте  $9,92 \pm 1,84\%$ , наблюдались в вариантах с ФРН, начиная с концентрации фактора в среде 7 нг/мл ( $p < 0,01$ ). Кривая концентрационной зависимости достигала плато при концентрациях фактора 15 нг/мл и выше. Следует отметить, что аналогичные дозы ФРН вызывают стимуляцию роста нейритов у клеток РС-12 [7].

В ряде работ [14—16] был показан митогенный эффект некоторых протеаз, обладающих эстеропептидазной активностью при добавлении их в культуральную среду в концентрациях от 0,1 мкг/мл до нескольких мкг/мл. В связи с этим провели тестирование используемого в эксперименте препарата ФРН в концентрациях от 20 нг/мл до 1 мкг/мл на наличие указанной активности. Протеазная активность препарата составляла менее 0,03% от активности трипсина, используемого в качестве контроля. Урокиназная активность, свойственная  $\gamma$ -субъединице ФРН (см. ниже), не была обнаружена. Высокая степень чистоты препарата по данным гель-электрофореза в ПААГ и практически полное отсутствие протеазной активности указывают на то, что эффект стимуляции пролиферации связан с действием именно ФРН из семенной плазмы быка. Для ФРН из подчелюстных желез мыши, где фактор находится в виде белкового комплекса, состоящего из трех типов субъединиц [1], подобный эффект был показан лишь для  $\gamma$ -субъединицы, проявляющей свойства эстеропептидазы и урокиназы [14, 17] и не обладающей нейритстимулирующей активностью, характерной только для  $\beta$ -субъединицы [1—4]. Указанные выше отличия в действии ФРН из семенной плазмы и подчелюстных желез мы-

ши, возможно, связаны со структурными [6], а может быть, и функциональными различиями факторов из разных источников.

Изложенные результаты свидетельствуют о способности фактора роста нервов из семенной плазмы быка служить пролиферативным стимулом для клеток стационарной культуры фибробластов курного эмбриона. Можно предположить, что ФРН является фактором, обладающим многообразными регуляторными функциями. Возможно, что *in vivo* на ранних стадиях эмбриогенеза он обеспечивает, с одной стороны, дифференцировку нервных клеток, а с другой—рост клеток окружения нейрона.

## STIMULATION OF CULTURED FIBROBLASTS PROLIFERATION BY NERVE GROWTH FACTOR FROM BOVINE SEMINAL PLASMA

MOVSESYAN V. A., KONDRATYEV A. D., \*MAGAKYAN U. A.,  
\*KOLIKHICHEVA N. A., \*\*GASPARYAN G. G., SEVERIN E. S.

Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow;

\*Institute of Experimental Biology, Academy of Sciences of the Arm. SSR,

\*\*Institute of Zoology, Academy of Sciences of the Arm. SSR, Yerevan

The influence of nerve growth factor (NGF) from bovine seminal plasma on proliferative activity of cells of non-neuronal origin was studied. Growth-stimulating ability of bovine NGF was demonstrated on the confluent stationary culture of chick embryo fibroblasts. About 3-fold increase in the number of <sup>3</sup>H-thymidine labelled cells was shown when the culture was incubated with the factor. The possible role of NGF in the regulation of proliferation and differentiation of cells of different origin is discussed.

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Thoenen H., Earde Y. A. *Physiol. Rev.*, v. 60, p. 1284—1335, 1980.
2. Yanker B. A., Shooter E. M. *Ann. Rev. Biochem.*, v. 51, p. 845—868, 1982.
3. Calissano P., Cattaneo A., Biocca S., Aloe L., Mercanti D., Levi-Montalcini R. *Exp. Cell. Res.*, v. 154, p. 1—9, 1984.
4. Green L., Tishler A. *Adv. in cell. Neurobiol.*, v. 3, p. 373—414. Acad. Press, New York, 1982.
5. Калюнов В. И. Фактор роста нервной ткани. Минск. Наука и техника. 1984.
6. Harper G. P., Glanville R. W., Thoenen H. J. *Biol. Chem.*, v. 257, p. 8541—8548, 1982.
7. Мовсесян В. А., Кондратьев А. Д., Дудкин С. М. Материалы VIII объединенного симпозиума биохимических обществ СССР и ГДР, Рига, 1985.
8. Кондратьев А. Д., Мовсесян В. А., Курочкин С. И., Дудкин С. М., Северин Е. С. Биотехнология, т. 1, № 2, с. 91—97, 1985.
9. Rein A., Rubin H. *Exp. Cell. Res.*, v. 49, p. 666, 1968.
10. Kunitz M. J. *Gen. Physiol.*, v. 30, p. 291—296, 1947.
11. Husain S. S., Lipinski B., Gurewicz V. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 78, p. 4265—4269, 1981.

12. Laemmli U. K. Nature, v. 227, p. 680—851, 1970.
13. Wray W., Bouliskas T., Wray V., Nancock R. Anal. Biochem., v. 113, p. 197—203, 1981.
14. Green L. A., Tomita J. T., Varon S. Exp. Cell. Res., v. 64, p. 387—395, 1971.
15. Burger M. M. Nature, v. 227, p. 170—172, 1970.
16. Teng N. H., Chen L. B. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 72, p. 413—417, 1975.
17. Orenstein N. S., Dvorak H. F., Blanchard M. H., Joung M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 75: p. 5497—5500, 1978.

Поступила 25. VII 1985

СОДЕРЖАНИЕ ПЕПТИД ДЕЛЬТА-СНА-ПОДОБНОГО  
МАТЕРИАЛА В ГОЛОВНОМ МОЗГУ КРЫС В НОРМЕ И ПРИ  
ХОЛОДОВОМ СТРЕССЕКРУПЕНИКОВА Е. Ю., \*ЮХАНАНОВ Р. Ю., \*\*МИХАЛЕВА И. И.,  
БОНДАРЕНКО Т. И.Кафедра биохимии и биотехнологии Ростовского государственного университета им. М. А. Суслова;  
\*Институт фармакологии АМН СССР; \*\*Институт биоорганической химии  
им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва

Вовлечение пептидергических структур ЦНС в процессе приспособления к действию различных факторов среды обеспечивает более длительную мобилизацию адаптационных и компенсаторных механизмов, поскольку их активация, как правило, приводит к целому ряду изменений, оказывающих продолжительные эффекты на обмен веществ в организме [1].

Немаловажную роль в процессах адаптации к сильным стрессорным воздействиям в последнее время отводят пептиду дельта-сна, имеющему строение Trp-Ala-Gly-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu (ПДС) [2], который был открыт Mopnier и соавт. [3] как фактор регуляции медленноволновой фазы сна. К настоящему времени считается, что действие ПДС на сон не прямое, а опосредуется его антистрессорной активностью [4].

Нами ранее было показано [5], что доза 12 мкг ПДС/100 г массы, введенная внутривенно, препятствует стрессорным изменениям в организме на начальном этапе холодового воздействия и способствует более быстрому, чем при естественной адаптации, выходу животных из состояния холодового стресса.

Целью данной работы являлось исследование динамики содержания ПДС в головном мозгу интактных и подвергнутых холодовому стрессу крыс при введении им препарата ПДС\*.

Опыты проводили на беспородных белых крысах-самцах массой 120—150 г. Подопытных животных содержали в холодовой камере при 0—3° в течение 3 суток. Этот период определяется как стрессорный, что выявляется по гормональным сдвигам и усилению катаболизма [6, 7].

\*Препарат синтезирован в Институте биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва.

Контрольным и подопытным животным вводили внутривенно ПДС в дозе 12 мкг/100 г массы. ПДС хорошо проникает через ГЭБ при его периферическом введении [8, 9].

После декапитации животных быстро извлекали головной мозг и немедленно погружали его в жидкий азот. Замороженный мозг измельчали до кусочков массой 50 мг, затем кипятили в течение 10 мин с 0.1 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , гомогенизировали и центрифугировали при 20000 g на холоду. Осадок дважды промывали 0.1 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , объединенный супернатант лиофилизировали. Дальнейшее определение ПДС-подобного материала проводили методом радиоиммунологического анализа, описанным в работе Рожанец и соавт. [10].

Из таблицы видно, что в мозгу интактных крыс содержится  $0.24 \pm 0.04$  фмоль/мг ткани ПДС-подобного материала.

Полученные нами результаты ниже по сравнению с данными, приведенными в литературе [10-11]. Это, вероятно, может быть обусловлено, во-первых, различием породы, возраста и условий содержания животных; а во-вторых, большей специфичностью использованных нами антител и разницей в химической структуре меченых антигенов.

Введение 12 мкг ПДС/100 г массы контрольным животным и определение его содержания через 3 суток после введения не изменяет уровня ПДС-подобной иммуореактивности (ИР) в головном мозгу.

При действии низких температур в течение 3 суток концентрация ПДС-подобного материала в головном мозгу в среднем увеличивалась в 14,2 раза по сравнению с контролем. При введении ПДС холодным животным уровень ПДС-подобной ИР в головном мозгу выше контрольного почти на 500 %, однако в 2,4 раза ниже, чем при холодовом стрессе.

Действие низких температур активирует процессы распада белков головного мозга [12]. Вполне вероятно, что наблюдаемое нами увеличение ПДС-подобной ИР в головном мозгу крыс является следствием активирования реакций ограниченного протеолиза, в результате которого возможно образование ПДС-подобных пептидов. На эту мысль наводят данные компьютерного поиска, осуществленного National Biomedical Research Foundation, Washington, обнаружившего присутствие 5-членной последовательности ПДС в некоторых белковых фрагментах, а также в составе 48-членного пептида задней доли гипофиза быка [13].

Для многих пептидов, в том числе и для ПДС, установлена колоколообразная зависимость их активности от дозы [14]. Известно, что влияние  $\beta$ -эндорфина на секрецию глюкокортикоидов зависит от дозы. Показано также, что небольшие дозы  $\beta$ -эндорфина ( $10^{-11}$ — $10^{-5}$  М) снижают продукцию кортикостероидов, а в более высоких концентрациях ( $10^{-4}$  М)  $\beta$ -эндорфин повышает их образование [15].

Вполне вероятно, что разные дозы ПДС также могут обладать противоположными эффектами. Так, в исследованиях Schoenenberger, Monnier [16] показано, что дозы ПДС от 2 до 7 нмоль/кг при внутривенном введении оказывают соннотриптический эффект, тогда

как дальнейшее увеличение дозы до 12 нмоль/кг подавляет его и даже приводит к обратному эффекту, то есть вызывает неожиданно высокую моторную активность.

Таблица

Содержание пептид дельта-сна-подобного материала в головном мозгу крыс при действии холода и введении 12 мкг ПДС/100 г массы (n=4-5)

Условия опыта	Концентрация фмоль/мг ткани
Контроль	0,24±0,04
Контроль + ПДС	0,31±0,10
Холод	3,39±0,26*
Холод + ПДС	1,42±0,25*

Примечание. Статистически достоверные различия по отношению к контролю (\*p<0,01).

Возможно, содержание ПДС в головном мозгу в состоянии холодового стресса настолько превышает физиологический уровень, что ведет не к стабилизации, а к нарушению метаболических процессов.

Ранее нами было показано, что предварительное введение 12 мкг ПДС/100 г массы холодным животным способно стабилизировать многие обменные процессы, нарушающиеся при воздействии холода. Это выражается в нормализации уровня содержания тормозного нейромедиатора гомокарнозина и возбуждающего медиатора гистамина, предотвращении изменения субстратной специфичности MAO типа А, принимающей участие в обмене некоторых медиаторов, и стабилизации клеточных мембран [5]. Состояние метаболизма при этом у животных приближается к состоянию, характерному для естественной адаптации.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что состояние холодового стресса характеризуется резким повышением в мозгу (более чем в 14 раз) по сравнению с контролем содержания ПДС-подобного материала. Антистрессорный же эффект ПДС при холодовом стрессе наблюдается при его концентрации в мозгу, почти в 6 раз превышающей физиологический уровень.

## DELTA SLEEP-INDUCING PEPTIDE-LIKE MATERIAL LEVEL IN RAT BRAIN AT NORMAL CONDITIONS AND COLD STRESS

KRUPENNIKOVA E. Yu., YUKHANANOV R. Yu., MIKHILEVA I. I.,  
BONDARENKO T. I.

Rostov-on-Don State University, Institute of Pharmacology, USSR  
Academy of Medical Sciences, Moscow

Exposure to low temperature (0+3°C) for 3 days increases 14,2-fold the level of DSIP-like immunoreactivity in rat brain compared to control animals. DSIP (12 mcg/100g b. w., i. p. injection) has antistress effect at cold stress, the level of DSIP-like activity being 6 times higher than physiological one.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Микарченко А. Ф., Динабург А. Д., Завадская Г. Я.—В кн.: Нейромедиаторы в норме и патологии. Тезисы докл. Всесоюзн. симпози., с. 221—223, Казань, 1979.
2. Коплик Е. В., Ведяев В. Ф., Михалева Н. Н., Саргсян А. С., Иванов В. Т., Суляков К. В. Докл. АН СССР, т. 267, № 1, с. 230—233, 1982.
3. Monnier M., Dudler L., Gächter R., Maier P. F., Schoenenberger G. A. *Experientia*, v. 33, p. 548—552, 1974.
4. Tobler J., Borbely A. A. *Waking and Sleeping*, v. 4, p. 139—153, 1980.
5. Кричевская А. А., Бондаренко М. И., Горошинская Н. А., Крупеникова Е. Ю., Михалева Н. Н., Ходакова А. А.—В кн.: Стресс, адаптация и функциональные нарушения, с. 343. Книгинез, Шттинца, 1984.
6. Щеглова А. И.—В кн.: Физиологические адаптации к теплу и холоду, с. 70—77. Л., Наука, 1969.
7. Ардашев А. А., Селикина В. В., Мосин А. Ф.—В кн.: Нейроэндокринные корреляции, с. 77—84, Владивосток. ДВНЦ, 1978.
8. Monnier M., Dudler L., Gächter R., Schoenenberger G. A. *Experientia*, v. 33: p. 1609—1610, 1977.
9. Olson R. D., Kastin A. J., Montalbano-Smith D., Olson G. A., Coy D. H., Mitchell G. F. *Pharm., Biochem. and Behav.*, v. 9, p. 521—524, 1978.
10. Рожанец В. В., Юханянов Р. Ю., Чижевская М. А., Наволоцкая Е. В. *Нейрохимия*, т. 2, № 4, с. 353—363, 1983.
11. Kastin A. J., Nissen C., Schally A. V., Coy D. H. *Brain Res. Bull.*, v. 3, p. 691—695, 1978.
12. Ломкина Л. В. *Укр. биохим. журн.*, т. 52, № 3, с. 305—309, 1980.
13. Preddie E. C. *J. Biol. Chem.*, v. 240, p. 4194—4203, 1965.
14. Polc P., Schneeberger J., Haefely W. *Neurosci. Lett.*, v. 9, p. 33—36, 1978.
15. Szalay K. S., Stark E. *Life Sci.*, v. 29, № 13, p. 1355—1361, 1981.
16. Schoenenberger G. A., Monnier M.—In: IUPAC Medical Chemical Proc. Vth Internat. Symp. Med. Chem. Brighton, p. 101, Cotswold Press, Oxford, 1978.

Поступила 11. X 1985.



УДК 577.15+577.3+591.39

АНИОНЧУВСТВИТЕЛЬНАЯ АТРаза В СУБКЛЕТОЧНЫХ  
ОБРАЗОВАНИЯХ МОЗГА КУР В ОНТОГЕНЕЗЕ

АСАТРЯН Р. М., БАДАЛЯН Р. Б., СИМОНЯН А. А.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

К аниончувствительным АТРазам относят ферментные системы, осуществляющие гидролиз АТР, зависимый от анионов и, в первую очередь, от бикарбоната. Они широко распространены в бактериальных, растительных и животных организмах и играют важную роль в биоэнергетике клетки. Выдвинуто несколько гипотез для объяснения чувствительности к анионам АТР-гидролазной реакции, но единого мнения по этому вопросу пока не существует.

При изучении продуктов расщепления АТР в присутствии  $\text{HCO}_3^-$  было обнаружено незначительное образование АМР и преимущественный гидролиз до АДФ и  $\text{P}_i$  [1—4], что свидетельствует о том, что в этих условиях отщепляется только  $\gamma$ -фосфат.

Анионзависимые АТРазы различных клеточных структур находятся в мембраносвязанном и растворимом состоянии, сходны по субклеточному составу и обладают одинаковой чувствительностью к активаторам и ингибиторам [5].

Имеется очень мало сведений о локализации и свойствах анион-стимулируемых АТРаза в нервной ткани животных. Исследование фермента в структурных образованиях мозга выявило значительные различия во внутриклеточном распределении ее активности у крыс и обезьян [6].

Настоящая работа посвящена онтогенетическому изучению свойств  $\text{HCO}_3^-$  и  $\text{SO}_3^{2-}$ -стимулируемых АТРаза в субклеточных структурах мозга кур. Исследовано также участие двухвалентных катионов в регуляции активности фермента в митохондриальной фракции мозга кур в ходе эмбрионального и постэмбрионального развития.

Опыты проводили на 13-, 17-, 20-дневных эмбрионах, 1-, 5-дневных цыплятах и зрелых курах. Гомогенизацию ткани мозга проводили в гомогенизаторе типа Potter [7]. Митохондрии выделяли при 0—4° в 0,25 М сахарозе и 0,02 М трис-НСl буфере, рН 7,4. Ядерную фракцию осаждали при 800g 10 мин, а митохондрии—при 16000g 15 мин. Полученную митохондриальную фракцию промывали средой выделения. Для получения микросомной фракции надосадочную жидкость центрифугировали при

Таблица 1

Влияние  $\text{HCO}_3^-$  и  $\text{SO}_3^{2-}$  на активность АТФазы в субклеточных образованиях мозга кур в онтогенезе.  $\Delta P$  в мкатамах/мг белка

Субклеточные образования	Добавленный аннон	13-дневные эмбрионы	Прирост активности в %	17-дневные эмбрионы	Прирост активности в %	20-дневные эмбрионы	Прирост активности в %	1-дневные цыплята	Прирост активности в %	5-дневные цыплята	Прирост активности в %	Куры	Прирост активности в %
Митохондрии	контроль	2,43±0,06		3,52±0,04		4,28±0,08		5,13±0,19		5,81±0,17		5,16±0,11	
	$\text{HCO}_3^-$	3,81±0,04 <sup>3</sup>	56	4,31±0,06*	22	4,50±0,09	5	5,55±0,07 <sup>3</sup>	8	6,04±0,06	4	5,66±0,10 <sup>4</sup>	9
	$\text{SO}_3^{2-}$	3,98±0,07 <sup>2</sup>	63	4,33±0,04	23	4,75±0,12 <sup>3</sup>	10	5,48±0,08	6	5,87±0,05	2	5,50±0,13	6
Мембраны митохондрий	контроль	3,76±0,04		4,95±0,13		5,81±0,07		6,01±0,18		6,16±0,14		5,73±0,08	
	$\text{HCO}_3^-$	5,49±0,06 <sup>3</sup>	46	5,53±0,09*	11	6,62±0,08*	13	7,17±0,18*	19	6,56±0,07 <sup>3</sup>	6	6,03±0,22	5
	$\text{SO}_3^{2-}$	5,36±0,08*	55	5,53±0,08*	11	6,30±0,11*	8	6,73±0,18*	11	6,16±0,10	—	5,85±0,17	2
Микросомы	контроль	7,20±0,23		8,09±0,27		13,37±0,61		18,75±0,27		18,35±0,47		12,74±0,33	
	$\text{HCO}_3^-$	10,82±0,02 <sup>3</sup>	50	12,67±0,22*	56	25,25±0,41*	45	31,72±0,86 <sup>3</sup>	69	28,95±0,80 <sup>4</sup>	57	21,86±0,66*	71
	$\text{SO}_3^{2-}$	9,69±0,12*	34	12,20±0,30*	50	24,18±0,54 <sup>3</sup>	39	28,96±0,76 <sup>3</sup>	54	26,28±0,64 <sup>3</sup>	43	17,18±0,69*	34

Примечание. Здесь и в табл. 2 количество опытов 4—12; \*статистически достоверные данные ( $p < 0.05—0.001$ ).

105000g 30 мин. Мембранные структуры митохондрий получали 3-кратным замораживанием-оттаиванием фракции с последующим центрифугированием при 105000g.

$\text{HCO}_3^-$  и  $\text{SO}_3^{2-}$ -чувствительную АТРАЗную активность определяли в среде, содержащей 1 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 2 мМ АТФ и 60 мМ  $\text{NaHCO}_3$  или  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  [8]. Контрольные опыты вместо  $\text{NaHCO}_3$  или  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  содержали соответственно 60 или 120 мМ  $\text{NaCl}$ . Активность фермента в присутствии двухвалентных катионов определяли, заменяя  $\text{MgCl}_2$  на хлориды соответствующих металлов в эквимольных количествах. Объем раствора доводили до 1 мл 0,25 М сахарозой трис- $\text{HCl}$  буфер, рН 7,4. Инкубацию проводили при 37° в течение 30 мин. Об активности АТРАЗы судили по изменению в среде содержания  $\text{P}_i$  [9], белок определяли по Lowry и соавт. [10].

Результаты наших экспериментов показали, что в изолированных митохондриях мозга активность  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРАЗы возрастает с 13 дня развития до вылупления цыпленка (табл. 1). Повышенная активность фермента отмечается и в митохондриях 5-дневных цыплят. Подобная динамика выявлена в митохондриальных мембранах и микросомной фракции. Характерно также, что в микросомной фракции выявляется наибольшая активность фермента в течение всего онтогенеза.

При исследовании стимуляции  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРАЗы бикарбонатом оказалось, что на 13-й день развития в интактных митохондриях мозга  $\text{HCO}_3^-$  повышает гидролиз АТФ на 56%. В ходе эмбрионального развития чувствительность к  $\text{HCO}_3^-$  снижается. Аналогичный сдвиг активности АТРАЗы наблюдается и в мембранах митохондрий. В микросомной фракции аниончувствительная АТРАЗная активность поддерживается на высоком уровне на протяжении всего эмбрионального периода и сохраняется после вылупления. Почти во всех исследованных сроках развития цыпленка активность  $\text{HCO}_3^-$  стимулируемой АТРАЗы в микросомах намного выше по сравнению с интактными митохондриями и их мембранными структурами. Чувствительность гидролиза АТФ к  $\text{SO}_3^{2-}$ , динамика ее изменений в основном такие же, как при активировании фермента  $\text{HCO}_3^-$ . Можно сделать предположение о важной физиологической роли аниончувствительной АТРАЗы митохондрий мозга на раннем этапе эмбрионального развития кур. В процессе развития, по-видимому, имеет место перераспределение активности фермента между отдельными структурными образованиями нервной клетки.

Известно, что для проявления активности аниончувствительной АТРАЗы необходимо присутствие двухвалентного катиона [11—15]. Имеющиеся данные указывают на то, что в присутствии  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  расщепление АТФ происходит, как правило, примерно с одинаковой скоростью [16—19]. Но следует отметить, что скорость гидролиза АТФ при наличии этих катионов еще не определяет их эффективность в качестве агента, способствующего стимуляции АТРАЗной реакции анионами.

Представляет интерес изучение влияния двухвалентных катионов на  $\text{HCO}_3^-$  и  $\text{SO}_3^{2-}$ -активируемую АТРАЗную активность при онтогенетическом развитии (табл. 2). Легко заметить, что различные катионы

Таблица 2

$\text{HCO}_3^-$ - и  $\text{SO}_3^{2-}$ -чувствительная АТРазная активность митохондрий мозга в присутствии двухвалентных катионов в онтогенезе кур.  $\Delta P$  в мкатомах/мг белка

Условия опыта	13-дневные эмбрионы	Прирост активности в %	20-дневные эмбрионы	Прирост активности в %	5-дневные цыплята	Прирост активности в %	Куры	Прирост активности в %
$\text{Mg}^{2+}$	контроль	2,43±0,06		4,28±0,03		5,81±0,17		5,16±0,11
	$\text{HCO}_3^-$	3,81±0,04*	56	4,50±0,09	5	6,04±0,06	4	5,66±0,10*
	$\text{SO}_3^{2-}$	3,98±0,07*	63	4,75±0,12*	10	5,87±0,05	2	5,50±0,13
$\text{Mn}^{2+}$	контроль	2,58±0,10		4,01±0,11		4,87±0,07		5,13±0,25
	$\text{HCO}_3^-$	3,61±0,07*	61	4,76±0,16*	18	5,59±0,18*	14	6,29±0,08*
	$\text{SO}_3^{2-}$	3,13±0,11*	20	4,50±0,17*	11	5,62±0,16*	15	5,47±0,10
$\text{Ca}^{2+}$	контроль	2,10±0,01		3,45±0,13		5,09±0,17		4,88±0,21
	$\text{HCO}_3^-$	4,09±0,08*	94	3,96±0,08*	15	6,70±0,16*	12	6,00±0,10*
	$\text{SO}_3^{2-}$	3,19±0,18	20	3,47±0,10	—	4,95±0,20	2	5,03±0,22
$\text{Zn}^{2+}$	контроль	3,16±0,11		3,17±0,07		4,93±0,28		4,68±0,19
	$\text{HCO}_3^-$	2,62±0,13*	—	2,60±0,14*	—	2,70±0,23*	—	3,70±0,30*
	$\text{SO}_3^{2-}$	3,21±0,12	—	2,71±0,07*	—	4,30±0,14*	—	4,44±0,24
$\text{Co}^{2+}$	контроль	2,82±0,26		4,14±0,17		5,42±0,12		5,75±0,03
	$\text{HCO}_3^-$	3,46±0,15*	22	4,64±0,15*	12	5,59±0,10	—	6,69±0,04*
	$\text{SO}_3^{2-}$	3,92±0,02*	32	4,18±0,06	—	6,69±0,13*	11	6,00±0,22
$\text{Ni}^{2+}$	контроль	1,71±0,06		3,06±0,05		4,43±0,17		3,84±0,10
	$\text{HCO}_3^-$	1,99±0,05*	16	2,91±0,17	—	2,65±0,20*	—	3,30±0,19
	$\text{SO}_3^{2-}$	2,39±0,19*	39	2,81±0,09*	—	3,89±0,16*	—	4,30±0,22
$\text{Cd}^{2+}$	контроль	2,98±0,17		2,95±0,07		4,29±0,04		4,26±0,13
	$\text{HCO}_3^-$	3,01±0,14	—	3,68±0,11*	24	4,73±0,04*	10	5,64±0,42*
	$\text{SO}_3^{2-}$	3,13±0,14	5	3,19±0,19	—	4,76±0,08*	9	4,94±0,31

оказывают неодинаковое действие на АТФазную активность в митохондриях мозга. Значительное активирующее влияние в мозгу 13-дневных эмбрионов отмечается в присутствии  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ . У 20-дневных эмбрионов наибольший распад АТФ наблюдается в присутствии  $Mg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ , а  $Cd^{2+}$  даже ингибирует гидролиз АТФ. При дальнейшем развитии активирующее действие отдельных катионов варьирует.

Высокая активность аниончувствительной АТФазы в присутствии некоторых катионов наблюдается в начале плодного периода эмбрионального развития кур: бикарбонат заметно стимулирует АТФазную активность. Присутствие  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  не влияет на интенсивность гидролиза АТФ в случае с  $Cd^{2+}$ , а с  $Zn^{2+}$  даже несколько подавляет ее. Стимулирование бикарбонатом АТФазы в присутствии различных катионов по ходу развития эмбриона заметно понижается. При этом сохраняется ингибирующее влияние  $HCO_3^-$  с  $Zn^{2+}$ , а в случае с  $Ni^{2+}$  активность фермента несколько повышается.

В изученные сроки по-разному действует присутствие двухвалентных катионов на  $SO_3^{2-}$ -стимулируемую активность. В митохондриях мозга на 13-й день развития  $SO_3^{2-}$  стимулирует активность фермента в присутствии  $Mg^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ . В последующие сроки развития  $SO_3^{2-}$ -АТФазная активность заметно снижается, а в присутствии  $Cd^{2+}$  и  $Zn^{2+}$  — полностью угнетается. Полученные результаты свидетельствуют о неодинаковой эффективности различных двухвалентных катионов в АТФ-гидролазной реакции, осуществляемой аниончувствительными АТФазами.

## ANION-SENSITIVE ATPase IN THE SUBCELLULAR FRACTIONS OF HEN BRAIN IN ONTOGENESIS

ASATRIAN R. M., BADALIAN R. B., SIMONIAN A. A.

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

High activity of ATPase stimulated by  $HCO_3^-$  and  $SO_3^{2-}$  has been detected in mitochondria and their membranes at the beginning of the embryonic development of hen. During the following stages of development the intensity of the hydrolysis of ATP has been reduced. The high level of ATP has been reduced. The high level of ATP hydrolysis by anion-sensitive ATPase has been retained in microsomal fraction during the whole period of ontogenesis. Bivalent cations exert different effects on the anion-sensitive ATPase activity at various stages of hen development.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Fanestil D. D., Hastings A. B.* J. Biol. Chem., v. 238, p. 836—842, 1963.
2. *Liang C. T., Sactor B.* Arch. Biochem. and Biophys., v. 176, p. 285—287, 1976.
3. *Ishida M., Mizushima S.* J. Biochem., v. 66, № 1, p. 33—43, 1969.
4. *Marunouchi T., Mori T.* J. Biochem., v. 62, № 4, p. 401—407, 1967.
5. *Иващенко А. Т.* Аннионные аденозинтрифосфатазы, Алма-Ата, Наука, 1982.
6. *Kimelberg H. K., Bourke R. S.* J. Neurochem., v. 20, № 2, p. 347—359, 1973.
7. *Potter V. R., Elvehjem C. A.* J. Biol. Chem., v. 114, № 2, p. 495—504, 1934.
8. *Иващенко А. Т.* Вест. АН КазССР, № 8, с. 73—75, 1977.
9. *Lowry O. H., Lopez J. S.* J. Biol. Chem., v. 162, p. 421—433, 1946.
10. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* J. Biol. Chem., v. 193 p. 265—275, 1951.
11. *Иващенко А. Т.* Биол. науки, № 1, с. 25—33, 1977.
12. *Иващенко А. Т.* Биохимия, т. 43, № 6, с. 1086—1089, 1978.
13. *Иващенко А. Т.* Изв. АН КазССР. Сер. биол. н., № 1, с. 22—25, 1979.
14. *Иващенко А. Т.* Биохимия, т. 45, № 3, с. 424—429, 1980.
15. *Скулачев В. П., Козлов И. А.* Протонные аденозинтрифосфатазы, М., Наука, 1977.
16. *Мальян А. П., Аққлова Е. А.* Биохимия, т. 43, № 7, с. 1206—1211, 1978.
17. *Morisawa M., Utida S.* Biochim. et biophys. acta, v. 445, № 2, p. 458—463, 1976.
18. *Rensis G. de, Bornancin M. A.* Biochim. et biophys. acta, v. 467, № 2, p. 192—207, 1976.
19. *Sachs G., Mitch W. E., Hirschowitz B.* Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., v. 119, № 4, p. 1023—1027, 1965.

Поступила 20. II 1985



УДК 577.151.042

**ВЛИЯНИЕ БЕЛКОВ НА АКТИВНОСТЬ РАСТВОРИМОЙ ФОРМЫ  
ФОСФАТЗАВИСИМОЙ ГЛУТАМИНАЗЫ МОЗГА**

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

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Митохондриальные фракции мозга и почек содержат мембрано-связанную и растворимую формы фосфатзависимой глутаминазы. Показано, что кинетические и регуляторные свойства этих глутаминаз по ряду параметров принципиально отличаются [1—7]. Обе формы фермента активируются фосфатом, однако мембраносвязанная глутаминаза более чувствительна к этому эффектору, чем растворимая. Такие эффективные активаторы мембраносвязанного фермента как тиреоидные гормоны, цитрат, малеат, сукцинат и другие либо вообще не действуют на активность растворимой глутаминазы, либо оказывают незначительное стимулирующее влияние. В то же время одновременное применение трийодитиронина ( $T_3$ ) с фосфатом, цитратом и другими соединениями приводит к многократному повышению активности растворимой глутаминазы. При этих же сочетаниях эффекторов активность мембраносвязанной глутаминазы повышается всего лишь в 2—3 раза [4, 5]. Основная часть глутаминазы мозга прочно связана с мембранами митохондрий и даже при повторных процедурах замораживания-размораживания не переходит в раствор, между тем как аналогичная обработка гомогенатов коры почек крыс приводит к высвобождению новых порций растворимого фермента с присущими ему регуляторными свойствами [6]. Очевидно, фермент почек прочно связан с компонентами митохондриальной мембраны (белками и фосфолипидами) и легко переходит в раствор. В связи с этим возникает вопрос, зависит ли регуляция активности растворимой глутаминазы от ее взаимодействия с окружающими белками, для выяснения которого было изучено влияние осадка грубой митохондриальной фракции мозга на растворимую глутаминазу, выделенную из этой же фракции. Мягкой тепловой обработкой осадка предварительно инактивировали мембраносвязанную форму глутаминазы.

Исследования, проведенные на растворимой глутаминазе, полученной по ранее описанной методике [4], показали, что при добавле-

ния осадка (200—600 мкг на пробу) чувствительность фермента к низким концентрациям фосфата несколько повышается, а к  $T_3$  и другим соединениям не изменяется. Вместе с этим выяснилось, что при одновременном добавлении фосфата с  $T_3$  активность фермента в присутствии осадка сильно подавляется. Если в отсутствие осадка  $T_3$  усиливает действие фосфата на растворимую глутаминазу в 16—17 раз, то в его присутствии эффект фосфата усиливается всего лишь в 5—6 раз. Активность растворимой глутаминазы также сильно подавляется при сочетанном применении  $T_3$  с цитратом и другими соединениями. Проведенные исследования показали, что митохондриальная фракция, лишенная растворимой глутаминазы, также как и синапсомная оказывают действительное, аналогичное осадку.

По данным McGivan, Bradford [8], чувствительность печеночной глутаминазы к фосфату частично восстанавливается при добавлении фосфолипидов. По-видимому, повышение чувствительности растворимой глутаминазы мозга к фосфату в присутствии осадка грубой митохондриальной фракции обусловлено его фосфолипидными компонентами. Об этом свидетельствует тот факт, что испытанные нами препараты коммерческих белков не повышают чувствительности растворимого фермента мозга к фосфату. Выяснилось, что альбумин, глобулин, лизоцим, цитохром «С» (290—600 мкг на пробу) и другие белки-ферменты сильно подавляют эффект потенцирования, наблюдаемый при совместном применении фосфата, цитрата и других соединений с  $T_3$ . Следует указать, что применяемые нами белки не в одинаковой степени тормозят активность фермента. Большинство из них подавляет активность растворимой глутаминазы сильнее, чем осадок грубой митохондриальной фракции.

Таким образом, наряду со многими низкомолекулярными физиологическими соединениями различной природы белки также участвуют в регуляции активности растворимой глутаминазы мозга, избирательно подавляя только эффект потенцирования.

## INVOLVEMENT OF PROTEINS IN THE REGULATION OF SOLUBLE PHOSPHATE-DEPENDENT BRAIN GLUTAMINASE

OGANESYAN, V. S., BADALYAN L. L., BEJANYAN K. D.

Institute of Biochemistry, Armenian SSR Academy of Sciences, Yerevan

A number of commercial proteins (albumin, globulin etc) as well as the pellet of crude mitochondrial fraction affect the activity of soluble form of phosphate-dependent brain glutaminase. The proteins mentioned diminish the activating effect of triiodothyronine-phosphate and triiodothyronine-citrate pair on the activity of enzyme. The pellet increases the stimulating effect of phosphate while the proteins don't alter it.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Nimmo G., Tipton K. F. J. Neurochem., v. 33, p. 1083—1094, 1979.
2. Nimmo G., Tipton K. F. Biochem. Pharmacol., v. 30, p. 1635—1641, 1981.
3. Nimmo G., Tipton K. F. Eur. J. Biochem., v. 117, p. 57—64, 1981.
4. Беджанян К. Д., Бадалян Л. Л., Оганесян В. С. Нейрохимия, т. 4, с. 379—387, 1985.
5. Оганесян В. С., Амбарцумян В. Г., Беджанян К. Д. Нейрохимия, т. 3, с. 372—381, 1984.
6. Оганесян В. С., Бадалян Л. Л., Бунятыян Г. Х. Докл. АН АрмССР, т. 69, № 4, с. 243—245, 1979.
7. Бадалян Л. Л., Оганесян В. С. Бюл. журн. Армении, т. 35, № 1, с. 29—36, 1982.
8. McIlivan J. D., Bradford M. N. Biochem. J., v. 214, p. 649—652, 1983.

Поступило 5. 11 1985



## ЛИПИДЫ НЕРВНОЙ ТКАНИ

(по материалам X Международного собрания по нейрохимии,  
Рива-дель-Гарда, Италия, май 1985 г.)

АВРОВА Н. Ф.

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

В последние годы наблюдается быстрый прогресс в области липидологии. Липиды, содержащиеся в наиболее высокой концентрации в нервной ткани, всегда вызывали особый интерес исследователей. Многим из них (например, ганглиозидам, цереброзидам) свойственны специфические функции в процессах жизнедеятельности нервных и глияльных клеток.

На X Международном нейрохимическом собрании в Рива-дель-Гарда (Италия), состоявшемся в мае 1985 г., липиды были посвящены специальные симпозиумы, коллоквиумы, разделы стендовых сообщений. Им отводилась видная роль и при обсуждении биохимических механизмов трансдукции сигнала в клетке, межклеточного взаимодействия, регенерации, старения и других процессов. Применение различных методических подходов, проведение комплексных исследований с привлечением ученых различной специализации (биохимиков, иммунологов, морфологов и др.) позволило в последние годы добиться существенных успехов в понимании функциональной роли различных липидов.

Целью настоящего обзора, составленного по материалам X Международного нейрохимического собрания, является описание новейших достижений в исследовании структурного многообразия, локализации, обмена и функциональной роли липидов нервной ткани. Наиболее полно освещено участие фосфоинозитидов и продуктов их обмена в реализации клеточного ответа на воздействие различных эффекторов, роль ганглиозидов в обеспечении жизнеспособности, регенерации и пластичности нервных клеток, регуляторная роль и особенности метаболизма биоактивных продуктов перекисного окисления липидов (простагландинов, лейкотриенов и др.), то есть обсуждались те вопросы, которые в настоящее время находятся в центре внимания ученых, занимающихся изучением липидов нервной ткани.

*Фосфоинозитиды нервной ткани. Участие этих липидов и продуктов их обмена в трансдукции сигнала в клетке.* Из всех фосфолипидов наибольшее внимание в современной научной литературе уделяется фосфоинозитидам. Чем же объяснить повышенный интерес к этим соединениям? В последние годы установлено, что взаимодействие ряда эффекторов (медиаторов, гормонов) с их рецепторами на наружной поверхности плазматической мембраны влияет на обмен веществ в клетке через посредство сложной последовательности реакций, включающих расщепление полифосфоинозитидов. Число известных вторичных мессенджеров, первым из которых был описан сАМР, пополнилось продуктами обмена полифосфоинозитида. Как показали в своих докладах *Hawthorne* и *Swilem* [1], *Agranoff* [2], *Downes* и *Ir.*

vine [3] и др., после взаимодействия лиганда с рецептором происходит фосфоэстеразное расщепление полифосфоинозитидов с образованием двух родов активных веществ (вторичных мессенджеров)—диацилглицерина и три- и дифосфоинозитов. Диацилглицерин активирует протеникиназную систему (протеникиназа С), тогда как трифосфоинозит, как правило, мобилизует кальций из внутриклеточных запасов. Показано наличие различных структурных изомеров трифосфоинозита (D-1, 4, 5  $\text{In}_3$ , D-1, 3, 4  $\text{In}_3$ , D-2, 4, 5  $\text{In}_3$  и др.), а также ди- и монофосфоинозита, включая циклические формы этих соединений. Сам инозит всегда представлен инозитом. Эти соединения отличаются друг от друга лишь по положению фосфатных остатков в их молекуле. Охарактеризованы различия в функциональной активности трифосфоинозитов [1—3].

Для познания тонких механизмов активации клеточного метаболизма с участием полифосфоинозитидов используют различные клеточные модели. Значительное повышение скорости обмена фосфоинозитидов происходит при воздействии медиаторов, их агонистов и антагонистов на срезы мозга и на культуры нервных клеток. Найдено, что скорость обмена этих соединений повышается при активации мускариновых рецепторов ацетилхолина, гистамин- $\text{H}_1$  рецепторов, 5-гидрокситриптамин $_2$  рецепторов, но не гистамин- $\text{H}_2$  рецепторов [4—6]. Интересно отметить, что существенное влияние на обмен фосфоинозитидов может оказывать литий. Этот широко применяемый в клинической практике катион тормозит, как было найдено, превращение монофосфоинозита в инозит [3]. Hawthorne, Swilem [1] на примере изучения воздействия эффекторов на мускариновые рецепторы хромаффинозных клеток надпочечников в культуре ткани установили, что активация фосфоинозитидного обмена не всегда может приводить к высвобождению иммобилизованного клеточного кальция. По-видимому, аналогичный механизм воздействия на клеточный метаболизм (через диацилглицерин и продукты его дальнейшего распада, но не через три- и дифосфоинозиты) имеет место и при активации тормозных мускариновых рецепторов в мозгу и сердце.

Одной из основных молекулярных разновидностей фосфоинозитидов в мозгу млекопитающих является 1-стеароил, 2-арахидоноил фосфоинозитид [7]. Поэтому под воздействием медиаторов можно ожидать высвобождения диацилглицерина соответствующего строения, а при его дальнейшем распаде арахидоновой и стеариновой кислот. Арахидоновая кислота может активировать аденилатциклазу, в этом случае активация протеникиназы может осуществляться сАМР. Увеличение при ряде судорожных воздействий содержания в ткани мозга свободной арахидоновой кислоты и дилицеридов, содержащих эту кислоту, связывают с увеличением скорости обмена фосфоинозитидов, выявляющихся наиболее вероятным источником этих соединений. Значительные изменения обмена фосфоинозитидов происходят при ишемии, при этом характерной особенностью биохимических изменений является сильно выраженное увеличение уровня свободных жирных кислот [1, 5, 7—9]. Таким образом, одним из биологически активных веществ, образующихся при распаде фосфоинозитидов и изменяющих клеточный метаболизм, является, по-видимому, и арахидоновая кислота.

*Фосфолипиды и стеролы нервной ткани в норме и при патологии.* На срезе были доложены интересные работы по изучению свойств другого кислого фосфолипиды—фосфатидилсерина. Найдено, что он необходим для проявления активности протеникиназы С и сфингомиелиназы [10, 11]. В случае протеникиназы С его эффект, по-видимому, является специфическим, причем фермент требует также наличия ионов кальция. Один из продуктов распада фосфоинозитидов—диацилглицерин—осуществляет, вероятно, свое активирующее влияние на протеникиназу С, увеличивая степень средства фермента к фосфотидилсерину и кальцию [10]. В случае сфингомиелиназы активирующее влияние, наряду с фосфатидилсеринном, способны оказывать и другие кислые липиды, например, фосфатидная кислота, но не фосфатидилхолин или фосфатидил этаноламин [11]. Galbiati и соавт. [12] нашли, что фосфатидилсерин, выделенный из мозга быка, является фармакологически активным фосфолипидом. Предпринимаются попытки понять механизм его действия. При си-

стематическом введении этого фосфолипида крысам активность цитозольной протеникиназы С у них значительно повышалась. В связи с тем, что активность этой фракции фермента существенно снижается с возрастом, препарат фосфатидилсерина может найти применение в клинической практике для лечения нарушений обмена веществ, имеющих место при старении [13].

Экзогенный фосфатидилсерин может включаться в состав наружных мембран нервных клеток (в этой работе были использованы первичные культуры нейронов из мозга эмбрионов мышенка). Как и в случае включения ганглиозидов в клеточные мембраны, различают две фазы этого процесса—обратимое связывание липида с мембраной и процесс «интернализации» липида мембраной [14].

Как известно, в нормальном мозгу млекопитающих холестерин присутствует, главным образом, в свободном виде, а содержание его эфиров является очень низким. При ряде неврологических болезней их содержание, однако, резко возрастает. *Ogawa* и соавт. [15] исследовали содержание и состав эфиров холестерина в мозгу человека при острых энцефалитах (демиелинизирующих расстройствах), вызванных различными вирусами. Они нашли, что существенное увеличение содержания эфиров холестерина происходит при тех болезнях, которые сопровождаются воспалительными процессами.

При изучении регенерации зрительной системы золотой рыбки было найдено, что большая степень жидкости клеток сетчатки (для ее измерения использовался метод поляризации флуоресценции) соответствует большей способности клеток к регенерации, к росту нейритов (отростков нервных клеток) [16]. При инкубации клеток сетчатки в культуре ткани с яичным лецитином образование нейритов значительно увеличивается (до 300—450 % по сравнению с контролями), тогда как холестерин, напротив, обладает тормозящим эффектом на рост нейритов, что, по мнению авторов, связано с изменением степени жидкости мембран под влиянием этих липидов, оказывающих разжижающий и конденсирующий эффект соответственно [16].

*Svennerholm* и соавт. посвятили свое сообщение динамике изменений состава липидов мозга с возрастом, а также при старческом и предстарческом слабоумии [17]. Наиболее выраженные изменения касались ганглиозидов и миелиновых липидов (цереброзидов и холестерина). Изменения в составе фосфолипидов были менее выражены. Содержание ганглиозидов считается адекватным биохимическим критерием для оценки степени деградации нервных клеток. Оказалось, что при болезни Альцгеймера (предстарческое слабоумие) в наибольшей степени выражено снижение концентрации ганглиозидов, тогда как при старческом слабоумии, напротив, в большей степени, чем при болезни Альцгеймера, выражено снижение содержания миелиновых липидов (цереброзидов и холестерина). Содержание этих липидов снижается с возрастом и у здоровых людей, но у больных этот процесс выражен более ярко, различия с контролями того же возраста являются статистически достоверными для различных районов мозга [17].

*Процессы перекисного окисления липидов. Простагландины, лейкотриены, тромбоксаны.* При изучении перекисного окисления липидов большое внимание привлекают процессы линоксигеназного и циклооксигеназного путей превращения арахидоновой кислоты (20:4<sub>ω6</sub>) с образованием биологически активных соединений—простагландинов, лейкотриенов и тромбоксанов. На съезде свыше 20 сообщений было посвящено этим соединениям. Получены новые данные о локализации и функциональной активности этих веществ. Показано, что, в отличие от мозга взрослых животных, мозг эмбрионов мышей на ранних стадиях развития не способен метаболлизировать арахидоновую кислоту [18]. У взрослых млекопитающих основными простагландинами в ткани мозга являются P<sub>g</sub>D<sub>2</sub>, P<sub>g</sub>E<sub>2</sub> и P<sub>g</sub>F<sub>2α</sub>. Они принимают участие в регуляции температуры тела, процессов сна, болевых ощущений, дифференцировки нервных клеток и других. Так, P<sub>g</sub>D<sub>2</sub> при его центральном введении вызывает гипотермию и сон, участвует в процессах дифференцировки нервных клеток [19, 20]. P<sub>g</sub>E<sub>2</sub> регулирует температуру тела, обладает антиконвульсивным эффектом [21] и т. д.

Простагландины, очевидно, изменяют как свою локализацию, так и функциональную роль в процессе онтогенетического развития организма. Так, синтетаза  $\text{P}_g\text{D}_2$  вначале локализована в нейронах, затем ее концентрация становится выше в клетках глии и исчезает из многих, но не из всех нейронов [22]. Хотя в распределении рецепторов различных простагландинов между отдельными структурами мозга были выявлены существенные различия, в некоторых участках мозга один и те же слои оказались обогащенными рецепторами для всех трех основных простагландинов. Показано, что рецепторы простагландинов имеют белковую природу [20—23].

К числу биологически активных эйкозаноидов, синтезирующихся в ткани мозга, относятся вазоактивные тромбоксаны  $\text{TxA}_2$ ,  $\text{TxB}_2$ , синтез которых, как и простагландинов, идет по циклооксигеназному пути, а также лейкотриены и гидроксикоизотетраеновые кислоты, образующиеся с помощью липоксигеназ [24, 25]. *Vas-solino* и соавт. [26] обнаружили, что лейкотриены способны высвобождать активирующий тромбоциты фактор, являющийся медиатором воспалительных процессов, не только из клеток крови, селезенки, почек и печени, но и из нервных клеток. Этот фактор, представляющий собой 1-0-алкил, 2-ацетил, глицеро-3-фосфохолин, высвобождается при воздействии лейкотриенов  $\text{LTB}_4$ ,  $\text{C}_4$ ,  $\text{D}_4$ . Выявлены значительные изменения в биосинтезе и содержании эйкозаноидов под влиянием ишемии или алкогольного отравления [27, 28].

В ряде работ изучалось влияние индукции перекисного окисления в ткани мозга на активность ключевых ферментов обмена (аденилатциклазы,  $\text{K}^+$ -АТФазы и др.) [29], изменение процесса перекисного окисления при различных патологических процессах [30, 31].

*Обмен сульфопереброзидов и цереброзидов, влияние этих липидов на физико-химическое состояние мембран.* Исследование синтеза цереброзидов и сульфопереброзидов позволило установить, что цереброзилгалактозилтрансфераза, катализирующая перенос галактозы с УТР-галактозы на церамид, обладает специфичностью и не может осуществлять перенос галактозы на углеводные остатки, входящие в состав гликолипидов (процесс, который происходит, например, при синтезе ганглиозидов). Фермент не активен и со сфингозином и не может катализировать перенос галактозы из УТР-галактозы на этот субстрат. В ткани мозга существует другая галактозилтрансфераза, катализирующая этот процесс [32, 33].

Влияние гормонов на процесс синтеза сульфолипидов (сульфопереброзидов и сульфогалактозилдиацилглицерина) и дифференцировки олигодендроцитов изучали, используя культуры глиальных клеток из мозга крысы недельного возраста [34]. Показано, что заметное включение меченой серы ( $^{35}\text{S}$ ) в липиды происходило только в олигодендроцитах, причемшло образование преимущественно сульфопереброзидов. Если инсулин оказывал общий стимулирующий эффект на синтез различных липидов, то тригидротиронин избирательно увеличивал синтез сульфолипидов и стимулировал развитие олигодендроцитов, не оказывая существенного влияния на общий липогенез в этих клетках [34].

В двух работах, доложенных на съезде [35, 36], исследовали влияние сульфатидов с различными жирными кислотами на физико-химическое состояние мембран мультимеллярных везикул, построенных из дистеарондифосфатидилхолина. Показано, что как температура, так и зитальния фазового перехода этих мембран, содержащих 15 молярных процентов сульфопереброзидов, зависят от природы жирнокислотного остатка в этом липиде. В изученной модельной системе сульфопереброзиды с насыщенными жирными кислотами мало влияли на температуру фазового перехода мембран, тогда как эти липиды с олеиновой или ине-вакциеновой кислотами (18:1) и особенно с линолевой (18:2) и линоленовой (18:3) кислотами заметно снижали ее. Показано, что сульфопереброзиды оказывают различный эффект на упорядоченность мембран выше и ниже температуры фазового перехода, причем эффект этих липидов в значительной мере зависит от наличия ионов кальция в среде [35].

**Локализация, обмен, структурное многообразие и функциональная роль ганглиозидов нервной ткани.** Из всех липидов наибольшее количество работ (свыше 30), представленных на съезде, было посвящено ганглиозидам. Наши представления о структурном многообразии ганглиозидов неуклонно обогащаются. Большой интерес представляют исследования, посвященные изучению 0-ацильных форм этих соединений. 0-ацилирование (прежде всего 0-ацетилирование) белков и липидов играет, очевидно, важную роль в модуляции их функциональной активности. Установлено, что в процессе онтогенетического развития человека содержание 0-ацильных форм ганглиозидов нарастает [37]. Оно продолжает увеличиваться с возрастом и в старости, возрастая от 0,5% (у трехмесячного ребенка) до 25% (у 90-летнего человека). Проводилась идентификация и изучение индивидуальных форм этих соединений [38].

Вопрос об основных местах локализации ганглиозидов в нервной ткани оставался до последнего времени открытым. В связи с несовершенством методов выделения нейронов и глии препараты ганглиальных клеток во многих случаях оказывались более обогащенными ганглиозидами, чем препараты нервных клеток. В одной из работ, доложенных на съезде [39], как и в ряде других работ последних лет исследовали ганглиозиды первичных культур нейронов и глии из мозга эмбрионов млекопитающих. Показано, что нейроны в значительно большей мере обогащены ганглиозидами, чем клетки астроглии. Лишь нервные клетки содержали весь набор типично мозговых ганглиозидов, включая три- и тетраасialogанглиозиды, которым придается такая большая роль в процессах синаптогенеза; в астроглии найдены лишь моно- и дисасialogанглиозиды. По мнению Abe и соавт. [40], содержащий тетраасialogанглиозида  $G_{Q_4}$  можно использовать в качестве биохимического критерия, позволяющего следить за восстановлением нейронов в экспериментальных моделях ряда болезней.

Заметные успехи достигнуты в понимании путей синтеза и распада ганглиозидов. При изучении динамики изменения активности разных форм синалидаз в процессе онтогенеза мыши получены доказательства того, что в развивающемся мозгу этот фермент представлен, главным образом, лизосомной формой, тогда как во взрослом мозгу он сконцентрирован преимущественно в наружных мембранах синапсом [41]. Установлено наличие в ткани мозга активатора другого фермента распада ганглиозидов— $\alpha$ -фукозидазы. Как и ранее описанные активаторы других ферментов распада ганглиозидов, этот активатор представляет собой термостабильный белок [42]. Gonatas и соавт. [43] привели доказательства того, что мембраны аппарата Гольджи являются основным местом синтеза ганглиозидов. Так, активность галактозилтрансферазы и синалилтрансферазы, участвующих в синтезе этих липидов, была в 25—65 раз выше в этих структурах, чем в исходной фракции нейронов мозга.

Методические подходы к изучению структурного многообразия, локализации и функциональной роли ганглиозидов обсуждались в ряде сообщений [44—46], посвященных методам жидкостной хроматографии, флуоресцентных зондов, ядерно-магнитного резонанса и иммунохимическим методам, все шире используемым в настоящее время при изучении ганглиозидов.

В докладах и сообщениях, сделанных на съезде, были приведены интересные новые данные, характеризующие значение ганглиозидов для процессов дифференцировки и регенерации нервных клеток, а также для сохранения их жизнеспособности. Многие авторы приводили свидетельства того, что добавление экзогенных ганглиозидов способствует дифференцировке нервных клеток в развивающемся мозгу, либо их лучшей сохранности и регенерации у взрослых животных. Так, добавление ганглиозида  $G_{M_1}$  к культурам интернейронов мозжечка примерно удваивало длину их отростков (нейритов) в первые же дни после пересева [39]. Внутривенное введение экзогенных ганглиозидов крысам способствовало лучшей сохранности холинэргических нейронов в гиппокампе после частичной перерезки дорзальных путей [47]. Аналогичный эффект ганглиозид  $G_{M_1}$  оказывает на функциональное восстановление допаминэргической системы у крыс с поврежденными по-

лушариями. В случае введения этого ганглиозида как активность тирозингидроксилазы, так и иммунореактивность стриатума были намного выше контролем [18]. Внутривенный эфир ганглиозида  $G_{M1}$  при его регулярном введении способен предотвращать атрофию нервных клеток у котят, которых монокулярно лишали зрительных импульсов в критический момент развития [49].

Yates и соавт. [50], изучая процессы регенерации седлашного нерва, показали, что ганглиозиды накапливаются проксимально по отношению к месту перерезки. Это накопление ганглиозидов, синтез которых продолжает идти в теле клетки, может, очевидно, дать толчок росту аксонов, то есть процессу регенерации.

В случае центрального эффекта ганглиозидов возникает вопрос о проницаемости для ганглиозидов ГЭБ. Считалось, что они не проникают через барьер. Однако в работе Ghidoni и соавт. установлено, что ганглиозид  $G_{M1}$ , содержащий радиоактивную метку, способен включаться в ткань мозга крысы при его внутривенном введении [51]. Большой интерес представляет изучение включения ганглиозидов в мембрану нервных клеток. Найдено, что оно резко падает в результате обработки клеток трипсином. Очевидно, включение ганглиозидов в мембрану нервных клеток является сложным процессом, требующим первоначального взаимодействия ганглиозидов с белком клеточной поверхности, которое обеспечивает «узнавание» ганглиозида клеточной мембраной [52].

Данные, полученные с помощью иммунохимических методов, свидетельствуют о том, что ганглиозиды играют существенную роль в процессах межклеточного взаимодействия. Так, моноклональное антитело A2B5, как было показано многими авторами, узнает антигенные углеводные детерминанты, которые являются общими у полисialogанглиозидов и гликопротеина, обуславливающего адгезию нервных клеток (NCAM—neural cell adhesion molecule). Jørgensen [53] высказывает предположение, что полисialogанглиозиды могут модулировать адгезию, опосредованную NCAM. Возможно, ганглиозиды являются первоначальными местами связывания молекул вещества клеточной адгезии нейронов. В пользу участия ганглиозидов в процессах межклеточного взаимодействия говорят и резкое изменение их состава в глиомах и других опухолях головного мозга [54]. Холинэргические нервные окончания позвоночных (от млекопитающих до рыб) содержат специфический антиген, который, как было показано [55, 56], представляет собой пока еще не идентифицированный ганглиозид.

Следует отметить отсутствие на съезде сообщений, посвященных роли ганглиозидов в рецепции гормонов. Судя по имевшим место дискуссиям, большинство специалистов считает свидетельства в пользу этого предположения недостаточно убедительными. В то же время роль ганглиозидов в качестве рецепторов некоторых тексинов и вирусов не подвергалась сомнению. В случае же физиологических эффекторов (гормонов, медиаторов) скорее можно говорить о модуляции ганглиозидами клеточного ответа.

## RECENT ADVANCES IN BRAIN LIPIDS RESEARCH (X-th Meeting of ISN, Riva-del-Garda, Italy, may 1985)

AVROVA N. F.

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

Modern data on functional role, structure, localization and metabolism of brain lipids are compiled. It has been shown that ligand-cell membrane receptor interaction results in cleavage of phosphoinositides, leading to the production of diacylglycerol and inositol triphosphate, which play the role of second messengers. The differences in the effect of these substances on cellular metabolism in various cells and under the influence of various factors have been found. The advances in the study

to enzymes of lipid metabolism are described: their localization, substrate specificity and requirement of activators. New data on the metabolism and function of prostaglandins, leucotriens and other products of lipid peroxidation are analyzed. According to new ideas many of the lipids may be considered biologically active substances. Thus gangliosides and phosphatidylserine are recommended for treatment of some neurological disorders. The results of recent investigations of the neurotrophic effect of gangliosides, as well as of their role in neuron differentiation and regeneration are summarized.

## Ж И Т Е П А Т Ы П А

1. Hawthorne J. N., Swilem A.—M. F. J. Neurochem., v. 44, suppl., S 3A, 1985.
2. Agranoff B. W. J. Neurochem., v. 44, suppl., S 2C, 1985.
3. Downes C. P., Irvine R. F. J. Neurochem., v. 44, suppl., S 2D, 1985.
4. Claro E., Arbones M. L., Garcia A., Picatoste F. J. Neurochem., v. 44, suppl., S. 47C, 1985.
5. Foudin L. L., Tang W., Sun G. Y. J. Neurochem., v. 44, suppl., S 48A, 1985.
6. Minchin M. C. W., Godfrey P. P., McCluer S. J., Young M. M. J. Neurochem., v. 44, suppl., S 49B, 1985.
7. Vadnal R., Van Rooijen L. A. A., Bazan N. G. J. Neurochem., 44, suppl., S 49C, 1985.
8. Bazan N. G., Rooijen L. A. A. J. Neurochem., v. 44, suppl., S 182D, 1985.
9. Sun G. Y. J. Neurochem., v. 44, suppl., S 47D, 1985.
10. Raulli R., Calderini G., Crews F. T. J. Neurochem., v. 44, suppl., S 47A, 1985.
11. Vanter M.—T., Leitouni R., Rousson R. J. Neurochem., v. 44, suppl., S 24A, 1985.
12. Galbiati E., Bellini F., Bonetti A. C., Calderini G., Toffano G. J. Neurochem., v. 44, suppl., S 24A, 1985.
13. Calderini G., Bellini F., Bonetti A. C., Galbiati E., Toffano G. J. Neurochem., v. 44, suppl., S 55B, 1985.
14. Orlando P., Giordano C., Roberti R., Bocchini V., Binaglia L., Porcellati G. J. Neurochem., v. 44, suppl., S 45B, 1985.
15. Ogawa K., Hiraiwa M., Sugamata M., Kobune F., Ueda H., Nagashima K., Abe T. J. Neurochem., v. 44, suppl., S 51D, 1985.
16. Pollak N., Mizrahi Y., Samuel D., Schwartz M. J. Neurochem., v. 44, suppl., S 25B, 1985.
17. Svennerholm L., Gottfries C. G., Karlsson J. J. Neurochem., 44, suppl., S 193A, 1985.
18. Goldin E., Tomer A., Hazel S., Yavin E. J. Neurochem., v. 44, suppl., S 50B, 1985.
19. Ueno R., Hayaishi O. J. Neurochem., v. 44, suppl., S 15A, 1985.
20. Urade Y., Fujimoto N., Kaneko T., Watanabe Y., Mizuno N., Hayaishi O. J. Neurochem., v. 44, suppl., S 72C, 1985.
21. Yumoto N., Watanabe Y., Watanabe K., Watanabe Yu., Hayaishi O. J. Neurochem., v. 44, suppl., S 71B, 1985.
22. Hayaishi O., Urade Y., Watanabe Y. J. Neurochem., v. 44, suppl., S 14B, 1985.
23. Watanabe Y., Watanabe Y., Kaneko T., Urade Y., Yumoto N., Hayaishi O. J. Neurochem., v. 44, suppl., S 71C, 1985.
24. Wolfe L. S., Hakim A., Rostworowski K. J. Neurochem., v. 44, suppl., S 25C, 1985.
25. Hertting G., Keller M., Spraggi A. J. Neurochem., v. 44, suppl., S 14C, 1985.
26. Bussolino F., Camussi G., Tiremo F. J. Neurochem., v. 44, suppl., S 72B, 1985.
27. Petroni A., Borghi A., Galli C. J. Neurochem., v. 44, suppl., S 25D, 1985.
28. Pediconi M., Colombo G., Galli C. J. Neurochem., v. 44, suppl., S 72D, 1985.
29. Murphy M. J. J. Neurochem., suppl., S 50D, 1985.

30. *Sartorio L., Arsenio-Nunes M. L., Zawislak R., Freysz G., Rebel G., Fiech W., Rumbach L., Warner J. M., Vincendon G.* J. Neurochem., v. 44, suppl., S 49D, 1985.
31. *Demedzik P., Saunders P. D., Dugan L. L., Anderson D. K., Horrocks L. A.* J. Neurochem., v. 44, suppl., S 50A, 1985.
32. *Yao J. K., Poduslo J. F.* J. Neurochem., v. 44, suppl., S 56D, 1985.
33. *Nescovic N. M.* J. Neurochem., v. 44, suppl., S 56C, 1985.
34. *Hoehn R. C., Koper J. M., Lopes-Cardoso M.* J. Neurochem., v. 44, suppl., S 57D, 1985.
35. *Viani P., Cervato G., Marchesini S., Cestaro B.* J. Neurochem., v. 44, suppl., S 57B, 1985.
36. *Cestaro B., Viani P., Cervato G., Marchesini S.* J. Neurochem., v. 44, suppl., S 57C, 1985.
37. *Riboni L., Malesci A., Sonnino S., Ghidoni P.* J. Neurochem., v. 44, suppl., S 53B, 1985.
38. *Malesci A., Riboni L., Sonnino S., Ghidoni D.* J. Neurochem., v. 44, suppl., S 52D, 1985.
39. *Thangnipon W., Smith R. M., Atkinson D. J., Batatz R.* J. Neurochem., v. 44, suppl., S 36B, 1985.
40. *Abe T., Ogawa K., Hiraiwa M., Kobune F., Ueda H., Nagashima K.* J. Neurochem., v. 44, suppl., S 53A, 1985.
41. *Caimi L., Aleo F., Preti A.* J. Neurochem., v. 44, suppl., S 130B, 1985.
42. *Masserini M., Guiliani A., Venerando B., Fiorilli A., Li Y.-T., Tettamanti G.* J. Neurochem., v. 44, suppl., S 58A, 1985.
43. *Gonatas J. O., Gonatas N. K., Stieber A., Fletscher L.* J. Neurochem., v. 44, suppl., S 132A, 1985.
44. *Gazzotti G., Ghidoni R., Sonnino S.* J. Neurochem., v. 44, suppl., S 53D, 1985.
45. *Acquotti D., Kirschner G., Ghidoni R., Sonnino S., Marchesini S.* J. Neurochem., v. 44, suppl., S 54A, 1985.
46. *Marchesini S., Cervato G., Viani P., Cestaro B.* J. Neurochem., v. 44, suppl., S 56A, 1985.
47. *Oderfeld-Nowak B., Skup M., Gradkowska M., Pogorzelski A., Oderfeld J. J.* Neurochem., v. 44, suppl., S 36A, 1985.
48. *Consolazione A., Calzolari S., Toffano G.* J. Neurochem., v. 44, suppl., S 134D, 1985.
49. *Carnignoto G., Comelli C., Bisti S.* J. Neurochem., v. 44, suppl., S 133A, 1985.
50. *Yates A. J., Warner J. K., Guzman-Harty M., Manchini M., Pearl D.* J. Neurochem., v. 44, suppl., S 134B, 1985.
51. *Ghidoni R., Sonnino S., Venerando B., Fiorilli A., Tettamanti G.* J. Neurochem., v. 44, suppl., S 54C, 1985.
52. *Leskawa K. C., Erwin R. E., Hogan E. L.* J. Neurochem., v. 44, suppl., S 55A, 1985.
53. *Jørgensen O. S.* J. Neurochem., v. 44, suppl., S 33C, 1985.
54. *Fredman P., Collins P., Ammar A., Holst von H., Granholm L., Svennerholm J.* Neurochem., v. 44, suppl., S 55C, 1985.
55. *Ferretti P., Boroni E.* J. Neurochem., v. 44, suppl., S 161C, 1985.
56. *Boroni E., Ferretti P.* J. Neurochem., v. 44, suppl., S 161D, 1985.

Поступила 22.VII 1985



УДК 577.151.05:25.354

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ РЕЦЕПТОРНЫХ БЕЛКОВ,  
МЕХАНИЗМЫ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННОЙ МОДИФИКАЦИИ  
И ПРОБЛЕМЫ ПАМЯТИ(по материалам X Международного собрания по  
нейрохимии, Рива-дель-Гарда, Италия, май, 1985 г.)

МИКЕЛАДЗЕ Д. Г.

Институт физиологии АН ГССР, Тбилиси

Регуляция биохимических превращений в нервной ткани, изменение метаболических характеристик нейронов и их морфо-функциональные изменения лежат в основе высшей нервной деятельности животных и человека. Рецепторные белки нейротрансмиттеров, осуществляющих трансдукцию синаптического сигнала, и ферменты, принимающие участие в регуляции внутриклеточных процессов, являются основными звеньями, обуславливающими функциональную активность нервных клеток. Эти вопросы в настоящее время широко освещаются в печати и обсуждаются на мировых и региональных конференциях нейрохимиков.

Обратимая фосфорильная модификация белков является главным механизмом клеточной регуляции. Свыше трети всех ферментов, участвующих в метаболизме углеводов, белков, липидов и нуклеиновых кислот, модулируются фосфорильной модификацией. Проведение нервного импульса, действие фактора роста нервов, нейротрансмиттеров, гормонов вызывают обратимое фосфорилирование белков и ферментов, регулируя процессы биосинтеза, высвобождения нейротрансмиттеров, аксоплазматического транспорта веществ, а также изменения мембранного потенциала, транскрипции и трансляции, окислительного фосфорилирования и др. [1].

В настоящее время особое внимание уделяется  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулинзависимой протеникиназе II и  $\text{Ca}^{2+}$ -фосфолипидзависимой протеникиназе C. Кальмодулинзависимая протеникиназа имеет высокую величину  $M_r$  (400—600 кД), содержится в большом количестве в нейронах и обнаруживается преимущественно в структурах коркового мозга [2—4]. Этот фермент ингибируется диэзепамом, АКТГ, дифенилгидантоном и энкефалинами.  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулинзависимая протеникиназа II является чувствительной к эпилептическим разрядам нейронов и к гипоксии мозга [5, 6]. Наиболее хорошо изученной функцией протеникиназы C в нервной ткани является фосфорилирование основного белка миелина. Фосфолипидзависимая протеникиназа фосфорилирует один сериновый и один треониновый остаток основного белка, чем регулирует закручивание и сборку миелина вокруг аксона. Однако следует отметить, что фосфорилирование этого белка осуществляется также и  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулинзависимой протеникиназой. Процесс фосфорилирования основного белка миелина изменяется при прохождении нервного импульса по миелинизированному волокну [7].

Интересным вопросом посттрансляционной модификации белков является ADP-рибозилирование. ADP-рибозилирование, например гистонов, модулирует структу-

ру хроматина и коррелирует с релаксацией полинуклеосома [8]. Имеются все основания предполагать, что процессы ADP-рибозилирования участвуют в транскрипции, репликации и репарации ДНК [9]. Mandel [10] показал, что высокодифференцированные клетки быстропролиферирующей культуры  $S_6$  содержат поли-ADP-рибоза-полимеразную активность в более высокой степени, чем нормальные клетки астробластов. Также выяснено, что ADP-рибозилирование белков протекает не только в ядре, но и в цитоплазме, в частности рибонуклеопротеидных частицах и митохондриях.

Одной из наименее изученных модификаций белков является сульфатирование по тирозиновому остатку, которое происходит во многих тканях позвоночных и беспозвоночных животных. Этой модификации подвергаются, в основном, секретлируемые клеткой белки [11]. Процесс сульфатирования белков протекает в аппарате Гольджи. Предполагается, что биологическая функция сульфатирования может заключаться в увеличении способности узнавания секретлируемых белков и пептидов соответствующими рецепторами; в конформационном изменении молекулы белка и открытии определенных доменов, необходимых для трансдукции гормонального сигнала; в индуцировании диссоциации белков и пептидов с молекулы рецептора.

В настоящее время широко обсуждается биологическая роль гликозилирования поверхностных белков плазматических мембран. Обнаружено, что в процессе роста и развития нейронов изменяется структура и содержание углеводных остатков белковых молекул и, соответственно, интенсивность их обмена [12]. Предполагается, что реакции гликозилирования белков принимают участие в адгезии нейронов и глиальных клеток и определяют дифференциацию нервной ткани. Большинство рецепторных белков подвергается гликозилированию.

В изучении структуры и функции рецепторных белков достигнуты большие успехи, обусловленные внедрением методов молекулярной генетики в нейробиологию. Исследования рецепторных белков в настоящее время проводятся с применением следующих методических подходов: выделение и очистка рецепторного белка и выработка антител к нему; идентификация соответствующей мРНК, клонирование рецепторной кДНК и ее анализ и, наконец, инициация трансляции, реконструкция и встраивание рецепторных белков в модельные объекты типа ооцитов. Использование таких методик позволило выяснить функциональную значимость, пространственную ориентацию, способность сопряжения с ионными каналами и функцию ряда рецепторных белков. Клонирование кДНК никотинового ацетилхолинового рецептора, а также кДНК натриевого канала и определение нуклеотидной последовательности соответствующих генов дали возможность определить, что все четыре субъединицы рецептора имеют сходную аминокислотную последовательность, идентичный гидрофобный профиль и ориентованы в липидном слое мембраны симметрично друг к другу [13, 14]. Однако лишь  $\alpha$ -субъединица рецептора является совершенно необходимой для связывания специфического никотинового лиганда—бунгаротоксина. В отличие от ацетилхолинового рецептора, натриевый канал образуется из одного высокомолекулярного белка, имеющего четыре внутренние гомологические последовательности, заставляющие белок принимать в мембране конформацию псевдосимметричного типа. Каждая из этих четырех последовательностей содержит уникальный сегмент аминокислотных остатков с положительным зарядом, который может участвовать в образовании потенциалчувствительных воротных механизмов.

Использование вышеописанных подходов позволило Barnard [15] обнаружить идентичность ГАМК и глициновых рецепторов. Эти белки осадились одними и теми же антителами и были сопряжены с хлорным каналом по однотипному механизму.

Demoliou-Masson, Barnard [16] выяснили, что сродство олипатных рецепторов к лигандам K, Mg,  $\Sigma$  типов, солибилизованных из мембран дигитонинном, зависит от наличия ионов магния в среде, в присутствии которых происходит ассоциация олигомерных белков рецептора. Ассоциацию—диссоциацию олипатных рецепторов, кроме ионов магния, контролируют ионы натрия и гуаниловые нуклеотиды. Ис-

пользование гельпроникающей хроматографии показало, что разные типы опиатных рецепторов могут взаимопревращаться под действием полной силы.

Удалось обнаружить, что белки ГАМК-рецептора гомологичны как к белкам глицинового рецептора [15], так и к белкам рецептора бензодиазепинов. Как показали *Kuriyama* и соавт. [17], высокоочищенный ГАМК-рецептор, который проявлял чувствительность к бикукулину и содержал два белка с  $M_r$  53—57 кД, фотоаффинно связывал  $^3H$ -флунитразем при электрофорезе в ПААГ.

Одним из важнейших рецепторов мозга является  $D_2$ -дофаминовый рецептор, с которым связываются нейролептики бутирофенонового ряда, фармакологический потенциал которых коррелирует со средством этих препаратов с  $D_2$ . Количество  $D_2$ -дофаминового рецептора в определенных ареалах мозга изменяется при шизофрении, депрессивном состоянии, психозах, паркинсонизме и других формах патологии ЦНС. Несмотря на функциональную значимость  $D_2$ -дофаминового рецептора, биохимический механизм сопряжения  $D_2$  с внутриклеточными системами не выяснен. Поэтому определенный интерес представляют данные *Simmonds, Strange* [18], показавших, что усиление фосфоинозитольного обмена в передней доле гипофиза, индуцируемое аналогом тиролберина DN 1417, подавляется агонистами  $D_2$ -рецептора. Антагонисты  $D_2$ -галоперидол, спироперидол и (+)-бутакамол снимали ингибирующий эффект агонистов (дофамин и апоморфин).

*Reddington* и соавт. [19] изучали распределение и свойства аденозинного рецептора, содержащегося в большом количестве в гиппокампе, с использованием двух агонистов:  $^3H$ -циклогексинаденозина и  $^3H$ -N-этилкарбоксамидоаденозина. Первый из этих лигандов взаимодействует с  $A_1$  субтипом рецептора, вызывает ингибирование аденилатциклазы и модулирует синаптическую передачу. Этот рецептор в большом количестве содержится в гиппокампе. Второй используемый лиганд специфически связывается как с  $A_1$ , так и с  $A_2$ . Последний сопряжен с аденилатциклазой, локализован преимущественно в полосатом теле и фармакологически отличается от  $A_1$ .

Классическими критериями идентификации лиганд-рецепторных взаимодействий являются насыщенность, обратимость, специфичность и высокая корреляция между связывающими параметрами и биологическим эффектом фармакологического соединения. Используя разные кинетические подходы, *Simonet* и соавт. [20] показали существование двух рецепторов ангиотензина в культивируемых нейронах спинного мозга. Электрофизиологические опыты подтвердили наличие двух рецепторов этого пептида. Такой же подход был применен *Asakura* и соавт. [21], изучавшими регуляцию двух аффинных состояний  $\alpha_2$ -рецептора норадреналина. Было показано, что N-этилмаленид и GTP вызывают переход высокоаффинного состояния рецептора в низкоаффинное, что свидетельствует в пользу модели двухстадийной реакции с образованием четвертичного комплекса GTP-связывающего белка, рецептора и лиганда.

В настоящее время выясняется, что  $\alpha$ -адренорецепторы локализованы, в основном, в тех структурах мозга, которые имеют самое непосредственное отношение к процессам высшей нервной деятельности. Выяснено, что разрушение септальных ядер вызывает понижение холинацетилтрансферазной активности в гиппокампе и уменьшение числа мест связывания  $^3H$ -празозина с  $\alpha_1$ -адренорецептором. Однако в отличие от холинацетилтрансферазы, количество этого рецептора восстанавливалось на 10—14-ый день после операции [22]. Эти изменения не затрагивали  $\alpha_2$ - или  $\beta$ -адренергические рецепторы, что свидетельствует об участии лишь  $\alpha_1$ -рецепторов в септо-гиппокампальных афферентах. Было также обнаружено наличие тесной взаимосвязи между серотонинергическими и  $\alpha$ -адренергическими системами мозга [23]. Использование специфических нейротоксинов типа 5,7-дигидрокситриптамина позволило авторам прийти к заключению, что серотонин осуществляет гетерологическую регуляцию двух субтипов  $\alpha$ -адренорецепторов.

Современные подходы к изучению проблем памяти можно подразделить на три группы: а) исследование биохимических коррелятов элементарных поведенческих актов простейших организмов; б) изучение сложных поведенческих реакций организма и выяснение биохимических коррелятов этих реакций; в) построение теоретических

моделей на основании известных биохимических реакций в синапсах. Совокупность полученных данных позволяет выделить те основные процессы, которым придается первостепенное значение в явлениях обучения и памяти.

В лаборатории *Kandel* [24] давно ведутся исследования по выяснению биохимических механизмов, лежащих в основе простейших рефлекторных действий моллюска *Aplysia*. Показано, что сенсорные нейроны при условном раздражении моллюска подвергаются пресинаптическому «облегчению», которое опосредуется изменением внутриклеточной концентрации cAMP. Количество последней в этом случае изменяется не только из-за активирования аденилатциклазы нейропередатчиком (серотонином), но и вследствие повышения содержания пресинаптического кальция, который через кальмодулин также усиливает активность фермента. Аденилатциклаза является ключевым ферментом, участвующим в хранении информации. Мутант дрозофилы *Rutabaga* имеет дефективную краткосрочную память и, соответственно, низкий уровень аденилатциклазной активности, причем в мутантах понижена аденилатциклазная активность обусловлена уменьшением базальной forskолинимулируемой реакции и потерей чувствительности каталитической субъединицы к ионам кальция [25].

В другой серии опытов показано, что ассоциативное обучение моллюска *Hermissenda graciosa* связано с изменением внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$  и кальцийзависимым фосфорилированием белков [26]. Протеинкиназа модифицирует белки ионных каналов и изменяет активность последних.

Нейрохимические реакции, лежащие в основе обучения и памяти, должны соответствовать определенным условиям. Во-первых, основные биохимические сдвиги должны протекать в основном в синаптических образованиях и преимущественно в структурах коры головного мозга; во-вторых, специфические биохимические реакции должны запускаться относительно слабым воздействием и ответные изменения должны быть ассоциативными и, в-третьих, они должны приводить к изменениям эффективности синаптической передачи. Опытами, проведенными *Beardry* [27], показано, что изменение нейрональной активности в процессе обучения сопровождается увеличением концентрации кальция в дендритных шипиках, что приводит к активации ряда  $Ca^{2+}$ -зависимых ферментов, в том числе  $Ca^{2+}$ -зависимой протеазы (кальпаина). Увеличение активности этого фермента вызывает протеолитическое расщепление цитоскелетных белков (типа спектрина), и следовательно—изменение формы дендритного шипика и перераспределение рецепторного белка вдоль мембраны.

Из экстракционных белков, участвующих в процессах обучения и памяти, привлекают к себе внимание так называемые энзимы. Эти гликопротеины являются специфическими для НС золотых рыбок, и скорость их обновления усиливается в процессе обучения. *Shashoua* [28] показал, что энзимы состоят из двух белков с величинами  $M_r$  37000 и 31000, связанных между собой дисульфидными мостиками. Эти белки синтезируются и высвобождаются во внеклеточную жидкость определенным типом нейросекреторных клеток. В отсутствие ионов кальция энзимы агрегируют настолько сильно, что их невозможно растворить даже в кипящем растворе 1% ДДС-Na в 6 М мочеvine. Введение антител энзимов в СМЖ золотых рыбок приводит к полной потере способности к воспроизведению запоминаемой информации. Предполагается, что энзимы участвуют в синаптических процессах при консолидации памяти. Привлекает внимание то, что антитела против энзимов имеют перекрестную активность в отношении белка S-100 [29].

В настоящее время принято считать, что в основе краткосрочной памяти должны лежать феномены типа посттетанической потенциации и гетеросинаптического «облегчения». *Kuroda* [30] привел экспериментальные доказательства гипотезы относительно аденозинного происхождения посттетанической потенциации. Тетаническое раздражение, а также обработка клеток аденозином увеличивают концентрацию cAMP в пресинаптических терминалях. Повышение концентрации cAMP усиливает кальциевый ток, что со своей стороны стимулирует активность аденилатциклазы. В конечном итоге усиливается выброс нейропередатчиков и наблюдается феномен гетеросинаптического «облегчения».

Таким образом, полученные в последнее время данные относительно молекулярной организации рецепторных белков свидетельствуют о том, что большинство рецепторов состоит из мономерных структур, образуя сложный олигомерный симметричный комплекс в мембране. В надмолекулярной организации рецепторного комплекса принимают участие ферменты, осуществляющие посттрансляционную модификацию белков. Процессы фосфорилирования, ADP-рибозилирования и гликозилирования тесно связаны с активностью рецепторного комплекса и вызывают изменения оперативных характеристик синаптической передачи. Эти изменения отражаются на элементарной условно-рефлекторной деятельности простейших организмов и могут лежать в основе высших интегративных функций мозга животных и человека. Этот краткий обзор новейших данных в области молекулярной организации рецепторных белков, регуляции ферментов, участвующих в посттрансляционной модификации, и биохимических реакций, лежащих в основе памяти, построен в основном на материалах X Международного собрания по нейрохимии в г. Рива-дель-Гарда (Италия) и свидетельствует о важной роли указанных процессов в функциональной активности ИНС.

## RECEPTOR PROTEINS, MECHANISMS OF POSTTRANSLATIONAL MODIFICATIONS AND MEMORY (X-th MEETING OF ISN, RIVA-DEL-GARDA, ITALY, MAY 1985)

MIKELADZE D. G.

Institute of Physiology, Georgian SSR Academy of Sciences, Tbilisi

The review covers modern ideas about molecular organization of a number of receptor proteins (GABA, dopamine, adenosin,  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$ -adrenoreceptors etc). Analysis of the functional importance of posttranslational modifications of proteins in CNS (phosphorylation, glycosylation, ADP-ribosylation and others) is given. Biochemical mechanism of the behavioural reactions in different types of animals are discussed.

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Nestler E. J., Walaas S. I., Greengard P. *Sciences*, v. 225, p. 1357—1364, 1984.
2. Kennedy M. B. J. *Neurochem.*, v. 44, suppl, S3, 1985.
3. Gomcz M. V., Ribeiro A. M. J. *Neurochem.*, v. 44 suppl, S30, 1985.
4. Navone F., Jahn R., Schiebler W., Greengard P., De Camilli P. J. *Neurochem.*, v. 44 suppl, S30, 1985.
5. Wasterlain C. G., Farber D. B., Bronstein J. M., Fairchild D. J. *Neurochem.*, v. 44 suppl, S58, 1985.
6. Wasterlain C. G., Powell C. L., Bronstein J. M. J. *Neurochem.*, v. 44 suppl, S180, 1985.
7. Murray N., Steck A. J. J. *Neurochem.*, v. 44 suppl, S30, 1985.
8. Niedergang C. P., Murcia G., Ittel M-E., Pouyet J., Mandel P. *Eur. J. Biochem.*, v. 146, p. 185—191, 1985.
9. Mandel P., Okazaki H., Niedergang C. *Progr. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.*, v. 27, p. 1—51, 1982.
10. Mandel P. J. *Neurochem.*, v. 44 suppl, S61, 1985.
11. Huttner W., Baurle P., Hille A., Lee R., Por S., Rosa P. J. *Neurochem.*, v. 44, suppl, S4, 1985.
12. Ploegh H. L. J. *Neurochem.*, v. 44 suppl, S4, 1985.
13. Mishina M., Kurosaki T., Tobimatsu T., Morimoto Y., Noda M., Yamamoto T., Terao M., Lindstrom J., Takahashi T., Kuno M., Numa S. *Nature*, v. 307, p. 604—608, 1984.

14. *Numa S.* J. Neurochem., v. 44 suppl, S1, 1985.
15. *Barnard E. A.* J. Neurochem., v. 44 suppl, S5, 1985.
16. *Demoliou-Mason C. D., Barnard E. A.* J. Neurochem., v. 44 suppl, S6, 1985.
17. *Kuriyama K., Taguchi J., Kimura H.* J. Neurochem., v. 44 suppl, S40, 1985.
18. *Simonds S. H., Strange P. G.* J. Neurochem., v. 44 suppl, S76, 1985.
19. *Reddington M., Erfurth A., Lee K. S.* J. Neurochem., v. 44 suppl, S41, 1985.
20. *Simmonet G., Laribi C., Legendre P., Durouy B., Vincent J. D.* J. Neurochem., v. 44 suppl, S41, 1985.
21. *Asakura M., Tsukamoto T., Imafuki J., Matsui H., Saitoch N., Hasegawa K.* J. Neurochem., v. 44 suppl, S34, 1985.
22. *Forloni G., Wang L.-Y., Vinci R., Consolo S., Ladinsky H. J.* J. Neurochem., v. 44 suppl., S82, 1985.
23. *Rappaport A., Sturtz F., Guicheney P.* J. Neurochem., v 44 suppl, S85, 1985.
24. *Abrams T. W., Kandell E. R.* J. Neurochem., v. 44 suppl, S12, 1985.
25. *Dudai Y., Sher B.* J. Neurochem., v. 44 suppl, S13, 1985.
26. *Neary J. T., Acosta-Urquidi J., Alkon D. L.* J. Neurochem., v. 44 suppl, S13, 1985.
27. *Baudry M. J.* J. Neurochem., v. 44 suppl, S13, 1985.
28. *Shashona V. E.* J. Neurochem., v. 44 suppl, S14, 1985.
29. *Schmidt R.* J. Neurochem., v. 44 suppl, S21, 1985.
30. *Kuroda Y. J.* J. Neurochem., v. 44 suppl, S21, 1985.

Поступила 4. X 1985



## РЕФЕРАТЫ СТАТЕЙ, НАПРАВЛЕННЫХ НА ДЕПОНИРОВАНИЕ В ВИНТИ

УДК 612.822.3/815.1

### АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ОПИОИДНЫХ ПЕПТИДОВ И БРАДИКИНИНА НА НЕЙРОНАХ МОЛЛЮСКОВ И МЛЕКОПИТАЮЩИХ

ЛЕГОСТАЕВ Г. Н., АНИСИМОВ Ю. З.

Была исследована взаимосвязь эффектов брадикинина и энкефалинов на уровне отдельных нервных клеток. Эксперименты проводили на нейронах сенсомоторной области коры больших полушарий мозга ненаркотизированных и необездвиженных кроликов породы шиншилла, иммобилизованных в стереотаксическом аппарате, а также на нервных клетках дорсальной поверхности изолированного подглоточного комплекса ганглиев виноградных улиток. Вне- и внутриклеточная регистрация биоэлектрической активности соответственно нейронов млекопитающих и моллюсков и микроионофоретическое подведение к ним веществ осуществляли при помощи стеклянных микроэлектродов по общепринятым методикам. Всего исследовано 65 нейронов кроликов и 68 клеток моллюсков, из которых соответственно 45 и 22 нервные клетки изменяли характер фоновой импульсной активности на энкефалины и брадикинин при их изолированном подведении. При одновременном подведении к нервным клеткам млекопитающих тетрапептида энкефалинамида и брадикинина из 45 чувствительных к данным веществам нейронов 32 клетки изменяли исходные ответы на нейропептиды: 20 нейронов модифицировали реакции на оба пептида, 8 — на энкефалинамид, 4 — на брадикинин. При совместном подведении к клеткам моллюсков Leu-энкефалина и брадикинина из 22 чувствительных к этим веществам нейронов 8 меняли исходные ответы на нейропептиды, причем у 6 клеток модифицировались реакции на оба пептида, у 2 нейронов — на Leu-энкефалин. Как у млекопитающих, так и у моллюсков тип изменения реакций на вещества при их совместном подведении по сравнению с исходными ответами клеток на энкефалин и брадикинин имел различный характер, что могло проявляться в снижении чувствительности нейронов к тому или иному пептиду, в усилении исходного ответа или в изменении знака реакции.

Проведенные эксперименты свидетельствуют о разнонаправленном характере взаимодействия энкефалинов и брадикинина на уровне отдельных нервных клеток млекопитающих и моллюсков. Можно предположить, что различия в ответах нейронов на опиоидные пептиды и брадикинин при их изолированном и совместном подведении обусловлены как различиями в связывании энкефалинов и брадикинина рецепторами, расположенными на мембране клеток, так и различными внутриклеточными нейрохимическими процессами, протекающими с участием циклических нуклеотидов, простагландинов и ионов кальция, являющихся внутриклеточными посредниками действия на нейроны опиоидных и других нейропептидов. Возможно также, что характер ответных реакций нейронов на нейропептиды определяется наряду с нейрохимическими особенностями нервных клеток и их функциональным состоянием.

6 с., ил. библиогр. 11 назв.

Научно-исследовательский институт  
нормальной физиологии им. П. К. Анохина  
АН СССР, Москва

Поступила 11. II 1986

Рукопись депонирована в ВИНТИ 28.05.86. № 3116-B86.

УДК 612.822.1

## ВЛИЯНИЕ ГИПОТАЛАМИЧЕСКОГО ГЕКСАПЕПТИДА НА ВЫСВОБОЖДЕНИЕ И ЗАХВАТ $^3\text{H}$ -НОРАДРЕНАЛИНА, $^3\text{H}$ -СЕРОТОНИНА И $^3\text{H}$ -ГАМК В СИНАПСОМАХ МОЗГА КРЫС.

АРМЕЯН А. Р., АРАКЕЛЯН Л. Н., САНАСАРЯН А. А., МНДЖОЯН Е. О.,  
ГАЛЮЯН А. А.

Из состава низкомолекулярных водорастворимых соединений гипоталамуса крупного рогатого скота изолирован пептид, сходный по аминокислотному составу с С-концевым фрагментом люлиберина— $\text{Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH}_2$ . Гипоталамическая область мозга, где обнаружен этот гексапептид, как и кора мозга, богаты моноаминергическими и ГАМК-ергическими нервными окончаниями. Поэтому представляло интерес изучить влияние гексапептида на специфический захват и спонтанное и  $\text{K}^+$ -вызванное высвобождение  $^3\text{H}$ -норадреналина ( $^3\text{H-NA}$ ),  $^3\text{H}$ -серотонина ( $^3\text{H-5-OT}$ ) и  $^3\text{H}$ -ГАМК в гипоталамических синапсоматах и синапсоматах коры больших полушарий.

Синапсоматы из гипоталамической области мозга и коры больших полушарий выделяли по методу Hajos. Высвобождение и захват меченых нейромедиаторов из синапсомат изучали методом Raiteri и соавт. Радиоактивность синапсомат в среде измеряли на жидкостном сци-

тилляционной среде, содержащей 0,5 мл этанола и 10 мл сцинтилляционной среды Брея «Intertechnique SL-4221» (Франция).

Установлено, что гексапептид в концентрации  $10^{-6}$  М усиливал спонтанное высвобождение  $^3\text{H}$ -НА (на 71%), тогда как концентрации  $10^{-7}$  и  $10^{-5}$  М не вызывали достоверных изменений этого процесса. Стимуляция синапсом  $\text{K}^+$  (40 мМ) приводила к значительному усилению высвобождения  $^3\text{H}$ -НА (на 131%), в то время как при добавлении  $10^{-7}$ — $10^{-5}$  М концентраций гексапептида одновременно с  $\text{K}^+$  не наблюдалось подавления вызванного высвобождения  $^3\text{H}$ -НА. Этот эффект был наиболее выражен в присутствии гексапептида в концентрации  $10^{-6}$  М. Следовательно, гексапептид стимулирует спонтанное и подавляет вызванное высвобождение  $^3\text{H}$ -НА из гипоталамических синапсов. Влияние вышеуказанных концентраций гексапептида на специфический захват  $^3\text{H}$ -НА синапсами не вызывало достоверных изменений.

Показано, что гексапептид в концентрациях  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  и  $10^{-5}$  М не влиял на спонтанное и  $\text{K}^+$ -вызванное высвобождение  $^3\text{H}$ -5-ОТ, тогда как эти же концентрации его уменьшали захват  $^3\text{H}$ -5-ОТ на 41, 44 и 36% соответственно. Снижение концентрации гексапептида до  $10^{-8}$  М не вызывало изменений захвата  $^3\text{H}$ -5-ОТ. Полученные данные свидетельствуют о том, что в гипоталамической области гексапептид может участвовать в процессе захвата  $^3\text{H}$ -5-ОТ.

В присутствии гексапептида в концентрациях  $10^{-7}$ — $10^{-5}$  М наблюдалось некоторое статистически недостоверное подавление  $\text{K}^+$ -вызванного высвобождения  $^3\text{H}$ -ГАМК. В то же самое время, используемый в этих же концентрациях, он не влиял на специфический захват  $^3\text{H}$ -ГАМК в синапсах коры больших полушарий мозга крыс.

Таким образом, из вышесказанного следует, что в гипоталамической области гексапептид может участвовать в процессах пресинаптической регуляции высвобождения НА и обратного захвата 5-ОТ.

11 с., ил. 5, библиогр. 6 назв.  
Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Поступила 15. IV 1985

Рукопись депоирована в ВИНИТИ 28.04.86. № 3113-В86

УДК 577.112:[577.352.4+577.352.334]:612.82

## ВЛИЯНИЕ БЕЛКА S-100 НА ТРАНСПОРТ РНК В КЛЕТОЧНЫХ ЯДРАХ МОЗГА КРЫС И АКТИВНОСТЬ АТФазы ЯДЕРНЫХ МЕМБРАН

КАПРАЛОВ А. А., ТЮЛЕНЕВ В. И., НАЗАРЕНКО В. И.

Обнаружено, что при добавлении белка S-100 к изолированным ядрам мозга, предварительно меченным *in vivo*  $^{14}\text{C}$ -сротовой кислотой (на 4-й дни инкубации), увеличивается выход кислотонерастворимой

тилляционной среде, содержащей 0,5 мл этанола и 10 мл сцинтилляционной среды Брея «Intertechnique SL-4221» (Франция).

Установлено, что гексапептид в концентрации  $10^{-6}$  М усиливал спонтанное высвобождение  $^3\text{H}$ -НА (на 71%), тогда как концентрации  $10^{-7}$  и  $10^{-5}$  М не вызывали достоверных изменений этого процесса. Стимуляция синапсом  $\text{K}^+$  (40 мМ) приводила к значительному усилению высвобождения  $^3\text{H}$ -НА (на 131%), в то время как при добавлении  $10^{-7}$ — $10^{-5}$  М концентраций гексапептида одновременно с  $\text{K}^+$  не наблюдалось подавления вызванного высвобождения  $^3\text{H}$ -НА. Этот эффект был наиболее выражен в присутствии гексапептида в концентрации  $10^{-6}$  М. Следовательно, гексапептид стимулирует спонтанное и подавляет вызванное высвобождение  $^3\text{H}$ -НА из гипоталамических синапсов. Влияние вышеуказанных концентраций гексапептида на специфический захват  $^3\text{H}$ -НА синапсами не вызывало достоверных изменений.

Показано, что гексапептид в концентрациях  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  и  $10^{-5}$  М не влиял на спонтанное и  $\text{K}^+$ -вызванное высвобождение  $^3\text{H}$ -5-ОТ, тогда как эти же концентрации его уменьшали захват  $^3\text{H}$ -5-ОТ на 41, 44 и 36% соответственно. Снижение концентрации гексапептида до  $10^{-8}$  М не вызывало изменений захвата  $^3\text{H}$ -5-ОТ. Полученные данные свидетельствуют о том, что в гипоталамической области гексапептид может участвовать в процессе захвата  $^3\text{H}$ -5-ОТ.

В присутствии гексапептида в концентрациях  $10^{-7}$ — $10^{-5}$  М наблюдалось некоторое статистически недостоверное подавление  $\text{K}^+$ -вызванного высвобождения  $^3\text{H}$ -ГАМК. В то же самое время, используемый в этих же концентрациях, он не влиял на специфический захват  $^3\text{H}$ -ГАМК в синапсах коры больших полушарий мозга крыс.

Таким образом, из вышесказанного следует, что в гипоталамической области гексапептид может участвовать в процессах пресинаптической регуляции высвобождения НА и обратного захвата 5-ОТ.

11 с., ил. 5, библиогр. 6 назв.  
Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Поступила 15. IV 1985

Рукопись депонирована в ВИНТИ 28.04.86. № 3113-В86

УДК 577.112:[577.352.4+577.352.334]:612.82

## ВЛИЯНИЕ БЕЛКА S-100 НА ТРАНСПОРТ РНК В КЛЕТОЧНЫХ ЯДРАХ МОЗГА КРЫС И АКТИВНОСТЬ АТРаЗЫ ЯДЕРНЫХ МЕМБРАН

КАПРАЛОВ А. А., ТЮЛЕНЕВ В. И., НАЗАРЕНКО В. И.

Обнаружено, что при добавлении белка S-100 к изолированным ядрам мозга, предварительно меченным *in vivo*  $^{14}\text{C}$ -сротовой кислотой (на 4-й дни инкубации), увеличивается выход кислотонерастворимой

метки на 100%, однако при последующей инкубации радиоактивность осадка снижается и на 15-й мин составляет 68% радиоактивности проб, инкубированных без белка S-100. Выход кислоторастворимого материала из ядер мозга увеличивается в присутствии белка S-100 на 20—50% во всех исследованных временных интервалах. При изучении влияния белка S-100 на транспорт РНК из изолированных ядер печени обнаружено увеличение транспорта РНК на 70% в первые минуты инкубации, но затем, как и при использовании ядер мозга, наблюдается уменьшение радиоактивности кислоторастворимого материала. Однако разницы в освобождении кислоторастворимой метки из ядер печени в присутствии белка S-100 и в его отсутствие не наблюдается.

При изучении влияния белка S-100 на активность ядерных РНКаз клеток мозга обнаружено, что на 4- и 8-й мин после начала инкубации белок S-100 не влияет на их активность, однако на 15-й мин инкубации количество кислоторастворимой метки в пробах, содержащих этот белок, на 16% превышает контрольный уровень. Сам белок S-100 не обладает РНКазной активностью и не влияет на активность панкреатической РНКазы при использовании в качестве субстрата коммерческого препарата дрожжевой РНК, то есть увеличение активности РНКаз ядер мозга может быть ответственно за увеличение транспорта кислоторастворимой метки и уменьшение транспорта РНК из ядер при длительной инкубации в присутствии белка S-100.

Показано также, что белок S-100 увеличивает активность АТРаз клеточных ядер мозга и ядерных мембран и влияет на включение  $^{32}\text{P}$  в липиды ядер. Это может иметь значение для понимания механизмов действия белка S-100 на транспорт РНК. Высказывается предположение об участии этого белка в процессах транспорта и/или процессинга РНК.

15 с., ил. 5, библиогр. 32 назв.  
Институт биохимии им. А. В. Палладина  
АН УССР, Киев.

Поступила 17. II. 1986

Рукопись депонирована в ВИНТИ 28.04.86. № 3112-B86

УДК 577.158+612.8.015

## ВЛИЯНИЕ ПУРИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ НА АКТИВНОСТЬ И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ МНОЖЕСТВЕННЫХ ФОРМ МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В МОЗГУ КРЫС

БУРНАЗЯН Л. Б., МОВСЕСЯН Н. О., УРГАНДЖЯН М. Г., АРУТЮНЯН А. В.

Изучали активность и распределение множественных форм митохондриальной и растворимой малатдегидрогеназы (МДГ) *in vitro* в присутствии нуклеотидов аденинового, гуанинового и инозинowego ря-

да при использовании в качестве кофакторов фермента NAD или деамино-NAD (D-NAD). Активность МДГ определяли спектрофотометрически, множественные формы фермента после разделения растворимой фракции или митохондриального экстракта мозга диск-электрофорезом в 7,5%-ном ПААГ выявляли окрашиванием в среде, содержащей нитросиний тетразолий и феназин-*m*-сульфат. Сканирование гелей проводили на приставке к спектрофотометру «Specord UV VIS» при 560 нм.

Установлено, что величина *U. A.* митохондриальной МДГ составляет 1637 нмоль NADH /мг белка/мин, что почти в 4 раза превышает активность фермента в растворимой фракции. NAD по сравнению с D-NAD является значительно более эффективным кофактором митохондриальной и растворимой формы фермента. Показано, что аденин-, гуанин- и инозиннуклеотиды в концентрации 0,02 М заметно ингибируют активность МДГ в растворимой и митохондриальной фракциях мозга при использовании NAD в качестве кофактора фермента. Влияние нуклеотидов при связывании фермента с D-NAD вместо NAD гораздо менее выражено. Наиболее сильное ингибирующее действие на активность растворимой и митохондриальной МДГ среди всех испытанных нуклеотидов (AMP, ADP, ATP, GMP, GDP, GTP, IMP, IDP и ITP) оказывают нуклеозидтрифосфаты и IDP. Максимальным эффектом обладает GTP, ингибирующий активность МДГ на 80—90%.

Показано, что при связывании нуклеотидов ингибирование активности МДГ сопровождается изменением в содержании ее множественных форм. В митохондриальной и растворимой фракциях мозга обнаруживаются 3 изоформы фермента, если субстратом реакции является DL-малат. По электрофоретической подвижности они разделяются на катодную, которая преобладает в митохондриальной фракции и две анодные, одна из которых минорная, локализованные преимущественно в растворимой фракции. В присутствии нуклеотидов, ингибирующих активность МДГ, при использовании в качестве кофактора реакции NAD в обеих фракциях, наряду с некоторым увеличением процентного содержания катодных форм, снижается содержание анодных форм МДГ.

Полученные данные свидетельствуют о том, что пуриновые нуклеотиды и их производные вызывают ингибирование окисления малата и изменение соотношения множественных форм МДГ в митохондриальной и растворимой фракциях мозга крыс.

12 с., ил. 4, библиогр. 13 назв.  
Институт биохимии АН АрмССР,  
Ереван

Поступила 7. II 1985

Рукопись депонирована в ВИНТИ 28.04.86. № 3115-В86

## ОБМЕН ГИДРОФИЛЬНОЙ И ГИДРОФОБНОЙ ЧАСТЕЙ МОЛЕКУЛЫ ФОСФОЛИПИДОВ В СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЯХ МОЗГА КРЫС ПРИ ИШЕМИИ

ГАСТЕВА С. В., РАНЗЕ Т. Е., ШАРАГИНА Л. М.

Проведено сравнительное исследование интенсивности обмена гидрофильной (по скорости включения  $^{32}\text{P}$ -ортофосфата натрия) и гидрофобной (по скорости включения  $^{14}\text{C}$ -ацетата натрия) частей молекулы фосфолипидов (ФЛ) в субклеточных фракциях ткани больших полушарий головного мозга крыс в норме (ложнооперированные крысы) при неполной ишемии головного мозга, созданной наложением съемных лигатур на общие сонные артерии на 5 ч, а также через 1 неделю после снятия лигатур и возобновления кровообращения. В норме обнаруживаются существенные различия между метаболической активностью гидрофильных и гидрофобных частей молекулы ФЛ. Во всех исследованных субклеточных фракциях (микросомы, цитозоль, миеллин, синантосомы, митохондрии) интенсивность обмена в монофосфонузитидах существенно превышает таковую в фосфатидилхолинах, сфингомиелинах и аминокислотных фосфолипидах, в то время как интенсивность обмена гидрофобной части максимальна в фосфатидилхолинах. Наибольшие величины интенсивности обмена как гидрофильной, так и гидрофобной частей наблюдаются во фракциях митохондрий и цитозоля, наименьшие — в миелине. Ишемия, не влияя на содержание ФЛ, вызывает снижение интенсивности их обмена, причем снижение обмена гидрофобной части молекулы ФЛ более выражено, чем гидрофильной. Степень угнетения обмена гидрофобной части молекулы ФЛ сходна во всех исследованных субклеточных фракциях (на 63—70%), в то время как подавление обмена гидрофильной части более выражено во фракциях синантосом и митохондрий (на 58 и 51%). В постишемическом периоде наблюдается тенденция к нормализации обмена ФЛ, особенно гидрофильной части их молекулы, метаболизм которой повышается до нормального уровня во всех исследованных субклеточных фракциях, кроме синантосом и митохондрий, интенсивность обмена ФЛ в которых остается сниженной, однако в меньшей степени, чем при ишемии. В интенсивности обмена гидрофобной части молекулы ФЛ также наблюдается тенденция к восстановлению, хотя ее величины еще ниже контрольных на 30—40%. В это время наблюдается также снижение содержания ФЛ во фракциях синантосом и митохондрий (на 30%) и повышение его в цитозоле (на 32%).

Таким образом, метаболизм гидрофобной части молекулы ФЛ всех изученных субклеточных структур ткани мозга оказался более чувствительным к ишемическому воздействию, чем метаболизм гидро-

фильной ее части. Более глубокое снижение обмена гидрофильной части молекулы ФЛ, замедленная нормализация его и изменение содержания ФЛ в постиншемическом периоде свидетельствуют о большей чувствительности митохондрий и синапсом к нарушениям кровоснабжения мозга по сравнению с другими субклеточными структурами.

7 с., ил. 2, библиогр. 10 назв.  
Институт физиологии им. И. П. Павлова  
АН СССР, Ленинград

Поступила 12. XII 1985

Рукопись депонирована в ВИНТИ 28.04.86. № 3111-B86

## ЗАМЕЧЕННЫЕ ОПЕЧАТКИ

Стр.	Строка	Напечатано	Следует читать
118	9 сверху	Рис. 1. Влияние $\text{Na}^+$ на специфическое связывание....	Рис. 1. Специфическое связывание...
119	14 сверху	...характеризовалось значениями $K_d$ около 180 нМ и $V_{\text{max}}$ 1,2 пмоль/мг белка (рис. 4).	...характеризовалось значениями $K_d$ около 170 нМ и $V_{\text{max}}$ 1,4 пмоль/мг белка (таблица).
131	8 снизу	...дезаминируют оба типа MAO	...дезаминируются обоими типами MAO

## СОДЕРЖАНИЕ

<i>Горюдинский А. И., Дамбинова С. А.</i> Влияние $\text{Na}^+$ и $\text{Ca}^{2+}$ на рецепторное связывание 3H-L-глутамата с мембранами нервных клеток	115
<i>Третьяк Т. М., Архипова Л. В.</i> Взаимодействие L-ДОФА с внутриклеточными структурами мозга и печени крыс	125
<i>Зейналов Т. А., Ермолаев К. М., Позднеев В. Ф., Камышанский Н. С.</i> Активация МАО типа Б головного мозга быка 2-изопропоксибензилметилкарбаматом и некоторыми его структурными аналогами	131
<i>Галоян А. А., Гураиц Б. Я., Шарова Н. П.</i> Об активации фосфодиастеразы циклического гуанозин-3', 5'-монофосфата гипоталамуса метилксантинами и папаверином	139
<i>Демин Н. Н., Шортанова Т. Х., Головина Т. Н., Рубинская Н. Л.</i> Белки и РНК в системе нейрон-нейроглия супраоптического ядра гипоталамуса головного мозга суслика в динамике зимней спячки	149
<i>Туманова С. Ю., Налбандян Р. М.</i> Взаимодействие ганглиозидов с медью	160
<i>Ростомян М. А.</i> Гистохимическое исследование аденилатциклазы в мозжечке крысы	167
<i>Базян А. С., Круеликов Р. И.</i> Исследование секреции норадреналина методом переноса срезов коры мозга крыс	172

### Краткие сообщения

<i>Чеботарева Т. Л., Герштейн Л. М.</i> Действие тетрапептида тифцина на содержание белков в нейронах двигательной системы мозга крыс	180
<i>Мовсесян В. А., Кондратьев А. Д., Магакян Ю. А., Колтухчева Н. А., Гаспрлян Г. Г., Северин Е. С.</i> Стимуляция пролиферации культивируемых фибробластов фактором роста нервов из семенной плазмы быка	185
<i>Крупеникова Е. Ю., Юхананов Р. Ю., Михалева И. И., Бандаренко Т. И.</i> Содержание пептид дельта-сна-подобного материала в головном мозгу крыс в норме и при холодовом стрессе	190
<i>Асатрян Р. М., Бадалян Р. Б., Симонян А. А.</i> Анночувствительная АТРаза в субклеточных образованиях мозга кур в онтогенезе	194

### Письма в редакцию

<i>Оганесян В. С., Бадалян Л. Л., Беджанян К. Д.</i> Влияние белков на активность растворимой формы фосфатзависимой глутаминазы мозга	200
---	-----

### Хроника

<i>Аврова Н. Ф.</i> Липиды нервной ткани (по материалам X Международного собрания по нейрохимии, Рива-дель-Гарда, Италия, май, 1985 г.)	203
<i>Микеладзе Д. Г.</i> Молекулярная организация рецепторных белков, механизмы посттрансляционной модификации и проблемы памяти (по материалам X Международного собрания по нейрохимии, Рива-дель-Гарда, Италия, май, 1985 г.)	211

### Рефераты статей, направленных на депонирование в ВИНТИ

<i>Легостаев Г. Н., Анисимов Ю. З.</i> Анализ взаимодействия оплоидных пептидов и брадикинина на нейронах моллюсков и млекопитающих	217
---	-----

- Арменян А. Р., Аракелян Л. Н., Санасарян А. А., Мнджоян Е. О., Галоян А. А. Влияние гипоталамического гексапептида на высвобождение и захват  $^3\text{H}$ -норадреналина,  $^3\text{H}$ -серотонина и  $^3\text{H}$ -ГАМК в синапсосомах мозга крыс 218
- Каприлов А. А., Тюленев В. И., Назаренко В. И. Влияние белка S-100 на транспорт РНК в клеточных ядрах мозга крыс и активность АТФазы ядерных мембран 219
- Бурназян Л. Б., Мовсисян Н. О., Урганджян М. Г., Арутюнян А. В. Влияние пуриновых нуклеотидов и их производных на активность и распределение множественных форм малатдегидрогеназы в мозгу крыс 220
- Гастева С. В., Райзе Т. Е., Шарагина Л. М. Обмен гидрофильной и гидрофобной частей молекулы фосфолипидов в субклеточных фракциях мозга крыс при ишемии 222

## CONTENTS

<i>Gorodinsky A. I., Dambinova S. A.</i> Effect of Na and Ca ions on $^3\text{H}$ -L-glutamate binding to neuronal membranes . . . . .	115
<i>Tretyak T. M., Arkhipova L. V.</i> Interaction between L-DOPA and intracellular structures in rat brain and liver . . . . .	125
<i>Zeinalov T. A., Ermolayev K. M., Pozdnev V. F., Kamyshanskaya N. S.</i> Activation of bovine brain MAO (type B) by 2-Isopropoxyphenylmethylcarbamate and its analogues . . . . .	131
<i>Galoyan A. A., Gurvits B. Ya., Sharova N. P.</i> Methylxanthins and papaverin activate phosphodiesterase of cGMP . . . . .	139
<i>Doemin N. N., Shortanova T. Ch., Golovina T. N., Rubinskaya N. L.</i> Proteins and RNA in neuron-neuroglia of n. supraopticus during hibernation . . . . .	149
<i>Tumanova S. Y., Nalbandyan R. M.</i> Interaction of gangliosides with copper . . . . .	160
<i>Rostomian M. A.</i> Histochemical studies of adenylate cyclase in rat cerebellum . . . . .	167
<i>Bazyan A. S., Kruglikov R. I.</i> Slice transfer method to study noradrenalin secretion . . . . .	172

### Short communications

<i>Chebotarova T. L., Gerstein L. M.</i> Effect of tuftsin on protein content in rat brain motor neurons . . . . .	180
<i>Movsesyan V. A., Kondratyev A. D., Magakyan U. A., Koltukhcheva N. A., Gasparyan G. G., Severin E. S.</i> Stimulation of cultured fibroblasts proliferation by nerve growth factor from bovine seminal plasma . . . . .	185
<i>Krupennikova E. Yu., Yukhananov R. Yu., Mikhaleva I. I., Bondarenko T. I.</i> Delta sleep-inducing peptide like material level in rat brain at normal conditions and cold stress . . . . .	190
<i>Asatrian R. M., Badallan R. B., Simonian A. A.</i> Anion-sensitive ATPase in the subcellular fractions of hen brain in ontogenesis . . . . .	194

### Letters to Editor

<i>Oganesyan V. S., Badalyan L. L., Bejanyan K. D.</i> Involvement of proteins in the regulation of soluble phosphate-dependent brain glutaminase . . . . .	
---	--

### Comments

<i>Avrova N. F.</i> Recent advances in brain lipids research (Xth Meeting of ISN, Riva-del-Garda, Italy, May 1985) . . . . .	
<i>Mikeladze C. G.</i> Receptor proteins, mechanisms of posttranslational modifications and memory (Xth Meeting of ISN, Riva-del-Garda, Italy, May 1985) . . . . .	211

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

<i>Legostaev G. N., Anissimov Ju. Z.</i> Analysis of opioid peptides and bradykinin interaction at the snail and mammalian neurons . . . . .	217
<i>Armenian A. R., Arakelian I. N., Sanasarian H. A., Mnjoyan E. H., Galoyan A. A.</i> The effect of hypothalamic hexapeptide on the release and uptake of $^3\text{H}$ -noradrenaline, $^3\text{H}$ -serotonin and $^3\text{H}$ -GABA in brain synaptosomes . . . . .	218

<i>Kapralov A. A., Tyulenev V. I., Nazarenko V. I.</i> Action of S-100 protein on the nucleo-cytoplasmic transport of RNA in rat brain nuclei and activity of nuclear membrane ATPase . . . . .	219
<i>Burnazian L. B., Movsesian N. O., Urgandjan M. G., Haroutunian A. V.</i> Effect of purine nucleotides and their derivatives on the activity and distribution of multiple forms of malate dehydrogenase in rat brain . . . . .	220
<i>Gasteva S. V., Ratze T. E., Sharagina L. M.</i> Metabolism of hydrophilic and hydrophobic parts of the phospholipid molecule in rat brain subcellular fractions during ischemia . . . . .	222

## 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 глиняной 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. 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.

## INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Journal "Neirokhiimia" 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 typewritten 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 "Neirokhiimia"

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.