

том 5, № 3, 1986

ISSN 0203-493X

НЕЙРОХИМИЯ

ՆԵՅՆՈՒՄԻԱ



АКАДЕМИЯ НАУК СССР
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

НЕЙРОХИМИЯ ՆԵՅՐՈՔԻՄԻԱ

ТОМ 5, ВЫП. 3
Июль—сентябрь

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

Сдано в набор 20.07.1986 г. Подписано к печати 17.10.1986 г. ВФ 04117.
Бумага № 1, 70×108¹/₁₆. Высокая печать. Печ. лист. 7,25. Усл. печ. лист. 8,75.
Учет.-изд. 8,08. Тираж 620. Заказ 694. Издат. 6872.
Адрес редакции: 375044, Ереван-44, ул. П. Севака 5/1, т. 28-17-70, 28-16-52.
Издательство АН АрмССР, Ереван, 375019, пр. Маршала Баграмяна, 24 г.
Типография Издательства Академии наук АрмССР, Ереван-19,
пр. Маршала Баграмяна, 24.

Редакционная коллегия

А. А. ГАЛОЯН—главный редактор

Г. В. АПРИКЯН, А. В. АРУТЮНЯН (зам. главного редактора),
Л. С. АРУТЮНЯН (отв. секретарь), Я. В. БЕЛИК, Н. Н. ДЕМИН (зам.
главного редактора), К. Г. КАРАГЕЗЯН, П. Г. КОСТЮК, А. А. КРИ-
ЧЕВСКАЯ, В. К. ЛИШКО, Р. М. НАЛБАНДЯН, М. Ш. ПРОМЫСЛОВ,
В. И. РОЗЕНГАРТ, Т. М. ТУРПАЕВ, Л. Я. ТЯХЕПЫЛД, Г. С. ХА-
ЧАТРЯН

Редакционный совет

Н. Г. АЛЕКСИДЗЕ, С. В. ГАСТЕВА, Р. Н. ГЛЕБОВ, Б. А. КАЗАРЯН,
Р. И. КРУГЛИКОВ, В. Г. МХИТАРЯН, В. С. ОГАНЕСЯН, М. И. ПРО-
ХОРОВА, А. Д. РЕВА, Д. А. САХАРОВ, А. А. СИМОНЯН, А. М. УТЕВ-
СКИЙ, Е. М. ХВАТОВА, Л. С. ЧЕРКАСОВА, Р. Н. ЭТИНГОФ



УДК 616.894.02:615.711.1

РЕГУЛЯЦИЯ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ^3H -НОРАДРЕНАЛИНА ПРЕСИНАПТИЧЕСКИМИ α - И β -АДРЕНОРЕЦЕПТОРАМИ В СРЕЗАХ КОРЫ МОЗГА КРЫС

БАЗЯН А. С., КРУГЛИКОВ Р. И.

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии АН СССР, Москва

Исследовали вызванное (20 мМ KCl) и спонтанное высвобождение ^3H -норадреналина (НА) из срезов коры мозга крыс. Экзогенный НА в низких концентрациях (10^{-11} — 10^{-9} М) на фоне 20 мМ KCl вызывает β -ауторецепторную реакцию—усиление высвобождения, а при более высоких (10^{-8} — 10^{-7} М)— α -ауторецепторную реакцию—уменьшение высвобождения ^3H -НА у 7—8-месячных животных. При изменении концентрации НА в соответствующих диапазонах скорость β -реакции убывает, а α -реакции нарастает. Такая зависимость аутоадренорецепторов от концентрации медиатора образует зону стабильного высвобождения ($5,5 \cdot 10^{-9}$ М). У 3—4-месячных животных низкие концентрации НА (10^{-10} — 10^{-9} М) вызывают α -ауторецепторную реакцию, при этом стабильное высвобождение наблюдается при концентрации НА ниже 10^{-10} М. Увеличение концентрации Ca^{2+} от 1,3 до 2,6 мМ усиливает высвобождение в 1,44 раза, и сдвигает зону стабильного высвобождения до $2,4 \cdot 10^{-10}$ М НА.

Экзогенный НА в концентрациях 10^{-8} — 10^{-7} М в отсутствие KCl вызывает усиление накопления меченого медиатора в инкубационной среде. Анализ зависимости этого накопления от концентрации экзогенного НА указывает на процесс высокоаффинного захвата НА срезами коры с величиной $K_m 1,5 \cdot 10^{-7}$ М, автономно протекающий в срезах наряду с ауторецепторными процессами.

В течение последнего десятилетия были открыты и интенсивно исследованы центральные и периферические пресинаптические аутоадренорецепторы, которые локализованы на адренергических терминалях и регулируют высвобождение НА. Пресинаптический β -адренорецептор активируется меньшими концентрациями адреноагонистов и приводит к усилению высвобождения НА. Пресинаптический α -адренорецептор активируется высокими концентрациями адреноагонистов, при этом уменьшается высвобождение НА. Эти свойства пресинаптических адренорецепторов были учтены при разработке гипотезы, объясняющей некоторые механизмы синаптической пластичности при адренергической передаче [1].

Согласно этой гипотезе, активация пресинаптических адренорецепторов обеспечивает синаптическую депрессию или облегчение, в

основе которых лежат процессы постепенного уменьшения или увеличения количества высвобождаемого медиатора—от импульса к импульсу в серии пресинаптической импульсации и дальнейшая стабилизация секреции на определенном уровне. Модельный математический анализ гипотезы [2, 3] показал, что вышеуказанные процессы возможны, когда функционирование пресинаптических β - и α -адренорецепторов образует зону стабильного высвобождения. Эта зона соответствует той концентрации НА, при которой пресинаптический β -рецептор уже не активируется, усиливая высвобождение при концентрациях НА ниже концентрации зоны стабильного высвобождения, а пресинаптический α -рецептор еще не активируется, но начиная с концентрации, соответствующей зоне стабильного высвобождения, увеличивается тормозное действие α -рецептора при увеличении концентрации НА.

Целью настоящей работы было выяснение зависимости высвобождения ^3H -НА от концентраций экзогенного немеченого НА, активирующих пресинаптические адренорецепторы.

Материалы и методы

Опыты проводили на самцах белых беспородных крыс в возрасте 7—8 месяцев, массой 300—350 г и в возрасте 3—4 месяцев, массой 180—230 г. 4 или 8 тангенциальных срезов теменной коры толщиной 0,3 мм инкубировали одновременно в буферной (1 мМ Na + -фосфата и 15 мМ бикарбоната) среде Кребса-Рингера (рН 7,25) при насыщении карбогеном (95% O_2 + 5% CO_2) в течение 15 мин при 37°. Затем в инкубационную среду добавляли 10 или 20 мкКи DL- ^3H -НА («Amersham», Англия) с удельной радиоактивностью 10 или 20 Ки/ммоль и концентрацией $2,5 \cdot 10^{-10} \pm$ НА/мл и инкубировали 10 мин. Срезы одновременно промывали в течение 30 мин их параллельным переносом в чистые инкубационные среды. Спонтанное высвобождение определяли измерением радиоактивности, накопленной в течение 2-минутной инкубации в 1 мл среды Кребса-Рингера. Вызванное высвобождение определяли измерением радиоактивности, накопленной в течение 2-минутной инкубации срезов в 1 мл среды Кребса-Рингера, содержащей 20 мМ KCl. Интенсивность секреции S определяли соотношением вызванного и спонтанного высвобождения, интенсивность которого исследовали до 5 раз (S_1 — S_5) параллельно у каждого среза с интервалом промывки между секретами 30 мин. У половинных срезов за 15 мин до исследования S_2 — S_5 промывку проводили при наличии в инкубационной среде 10^{-11} — 10^{-7} М L-НА («Serva», ФРГ). Спонтанное и вызванное высвобождение из этих срезов определяли при тех же условиях. На основании 5-кратного исследования S вычисляли соотношение S_n/S_1 , где n—порядковый номер деполаризации, равный 2, 3, 4 и 5. Коэффициент регуляции высвобождения НА (C)—отношение S_n/S_1 в присутствии экзогенного НА к S_n/S_1 в отсутствие НА—определял степень влияния различных концентраций НА на секрецию ^3H -НА [4].

Результаты исследования

Результаты, полученные при исследовании влияния экзогенного НА разной концентрации на высвобождение ^3H -НА у 7—8-месячных животных, представлены на рис. 1. Обнаружено, что НА в низких концентрациях (10^{-11} — 10^{-9} М) усиливает высвобождение ^3H -НА, при этом эффект уменьшается с увеличением концентрации НА. Более высокие концентрации (10^{-8} — 10^{-7} М) уменьшают высвобождение

^3H -НА. Данный эффект усиливается при увеличении концентрации НА. На рис. 1 представлена гипотетическая кривая зависимости коэффициента регуляции высвобождения НА (С) пресинаптическими аутоадренорецепторами от концентрации НА [2, 3, 5]. Видно достаточное соответствие между гипотетической и экспериментальной кривыми. Зона стабильного высвобождения (точка пересечения кривой с осью абсцисс) у 7—8-месячных животных равна $5,5 \cdot 10^{-9}$ М НА.

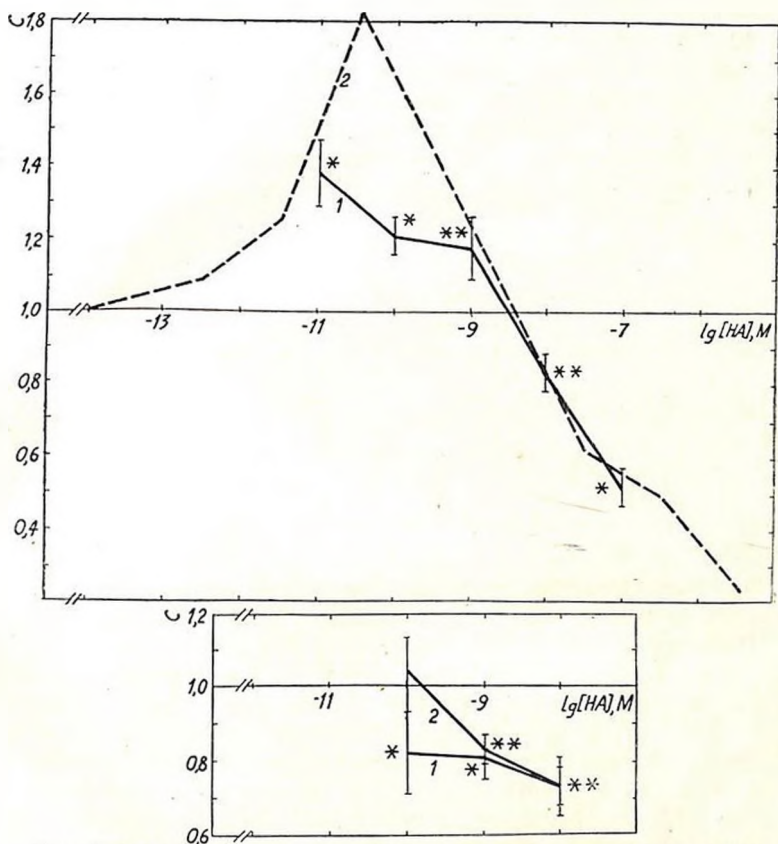


Рис. 1. График зависимости коэффициента регуляции высвобождения С от концентрации экзогенного НА у 7—8-месячных животных. 1—экспериментальная кривая; 2—гипотетическая кривая; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ по сравнению с $C=1$

Рис. 2. График зависимости коэффициента регуляции высвобождения С от концентрации экзогенного НА у 3—4-месячных крыс. 1—1,3 мМ Ca^{2+} , 2—2,6 мМ Ca^{2+} . Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

Результаты, полученные при исследовании 3—4-месячных животных при двух концентрациях Ca^{2+} в инкубационной среде, — 1,3 мМ (кривая 1) и 2,6 мМ (кривая 2) — представлены на рис. 2. Все иссле-

дованные концентрации экзогенного немеченого НА (10^{-10} — 10^{-9} М) вызывают уменьшение высвобождения ^3H -НА при концентрации Ca^{2+} 1,3 мМ (кривая 1). Увеличение вдвое концентрации Ca^{2+} не приводит к достоверным изменениям величины С в каждой точке, но повышает зону стабильного высвобождения. При сравнении рис. 1 и 2 видно, что кривая активности пресинаптической регуляции высвобождения НА у более молодых животных сдвинута в сторону низких концентраций НА, при этом зона стабильного высвобождения $\leq 2,4 \cdot 10^{-10}$ М НА.

Средние величины интенсивности высвобождения ^3H -НА у различных групп животных представлены в табл. 1. Интенсивность высвобождения у 3—4- и 7—8-месячных животных при 1,3 мМ Ca^{2+} практически одинакова, увеличение концентрации Ca^{2+} до 2,6 мМ усиливает её в 1,44 раза.

Таблица 1

Интенсивность высвобождения ^3H -НА из срезов коры мозга крыс

Группа животных	S
3—4-месячные животные, 2,6 мМ Ca^{2+}	$3,14 \pm 0,26$ (8)
3—4-месячные животные, 1,3 мМ Ca^{2+}	$2,18 \pm 0,11$ (8) $p < 0,01$
7—8-месячные животные, 1,3 мМ Ca^{2+}	$2,19 \pm 0,09$ (3) $p < 0,001$

Примечание. р — критерий Стьюдента по сравнению с группой 1. В скобках указано количество животных.

Для определения влияния экзогенного НА отдельно на спонтанное и вызванное высвобождение ^3H -НА из срезов вычисляли процентное отношение последующего спонтанного высвобождения (CB_n , где $n=2\dots 5$) к CB_1 и последующего вызванного высвобождения (BB_n , где $n=2\dots 5$) к BB_1 . Те же отношения вычисляли в присутствии экзогенного НА. Как видно из табл. 2, экзогенный немеченый НА в концентрациях 10^{-11} — 10^{-9} М не приводит к достоверным изменениям спонтанного высвобождения ^3H -НА, в то время как концентрации 10^{-8} — 10^{-7} М значительно усиливают этот процесс. Условия проводимых экспериментов таковы, что спонтанно выделившийся ^3H -НА может вновь активно захватываться терминалями и глialными клетками срезов коры. Немеченый НА, добавляемый в среду инкубации, конкурирует со спонтанно выделившимся ^3H -НА, уменьшая долю его захвата. Для построения зависимости накопления ^3H -НА в инкубационной среде от концентрации НА использовали только достоверные результаты из табл. 2 и рассчитывали эффект воздействия экзогенного НА, приравнивая начало координат отсчета к нулю. Первым способом пересчитывали величину отношения $\Pi/1$. Эффект соответствующей концентрации НА составлял $[(\Pi/1) - 1]$: 10^{-8} М НА = 1,20—

Таблица 2

Влияние экзогенного НА на спонтанное и вызванное высвобождения ЗН-НА из
срезов коры мозга крыс в инкубационную среду

Группа животных	Концентрация НА, М	$\frac{CB_n}{CB_1} \%$ I	$\frac{CB_n(НА)}{CB_1} \%$ II	p	II/I	$\frac{BB_n}{BB_1} \%$ III	$\frac{BB_n(НА)}{BB_1} \%$ IV	p	IV/III	Количество животных
7-8-месячные животные, 1,3 мМ $CaCl_2$	10^{-11}	$58,7 \pm 5,1$	$55,2 \pm 4,9$	$p_z < 0,01$ $p_t < 0,001$	$0,89 \pm 0,08$	$53,1 \pm 4,7$	$58,2 \pm 2,3$	$p_z < 0,01$	$1,14 \pm 0,11$	5
	10^{-10}	$37,9 \pm 3,9$	$37,9 \pm 4,2$		$1,00 \pm 0,1$	$42,8 \pm 4,1$	$50,0 \pm 5,1$		$1,19 \pm 0,09$	6
	10^{-9}	$36,2 \pm 2,8$	$37,3 \pm 2,5$		$1,06 \pm 0,04$	$47,2 \pm 7,1$	$47,3 \pm 7,5$		$1,08 \pm 0,11$	11
	10^{-8}	$28,8 \pm 4,4$	$34,6 \pm 6,2$		$1,20 \pm 0,05$	$54,9 \pm 7,3$	$51,0 \pm 6,2$		$0,97 \pm 0,1$	11
	10^{-7}	$48,4 \pm 6,9$	$104,8 \pm 10,9$		$2,24 \pm 0,13$	$39,9 \pm 7,3$	$48,3 \pm 5,4$		$1,29 \pm 0,1$	10
3-4-месячные животные, 1,3 мМ $CaCl_2$	10^{-10}	$51,0 \pm 5,5$	$52,0 \pm 5,7$	$p_t < 0,05$	$1,03 \pm 0,02$	$52,5 \pm 2,7$	$49,4 \pm 4,4$	$p_z < 0,05$	$0,94 \pm 0,08$	6
	10^{-9}	$32,6 \pm 3,5$	$30,9 \pm 4,9$		$1,05 \pm 0,1$	$35,3 \pm 4,0$	$33,6 \pm 5,2$		$0,94 \pm 0,06$	6
	10^{-8}	$22,5 \pm 1,6$	$29,1 \pm 1,2$		$1,27 \pm 0,08$	$24,2 \pm 2,8$	$24,7 \pm 3,8$		$1,01 \pm 0,08$	6
3-4-месячные животные, 2,6 мМ $CaCl_2$	10^{-10}	$44,4 \pm 1,2$	$43,3 \pm 2,0$	$p_t < 0,01$	$0,98 \pm 0,05$	$54,3 \pm 5,2$	$48,0 \pm 4,7$	$p_z < 0,05$	$0,92 \pm 0,09$	8
	10^{-9}	$29,0 \pm 1,3$	$31,2 \pm 1,4$		$1,08 \pm 0,04$	$31,1 \pm 3,5$	$26,1 \pm 3,0$		$0,85 \pm 0,05$	8
	10^{-8}	$21,9 \pm 0,9$	$27,6 \pm 1,4$		$1,29 \pm 0,09$	$21,8 \pm 2,8$	$19,6 \pm 2,8$		$0,91 \pm 0,06$	8

Примечание: p_z —критерий Вилкоксона для сопряженных пар, p_t —критерий Стьюдента.

$I=0,20$; 10^{-7} М НА=2,24— $I=1,24$. Вторым способом приравнивали отношение I к 50% и пересчитывали эффект соответствующей концентрации НА для отношения $I:10^{-8}$ М НА= $(50/28,2) \cdot 34,6=50$; 10^{-7} М НА= $(50/48,8) \cdot 104,8=50$. Используя систему двойных обратных координат, получили линейный график высокоаффинного захвата НА срезами коры мозга крыс с $K_m=1,5 \cdot 10^{-7}$ М НА (рис. 3). По литературным данным, K_m высокоаффинного захвата НА срезами или синапсомыи мозга животных составляет $2-4 \cdot 10^{-7}$ М НА [6].

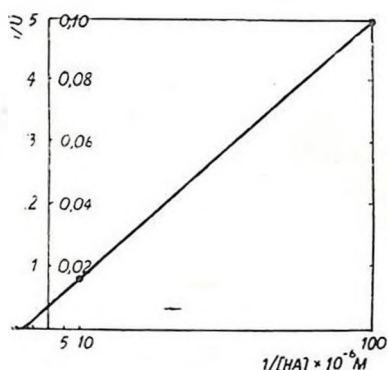


Рис. 3. График анализа зависимости накопления ^3H -НА в инкубационной среде U от концентраций экзогенного НА. $U=[(I/I)-1]$ при масштабе делений 1...5, $U=[50/(CB_n/CB_1) \cdot (CB_n/(НА/CB_1))]-50$ при масштабе делений 0,02...0,1. Данные рассчитаны из достоверных значений табл. 2.

Анализ результатов по влиянию экзогенного немеченого НА на вызванное высвобождение ^3H -НА (табл. 2) показывает, что изменения, в основном, недостоверны, но они сохраняют ту же тенденцию (за исключением НА в концентрациях 10^{-7} и 10^{-8} М), которая наблюдается при исследовании влияния экзогенного НА на интенсивность высвобождения ^3H -НА (рис. 1 и 2).

Обсуждение результатов

Таким образом, проведенные исследования показали, что у 7—8-месячных животных НА в низких концентрациях вызывает усиление высвобождения, а при более высоких концентрациях—уменьшение высвобождения ^3H -НА. Применение тангенциальных срезов коры мозга и исходной концентрации ^3H -НА $2 \cdot 10^{-10}$ М дает основание предполагать, что наблюдаемые эффекты обусловлены активацией пресинаптических адренорецепторов, локализованных на адренергических терминалях [4]. При помощи фармакологического анализа было показано, что усиление секреции НА связано с активацией пресинаптического β -аутоадренорецептора, а уменьшение—с активацией α -аутоадренорецептора [1, 7, 8]. Эти реакции наблюдаются и в периферической [1], и в центральной [7, 8] НС. На основании сходства полученных нами результатов и указанных выше литературных данных можно сделать вывод, что наблюдаемое усиление высвобождения ^3H -НА, вызываемое низкими концентрациями экзогенного НА, обус-

ловлено активацией центральных β -ауторецепторов, а уменьшение высвобождения, индуцируемое более высокими концентрациями НА,— центральных α -ауторецепторов.

В данной работе показано (рис. 1), что между концентрациями, активирующими β - и α -ауторецепторы, находится концентрация НА, на которую уже не реагирует β -рецептор и еще не реагирует α -рецептор. Анализ математических моделей показал [2, 3], что это та концентрация НА, при которой наблюдается высвобождение постоянного количества медиатора на каждый импульс в серии, что стабилизирует амплитуду постсинаптического потенциала вследствие синаптической депрессии или облегчения в течение пресинаптической импульсации. Мы назвали эту концентрацию зоной стабильного высвобождения. В наших экспериментальных исследованиях калевая деполяризация (20 мМ КСl) выступает как одиночный тестирующий стимул большой длительности. У 7—8-месячных животных в данном случае зона стабильного высвобождения находится в районе $5,5 \cdot 10^{-9}$ М НА.

Ранее были сделаны безуспешные попытки обнаружить β -аутоадренорецепторную реакцию в адренергических терминалях коры мозга крыс [7]. В более поздних исследованиях было показано [8], что β -адреноагонисты усиливают, а антагонисты уменьшают высвобождение ^3H -НА из чувствительных к резерпину участков коры мозга крыс. Такое противоречие литературных данных обусловлено, по-видимому, концентрациями лиганда, его родством к β -адренорецептору, степенью деполяризации, а также возрастом и состоянием животных. Действительно, в наших исследованиях концентрации НА 10^{-10} — 10^{-9} М вызывают β -ауторецепторную реакцию в срезах 7—8-месячных животных, а именно усиление высвобождения, а у 3—4-месячных животных НА в этих же концентрациях вызывает α -рецепторную реакцию, то есть уменьшение высвобождения. У более молодых животных β -аутоадренорецепторы, вероятно, активируются более низкими концентрациями НА, при этом зона стабильного высвобождения $\leq 2,4 \cdot 10^{-10}$ М НА.

Было показано, что пресинаптические ауторецепторы модулируют только лишь вызванное высвобождение ^3H -НА. Этот факт имеет принципиальное значение, поскольку считается, что истинно спонтанное и вызванное высвобождения медиаторов имеют единый квантовый механизм. Если истинно спонтанное и вызванное высвобождения отличаются только по количественным показателям, то и результаты воздействия на эти процессы должны отличаться только количественно. Наши исследования еще раз подтвердили известный факт, что НА поглощается срезами коры мозга при помощи механизма высокоаффинного захвата, интенсивность которого зависит от концентрации НА. Если и есть какое-то влияние активации аутоадренорецепторов на истинно спонтанное высвобождение, то оно может перекрываться процессом высокоаффинного захвата. Деполяризация, количественно усиливающая влияние ауторецепторов на процесс секреции, может привести к тому, что в этом

случае уже эффективность регуляции высвобождения перекрывает эффективность высокоаффинного захвата. Следовательно, результаты, представленные в табл. 2, в конечном счете определяются двумя автономными механизмами: захватом и высвобождением медиатора.

Исследование интенсивности высвобождения S исключает влияние высокоаффинного захвата, приравненного к единице, на величину коэффициента регуляции высвобождения (C) в том случае, если скорость и степень захвата в покое и возбуждении равны. Сравнение величин S и $ВВ$, приведенных на рис. 1, 2 и в табл. 2, дает основание полагать, что при деполяризации процесс регуляции высвобождения аутоадренорецепторами количественно перекрывает процесс высокоаффинного захвата. Известно, что при деполяризации эффективность высокоаффинного захвата уменьшается [6], но эти эксперименты не исключают участия вызванного высвобождения меченого НА, что может быть причиной меньшего накопления метки в срезах или синантосомах. Если деполяризация действительно независимо от высвобождения уменьшает высокоаффинный захват 3H -НА, то при измерениях величины S окажутся несколько заниженными, особенно при концентрации 10^{-7} М НА. Однако пока нет возможности точно оценить вклад обоих механизмов в экспериментальных условиях.

INVOLVEMENT OF PRESYNAPTIC β - AND α -ADRENORECEPTORS IN THE RELEASE OF 3H -NORADRENALINE IN RAT BRAIN CORTEX SLICES

BAZYAN A. S., KRUGLIKOV R. I.

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

Spontaneous and 20 mM KCL-induced release of 3H -noradrenaline (3H -NA) has been investigated in rat brain cortex slices. Application of NA (10^{-11} — 10^{-9} M) in the presence of 20 mM KCl induces increase in release of 3H -NA (β -autoreceptor reaction), while 10^{-8} — 10^{-7} M NA—decrease in 3H -NA release (α -autoreceptor reaction) in 7—8-months-old animals. This dose-response data create a zone of stable release of NA at $5.5 \cdot 10^{-9}$ M, in 3—4-months-old animals this zone is less than 10^{-10} M. Increase in Ca^{2+} (from 1,3 mM to 2,6 mM) enhances NA release 1,4-fold and shifts the zone of stable release to $2.4 \cdot 10^{-10}$ M.

In the absence of KCl, application of NA (10^{-8} — 10^{-7} M) leads to accumulation of 3H -NA in the incubation medium. Analysis of dose-response data point to a high-affinity uptake of NA by rat brain ($K_m = 1,5 \cdot 10^{-7}$ M) that exists independently from autoreceptor processes.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Базян А. С. Успехи соврем. биол., т. 92, № 4, с. 115—125, 1981.
2. Базян А. С., Бродский Б. Л. Биофизика, т. 28, № 5, с. 858—862, 1983.
3. Базян А. С. Биофизика, т. 29, № 3, с. 470—472, 1984.
4. Базян А. С., Кругликов Р. И. Нейрохимия, т. 5, № 2, с. 172—179, 1986.
5. Базян А. С., Беркинблит М. Б., Бродский Б. Л. Биофизика, т. 29, № 5, с. 895—898, 1984.
6. Базян А. С., Майсов Н. Н. Успехи соврем. биол., т. 96, № 6, с. 435—450, 1983.
7. Старк К.—В кн.: Освобождение катехоламинов из адренергических нейронов (под ред. Д. М. Патона), с. 135—176, М., Медицина, 1982.
8. Shenoy A. K., Ziance R. J. Life Sci., v. 24, № 3, p. 255—264, 1979.

Поступила 12. II 1986

УДК 577.352.5:612.822

ДЕЙСТВИЕ ДВУХЦЕПОЧЕЧНОЙ РНК НА МЕМБРАННЫЕ ПРОЦЕССЫ ПЕЙСМЕКЕРНОГО НЕЙРОНА

ЗАХАРЯН Р. А., РЫЧКОВ Г. Е., ДАДАЛЯН С. С., БАКУНИЦ Н. С.,
АГАБАЛЯН А. С., РУХКЯН Л. А., АПРАПЕТЯН С. Н.

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР, Ереван

Изучено действие двухцепочечной РНК (дцРНК) на пейсмеркерную активность нейрона РРА1 ЦНС виноградной улитки. Исследована зависимость действия дцРНК на активность идентифицированных нейронов от содержания Ca^{2+} , K^{+} и Cl^{-} в перфузирующем растворе. Показано, что дцРНК существенно увеличивает амплитуду колебаний мембранного потенциала, что сопровождается значительным увеличением амплитуды фазы межпачковой гиперполяризации. Действие дцРНК может быть опосредовано активацией Na^{+} -насоса и увеличением входа Ca^{2+} внутрь клетки.

В настоящее время дцРНК рассматривается не только как индуктор интерферонов, но и как модулятор различных биохимических реакций, протекающих в клетке и зависящих, по крайней мере, от двух процессов, индуцируемых дцРНК в клетке: 1) активация синтеза (2'—5')-олигоаденилата, в свою очередь активирующего латентную РНКазу-Н [1]; 2) индукция дцРНК-зависимой протеникиназы, фосфорилирующей фактор инициации eI —2 [2]. Установлена тесная функциональная связь между регуляторными системами клетки, зависящими от 3', 5'-сАМР (сАМР) и (2'—5')-олигоаденилата [3].

Показано, что дцРНК является стимулятором первичного и вторично-иммунного ответов [4, 5]. Хотя препараты РНК используются при лечении разных заболеваний—тапето-ретиальной дистрофии, язвы желудка, бронхиальной астмы, пневмонии, трофических язв [6, 7], мембранный механизм действия остается практически не изученным.

Наряду с этим известно, что пейсмекерная активность клетки играет важную роль в поддержании общего физиологического тонуса организма, так как пейсмекерной активностью обладают такие жизненно важные органы, как сердце, кровеносные сосуды, гладкая мускулатура внутренних органов, ряд нервных образований в мозгу животного. Общепринятой моделью для исследования пейсмекерной активности являются экспериментально легкодоступные специальные нейроны в ЦНС виноградной улитки, нейрон RPa1 по классификации Шаланки и Сахарова [8], так называемый «параболический» пейсмекерный нейрон, который отвечает вспыхкообразной гиперактивностью, прерывающейся кратковременными гиперполяризациями мембраны.

Изучение действия дцРНК на характеристики пейсмекерной активности нейрона, с одной стороны, позволит предсказать характер действия дцРНК на пейсмекерную активность клеток и органов, а с другой—приблизит нас к пониманию мембранных механизмов, лежащих в основе действия дцРНК на клетку.

Материалы и методы

Методы получения, фракционирования и концентрирования дцРНК из дрожжей и внутриклеточной регистрации электрической активности гигантского нейрона улитки описаны нами ранее [9, 10]. Зависимость входа Ca^{2+} от концентрации дцРНК определяли с помощью изотопа ^{45}Ca . Предварительно извешенные ганглии инкубировали при 20° по 5 штук в течение часа в 2 мл раствора Рингера, pH 7,8, содержащего дцРНК и 5 мкл $^{45}\text{CaCl}_2$ с активностью 12,5 мКи. После инкубации ганглии 3-кратно промывали по 8 мин в нормальном растворе Рингера. Промытые ганглии растворяли в течение суток в растворе KOH. Для подсчета количества вошедшего изотопа использовался сцинтиллятор Брея и счетчик RGT (ГДР), настроенный на изотоп ^{45}Ca . Используемый физиологический раствор, в котором находился изолированный ганглий, содержал (в mM): NaCl—85, KCl—4, CaCl_2 —8, MgCl_2 —10, трис-HCl—10, глюкозы—5.

Содержание cAMP оценивали в ганглиях радиоиммунологическим методом с использованием стандартного набора для определения cAMP фирмы «Amersham» (Англия). Измерение радиоактивности проводили на жидкостном сцинтилляционном счетчике «Intertechnique SL-30» (Франция) с использованием стандартного диоксано-вого сцинтиллятора.

Результаты и обсуждение

Препарат дцРНК добавляли в перфузирующий физиологический раствор в концентрации 2 мкг/мл. На рис. 1, а, представлена запись электрической активности клетки RPa1, произведенная на самописце КСП—4, где темными участками изображена пачечная активность клетки, а направленные вниз гиперполяризационные фазы соответствуют межпачковой гиперполяризации клетки. Как видно из рис. 1, б, добавление в среду дцРНК приводит через 20 мин к резкому увеличению амплитуды колебания мембранного потенциала, которое сопровождается значительным возрастанием амплитуды межпачковой гипер-

поляризации и урежением ее частоты. При удалении из среды дцРНК отмечается полное восстановление электрической активности (рис. 1, в).

Увеличение амплитуды колебания мембранного потенциала, вызванное дцРНК, может быть отнесено за счет специфического воздействия дцРНК, а также, что мало вероятно в условиях нашего эксперимента, за счет эффекта смеси нуклеотидов или олигонуклеотидов—продуктов возможного ферментативного распада дцРНК. Известно, что дцРНК относительно стабильна к РНКазам; более того, дцРНК в растворе Рингера образует с Ca^{2+} микро-Са-преципитат РНК, который не подвержен деградации РНКазам. Тем не менее, устойчивость приме-

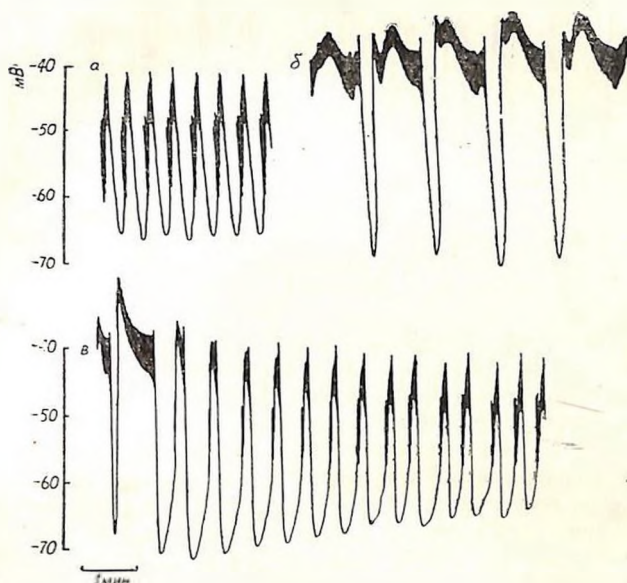


Рис. 1. Действие дцРНК на пейсмекерную активность нейрона RPa1. Электрическая активность нейрона в условиях: а—нормального физиологического раствора; б—через 20 мин после добавления в перфузирующий раствор дцРНК; в—через 10 мин после начала отмывки препарата

няемого Са-дцРНК комплекса к РНКазам нами тестирована, и нативность обработанного РНКазам препарата установлена электрофоретически в 1%-ном агарозном геле и 10%-ном ПААГ. Более того, препарат дрожжевой РНК после удаления из его состава дцРНК, использованный в тех же количествах, что и дцРНК, то есть 2 мкг/мл, оказался не эффективным в плане индукции увеличения амплитуды колебания мембранного потенциала.

Таким образом, одновременно отпадает и вариант индукции эффекта за счет неспецифического действия продуктов возможного распада РНК, в противном случае должна была бы проявиться актив-

ность смеси олигонуклеотидов от распавшейся дрожжевой РНК, не содержащей дцРНК.

Таким образом, действие дцРНК специфично для проявления эффекта необходимо постоянное ее присутствие в среде. Namburg и соавт. [11] на другом объекте также показали, что активация макрофагов дцРНК нуждается в постоянном присутствии в среде активатора.

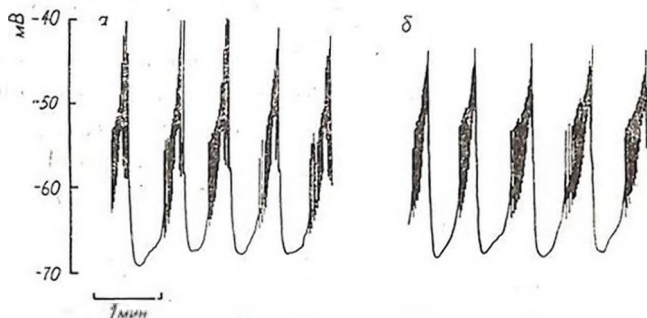


Рис. 2. Действие дцРНК на пейсмекерную активность нейрона RPa1 в условиях холода. *a*—активность нейрона в отсутствие препарата; *б*—через 30 мин после добавления в раствор дцРНК

Известно, что пейсмекерная активность клетки в значительной мере зависит от её метаболической активности [12]. Для выяснения, является ли действие дцРНК на пейсмекерную активность клетки следствием изменения метаболических или пассивных свойств мембраны, была изучена температурная зависимость действия дцРНК на пейсмекерную активность. Оказалось, что на холоду (7°) дцРНК не вызывала сколько-нибудь заметного изменения пейсмекерной активности клетки (рис. 2). Поскольку на холоду, когда имеет место деполяризация мембраны (5—7 мВ), метаболические процессы подавляются больше, чем диффузные, то можно предполагать, что дцРНК осуществляет свое действие на пейсмекерную активность через метаболическую активность клетки.

Ранее нами было показано, что Na^{+} -насос является модулятором пейсмекерной активности клетки [10, 13]. Для определения возможной активации Na^{+} -насоса дцРНК, которая и обуславливает повышенную гиперактивность пейсмекерного нейрона, изучали его действие на пейсмекерную активность клетки в условиях инактивации Na^{+} -насоса бескальциевым раствором или уабаином (10^{-4} М).

Предыдущими работами было показано, что после предварительной инкубации нейрона в бескальцевой среде при их реинкубации в физиологическом растворе, содержащем нормальную концентрацию K^{+} наблюдается кратковременная гиперполяризация мембраны, обусловленная активацией работы электрогенного натриевого насоса [10]. Как видно из рис. 3, в присутствии дцРНК амплитуда указанной ги-

перполяризации существенным образом увеличивалась, что свидетельствует об активации диРНКазной работы электрогенного Na^+ -насоса.

При исследовании действия диРНК на пейсмекерную активность клетки в условиях инактивации Na^+ -насоса [10] оказалось, что как в условиях холода, так и в бескальевом и убаинсодержащем растворе стимулирующий эффект диРНК на гиперполяризацию отсутствовал.

Тот факт, что эффект диРНК на пейсмекерную активность клетки на ее конечной фазе отсутствует в условиях выключения работы Na^+ -насоса, позволяет предположить, что модуляционное действие диРНК опосредовано через работу Na^+ -насоса. В пользу этого представления свидетельствуют полученные нами ранее данные [10] о том, что в норме при охлаждении, в бескальевой среде в присутствии убаина происходит частичное или полное подавление межпачковой гиперполяризации мембраны.

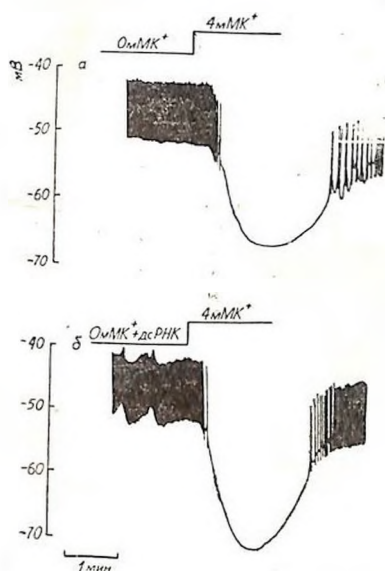


Рис. 3. Действие диРНК на насос-вызванную гиперполяризацию мембраны нейрона RPa1 после инкубации ганглия в бескальевом растворе в течение 30 мин: а—в отсутствие препарата; б—после инкубации в бескальевом растворе, содержащем диРНК

Таким образом, по-видимому, можно заключить, что усиление гиперполяризации пейсмекерного нейрона, вызванное диРНК, есть результат стимуляции работы Na^+ -насоса. В пользу такого представления свидетельствуют также полученные нами ранее данные о том, что электрогенный Na^+ -насос может играть триггерную функцию в генерации пейсмекерной активности клетки [14].

Другим метаболическим механизмом, обуславливающим стимулирующее действие диРНК на пейсмекерную активность клетки, может служить система сАМР клетки, модулирующая вход Ca^{2+} в нейрон

через кальцевые каналы [15] и Na/Ca^{2+} -обмен [16]. В связи с этим в последующей серии экспериментов мы исследовали как зависимость действия дцРНК на пейсмекерную активность — клетки от наружной концентрации Ca^{2+} , так и действие дцДНК на суммарный вход ^{45}Ca в клетку, а также влияние дцРНК на содержание сАМР в нервных ганглиях.

Оказалось, что латентный период действия дцРНК на пейсмекерную активность нейрона в значительной степени зависит от концентрации Ca^{2+} в среде (рис. 4). При увеличении концентрации Ca^{2+} в растворе от 8 до 16 мМ латентный период действия дцРНК сокращается с 20 до 8 мин. Следует отметить, что при этом укорачивается и время, необходимое для восстановления нормальной активности клетки после удаления препарата из среды. При уменьшении же концентрации Ca^{2+} в среде до 1 мМ вышеуказанный эффект дцРНК отсутствовал. Одновременно было показано, что дцРНК стимулировала вход ^{45}Ca внутрь клеток при 1-часовой инкубации нервных ганглиев улитки в нормальном физиологическом растворе, содержащем ^{45}Ca . После удаления внесклеточного ^{45}Ca ганглии содержали 1503 ± 109 в норме и 2108 ± 99 имп/мг влажного веса в присутствии в инкубационной среде 2 мкг/мл дцРНК.

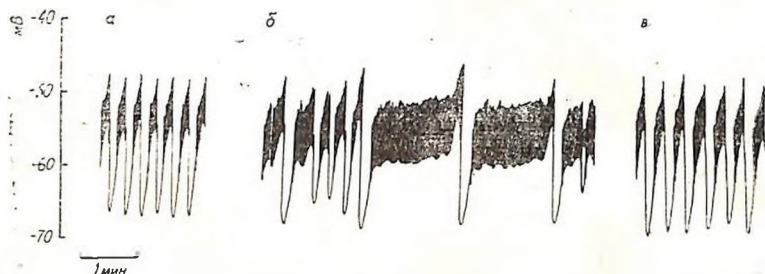


Рис. 4. Действие дцРНК на пейсмекерную активность нейрона RPaI в растворе, содержащем 16 мМ Ca^{2+} . а—активность нейрона в отсутствие препарата; б—через 8 мин после добавления в раствор дцРНК; в—через 7 мин после начала отмывки препарата

Убаин (10^{-4} М) хотя и не оказывал существенного влияния на вход ^{45}Ca в норме (1418 ± 69 имп/мг влажного веса), полностью снимал стимулирующий эффект дцРНК на вход ^{45}Ca в клетку (1442 ± 53 имп/мг влажного веса), вход которых в клетку обеспечивается как через потенциалзависимый Ca^{2+} -канал, так и через Na^{+} , Ca^{2+} -обмен. По-видимому, подавляющий эффект убаина на дцРНК-вызванное увеличение входа Ca^{2+} можно объяснить тем, что, как было показано Аугарстуап и соавт. [17], при действии убаина в результате подавления Na^{+} -насоса увеличивается внутриклеточное содержание АТР, которая в свою очередь подавляет сродство хеморецепторов мембраны к своим лигандам в результате их фосфорилирования.

Эти данные позволяют заключить, что для осуществления действия дцРНК на пейсмекерную активность клетки важную роль играют также ионы кальция. Известно, что в некоторых случаях убаин стимулирует вход Ca^{2+} внутрь клетки [18—20]. Это объясняется уменьшением Na^{+} -градиента на мембране в результате инактивации Na^{+} -насоса. Очевидно, что этот эффект четко выявляется в клетках, в которых имеется высокая исходная проницаемость для Na^{+} , например, в срезах головного мозга млекопитающих (*in vitro*). Отсутствие достоверного сдвига входа Ca^{2+} при действии убаина в условиях нашего эксперимента, по-видимому, можно объяснить относительно низкой проницаемостью мембраны нейронов виноградной улитки для Na^{+} . Однако данное предположение нуждается в экспериментальной проверке на обоих объектах. Можно предположить, что дцРНК в нейронах увеличивает количество сАМР, которая в свою очередь стимулирует вход Ca^{2+} именно через $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ -обмен, функционирующий преимущественно в период покоя нейрона.

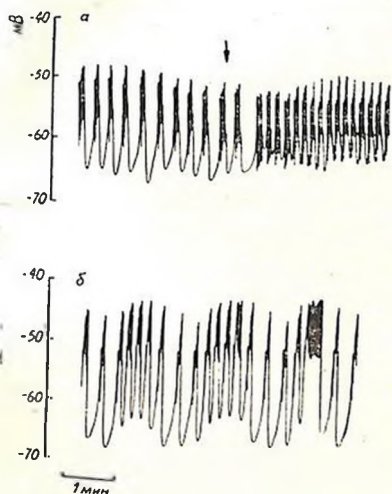


Рис. 5. Действие дцРНК на пейсмекерную активность нейрона RPa1 в растворе, содержащем 50 мМ Cl^{-} . а—активность нейрона в нормальном физиологическом растворе и в растворе с низким содержанием Cl^{-} (смена растворов обозначена стрелкой); б—активность нейрона в растворе, содержащем 50 мМ Cl^{-} через 20 мин после добавления дцРНК

Это предположение подтверждается данными относительно действия дцРНК на содержание сАМР в нейронах. Оказалось, что содержание сАМР, выраженное в пмоль/мкг белка в норме (контроль), составляло $7,50 \pm 0,82$, а после 20 мин инкубации ганглиев в растворе, содержащем дцРНК, количество сАМР достигало $22,87 \pm 1,34$. Интересно отметить, что как и в случае электрофизиологического эксперимента, при действии дцРНК в отсутствие K^{+} (в бескальневой среде уровень сАМР составлял $30 \pm 0,73$) содержание сАМР в клетках также уменьшалось ($13,88 \pm 1,53$).

В другой серии экспериментов была исследована зависимость действия дцРНК на пейсмекерную активность нейрона от содержания Cl^{-} в перфузирующем растворе. Снижение концентрации Cl^{-} до

50 мМ путем замены NaCl на ацетат натрия в исходном физиологическом растворе (рис. 5) не изменяло характер действия дцРНК на активность клетки. Как и в нормальном физиологическом растворе, в этом случае также увеличивалась амплитуда межпачковой гиперполяризации и количество импульсов в пачке.

Таким образом, дцРНК является высокоактивным мембранным препаратом, стимулирующим амплитуду колебаний мембранного потенциала пейсмекерного нейрона на основе как активации электронного Na^+ -насоса, так и повышения содержания сАМР в клетке, сопровождающегося увеличением входа Ca^{2+} внутрь клетки.

EFFECT OF DOUBLE-STRAND RNA ON THE MEMBRANE OF PACEMAKER NEURON

ZAKHARIAN R. A., RICHKOV G. E., AGABALIAN A. S., DADALIAN S. S.,
BAKUNTS I. S., RUKHIKIAN L. A., AYRAPETYAN S. N.

Institute of Experimental Biology, Academy of Sciences of Armenian
SSR, Yerevan

The action of ds-RNA on pacemaker activity in neuron RPa-1 from *Helix pomatia* central nervous system has been studied.

The dependence of ds-RNA action on the activity of nerve cells from Ca, K and Cl ions in the perfusion solution was investigated.

It was shown that ds-RNA is a powerful membrane-active preparation, which stimulates the pacemaker activity of neuron, activating the sodium pump, and increasing Ca ions influx into the cell.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Ratner L., Wiegand R. C., Farrel P. G., Sen G. C., Carber B., Lengyel P. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 81, p. 947—952, 1978.
2. Farrel P. G., Sen G. C., Dubois M. F., Ratner L., Lengyel P. Proc. Nat. Acad. Sci. USA., Biol. Sci., v. 75., p. 893—897, 1978.
3. Kripsin M. U., Parfenova M. M., Itkes A. V., Balandin I. G., Kuznetsov V. P., Severin E. S. Biochem. Int., v. 8, № 1, p. 159—164, 1984.
4. Mathe G., Florentin I., Olsson L., Bruely-Rosset M., Schultz J., Kiger M., Orbach-Arboyes S., Schwazzenberg L., Pinillart P., Wassat F. Cancer Treat Rep., v. 62, p. 1613—1621, 1978.
5. Han I. H., Johnson A. G. J. Immunol., v. 117, p. 423—427, 1976.
6. Земсков А. М., Повторов В. М., Никитин А. В. Антибиотики, т. 11, с. 853—855, 1979.
7. Земсков А. М., Земсков В. М., Передерий В. Г. Журн. микробиол. эпидемиол. иммунобиол., т. 9, с. 9—13, 1983.
8. Sukharov D. A., Salanki J. Acta Physiol. Acad. Sci. Hung., v. 35, p. 19—30, 1969.
9. Захарян Р. А., Месроbian Н. П., Мовсесян А. В., Асбалаян А. С., Акобян Ж. Н. Экспериментальная онкология, т. 7, № 3, с. 54—56, 1985.
10. Ayrapetyan S. N. Neurobiology of Invertebrates (ed. J. Salanki), p. 353—376, Budapest, 1975.
11. Hamburg S. I., Fleet H. B., Unkeless J. C., Rabinovitsch M. Ann. N. Y. Ac. Sci., v. 350, p. 72—91, 1980.

12. *Chalazonitis N., Arvanitaki A.* Adv. Biochem. Psychopharmacology, v. 2, p. 245—284, 1970.
13. *Kojima M., Ayrapetyan S. N., Koketsu K.* Comp. Biochem. and Physiol., v. 77A, p. 577—583, 1984.
14. *Айрапетян С. Н.* Биофизика, т. 14, № 5, с. 768—771, 1979.
15. *Kostyuk P. G.* Biochim. et biophys. acta, v. 621, p. 128—150, 1981.
16. *Bittar E. E.* Comp. Biochem. and Physiol., v. 76A, p. 763—771, 1983.
17. *Ayrapetyan S. N., Arvanov V. L., Maginyan S. B., Azatyan K. V.* Cell. and Molecular Neurobiology, v. 5, № 3, p. 231—243, 1985.
18. *Глебов Р. Н.* Укр. биохим. журн. т. 55, № 4, с. 460—465, 1983.
19. *Глебов Р. Н.* Успехи физиол. наук, т. 15, № 3, с. 83—90, 1984.
20. *Глебов Р. Н., Крыжановский Г. Н.* Функциональная биохимия синапсов, М., Медицина, 1978.

Поступила 26. XI 1985

УДК 547.781

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ГИСТАМИНА В РАЗЛИЧНЫХ ОТДЕЛАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА И АКТИВНОСТЬ ДИАМИНОКСИДАЗЫ ПРИ ТЕРМИНАЛЬНЫХ СОСТОЯНИЯХ, ВОССТАНОВЛЕНИИ ЖИЗНЕННЫХ ФУНКЦИЙ ОРГАНИЗМА И ДЕЙСТВИИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

ХАЧАТРЯН Г. С., ВАРТАНЯН Г. Г.

Филиал ВНИИ гигиены и токсикологии пестицидов, полимеров и пластических масс, Ереван

Изучены распределение гистамина в различных отделах мозга и активность диаминоксидазы при экспериментальной клинической смерти и в восстановительном периоде. При смертельном кровопуске отмечается значительное снижение концентрации гистамина в лобной доле и гипоталамической области и повышение в стволовой части и теменно-височной доле коры мозга. При клинической смерти содержание гистамина резко понижено в лобной доле, гипоталамической области, теменно-височной и затылочной долях, за исключением стволовой части, в которой уровень гистамина повышен. Нормализация уровня гистамина в изученных отделах в постреанимационном периоде протекает циклично и выравнивается после 80-й мин оживления. Активность диаминоксидазы в мозгу при смертельном кровопуске повышена и находится в прямой зависимости от концентрации гистамина. При клинической смерти активность фермента падает почти в 2 раза параллельно с резким понижением содержания гистамина и остается на низком уровне в начале восстановительного периода и лишь на 80-й мин после оживления приближается к уровню контроля. Введение в кровь адепозина и гуанозина значительно ускоряет нормализацию уровня гистамина в мозгу.

При терминальных состояниях важное значение приобретает изучение молекулярных основ нарушения компенсаторно-приспособительных реакций ЦНС и повреждения морфофункциональных структур головного мозга с целью выработки ускоренных методов восстановления жизненных функций организма.

Биохимические изменения, наступающие в мозгу при терминальных состояниях, в первую очередь затрагивают легко мобилизуемые физиологически активные соединения клеточного метаболизма, которые могут влиять на функциональное состояние регулирующих систем, базирующихся на трансмиссивной мобилизации и внутриклеточной медиации сигналов информации. В их числе особое место занимает недавно идентифицированный нейротрансмиттер гистамин [1]. В отличие от других моноаминов, большое количество гистамина ассоциируется с ненейрональными клетками и имеет внутриклеточный пул, что, вероятно, связано с его вовлечением в клеточную пролиферацию [2], в особенности в послеродовом периоде. Ритмическое выделение эндогенного гистамина в гипоталамус и деполаризационное стимулирование выделения амина подтверждают его трансмиссивную роль в ЦНС [3]. Одним из важнейших путей изучения этой проблемы является рассмотрение эффекта внутриклеточного (на нейрональной стороне ГЭБ) введения гистамина на обмен различных веществ. В клинической практике интенсивно изучается участие гистамина в аллергических и воспалительных процессах, в патогенезе стрессовых, терминальных и экстремальных состояний, в частности в патогенезе черепно-мозговой травмы. Эндогенный гистамин, высвобождаемый из различных структур мозга при травматических поражениях, влияет на развитие воспалительной реакции: вызывает набухание эндотелия капилляров, изменяет проницаемость сосудистой стенки, способствуя возникновению отека мозга. Гистамин играет определенную роль в механизме действия психотропных препаратов.

В нашей лаборатории изучена биохимическая характеристика катехоламинов и серотонина в головном мозгу в норме, при естественных физиологических воздействиях, терминальных состояниях и последующем восстановлении жизненных функций организма [4—6]. В свете этих работ нами изучена количественная характеристика гистамина в головном мозгу и его различных отделах, а также активность диаминооксидазы при экспериментально вызванной клинической смерти с последующим восстановлением жизненных функций организма и действия физиологически активных веществ: аденозина и гуанозина.

Материалы и методы

Исследования проводили на белых крысах-самках массой 250—300 г в 5-ти сериях экспериментов. Первая служила контролем. Животных второй и последующих серий подвергали наркозу путем внутривенного введения уретана в дозе 100 мг/100 г массы животного. В 3-ей серии опытов для получения модели клинической смерти производили кровопускание из левой сонной артерии. Экспериментальную клиническую смерть и оживление на фоне уретанового наркоза проводили методом Иеговского [7] в видоизменении Левина и соавт. [8]. В 5-ой серии опытов производили оживление организма на фоне клинической смерти путем внутривенного введения вынужденной крови. Подопытных животных во всех сериях экспериментов в нужный момент исследования замораживали в жидком азоте для фиксации и последующей регистрации биохимических сдвигов в мозгу.

Количественное определение гистамина производили флуориметрическим методом Shore [9] на спектрофлуориметре, сконструированном в нашей лаборатории. Пик возбуждения—360 мкм, пик флуоресценции—450 мкм. Активность диаминооксидазы определяли методом Cohn, Shore [10].

Результаты и обсуждение

Показано, что среднее содержание гистамина в целом мозгу в норме составляет $0,227 \pm 0,0013$ мкг/г (табл. 1).

Следует отметить, что высокое содержание гистамина в белом веществе мозга после рождения снижается в онтогенезе, между тем как уровень классических трансмисмиттеров и ферментов их биосинтеза одинаково низок после рождения и увеличивается в процессе синаптогенеза. Исследование кинетических характеристик и субклеточной локализации гистидиндекарбоксилазы достоверно показало возможность множественной компартментализации гистамина при вкладе роста, маскируемой онтогенезом в пуле трансмисмиттера [11]. Эти и другие исследования вызвали большой интерес к изучению гистаминергических рецепторов в мозгу млекопитающих посредством связывания ^3H -мепирамина в препаратах мембран [12]. Показано, что эффект гистамина реализуется посредством H_1 -рецептора в нейрональном компартменте и не связан с его ненейрональным выделением. В обзоре Green [13] подробно рассмотрены гистаминовые рецепторы в мозгу и различные ассоциированные эффекты в ответ на действие лекарственных веществ. Показано, что ткани и органы млекопитающих имеют большую избирательность связывания триметилгистидина (сетчатка и передний гипофиз соответственно в 100 и 20 раз).

Помимо оказания специфического гистаминергического действия, гистамин может изменять эффективность действия других медиаторов на различные органы. Большое значение придается участию гистамина в регуляции микроциркуляции крови, стимуляции выделения АКТГ и пролактина. По данным некоторых авторов, гистамин оказывает влияние на гликогенолиз, гликолиз и обмен фосфолипидов.

Как показывают данные табл. 1, содержание гистамина в состоянии уретанового наркоза несколько повышается и достигает $0,298 \pm 0,011$ мкг/г ткани. При смертельном кровопускании его уровень понижается, составляя $0,240 \pm 0,0130$ мкг/г. Значительное снижение содержания гистамина (до $0,192 \pm 0,009$ мкг/г) отмечается при клинической смерти. В период оживления уровень гистамина в течение 20 мин остается пониженным и составляет $0,119 \pm 0,004$ мкг/г, и лишь на 40-й мин от начала оживления отмечается увеличение содержания гистамина почти в 2 раза по сравнению с контролем. На 80-й мин восстановительного периода уровень гистамина понижается по сравнению с его уровнем на 40-й мин оживления, оставаясь выше уровня контроля. Процесс нормализации уровня гистамина в мозгу в восстановительном периоде наступает, по-видимому, несколько позднее 80-й мин после оживления и протекает циклично.

Таблица 1

Содержание гистамина (мкг/г ткани) в головном мозгу при терминальных состояниях и восстановлении жизненных функций организма

Контроль	Уретановый наркоз	Смертельное кровопускание	Клиническая смерть	После о ж и в л е н и я		
				20 мин	40 мин	80 мин
$0,227 \pm 0,013$ (24) p_1 p_2	$0,298 \pm 0,011$ (25) <0,001	$0,240 \pm 0,013$ (19) <0,05 <0,001	$0,192 \pm 0,009$ (15) >0,05 <0,001	$0,119 \pm 0,001$ (8) <0,001 <0,001	$0,442 \pm 0,012$ (8) <0,001 <0,001	$0,268 \pm 0,008$ (8) <0,001 <0,05

Примечание. В скобках указано количество опытов. p_1 —достоверность различия данных по сравнению с контролем; p_2 —достоверность различия данных по сравнению с уретановым наркозом.

Таблица 3

Активность диаминооксидазы (мкмоль гистамина/г ткани/ч) в мозгу при терминальных состояниях и восстановлении жизненных функций организма ($n=12$)

Контроль	Уретановый наркоз	Смертельное кровопускание	Клиническая смерть	После о ж и в л е н и я		
				20 мин	40 мин	80 мин
$0,0671 \pm 0,0035$ p_1 p_2	$0,0437 \pm 0,0007$ <0,001	$0,0787 \pm 0,002$ <0,01 <0,001	$0,0335 \pm 0,002$ <0,001 <0,001	$0,0384 \pm 0,0012$ <0,001 <0,001	$0,0417 \pm 0,0013$ <0,001 >0,05	$0,0585 \pm 0,0019$ <0,05 <0,001

Учитывая, что определение общего содержания гистамина в цельной мозговой ткани не может дать полной информации о синтезе и метаболизме амнина, мы изучали его содержание в различных отделах мозга: лобной, височно-теменной, затылочной долях коры больших полушарий, гипоталамической и стволовой областях. Из данных табл. 2 видно, что наибольшее его содержание в лобной доле и гипоталамической области, наименьшее — в стволовой части и затылочной доле, при этом в лобной доле в контроле составляет $0,243 \pm 0,023$ мкг/г, что несколько больше, чем в цельной мозговой ткани. Уретановый наркоз

Таблица 2

Содержание гистамина (мкг/г ткани) в различных отделах головного мозга при терминальных состояниях и восстановлении жизненных функций организма (n=8)

Контроль	Уретановый наркоз	Смертельное кровоупускание	Клиническая смерть	После оживления	
				40 мин	80 мин
Лобная доля коры мозга					
$0,243 \pm 0,023$	$0,252 \pm 0,004$	$0,191 \pm 0,036$	$0,160 \pm 0,008$	$0,416 \pm 0,011$	$0,201 \pm 0,003$
p ₁	<0,001	<0,05	<0,01	<0,001	<0,05
p ₂		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Теменно-височная доля коры мозга					
$0,200 \pm 0,007$	$0,254 \pm 0,004$	$0,241 \pm 0,006$	$0,163 \pm 0,004$	$0,403 \pm 0,018$	$0,226 \pm 0,007$
p ₁	<0,001	<0,01	<0,01	<0,001	>0,05
p ₂		<0,001	<0,001	<0,05	<0,001
Затылочная доля коры мозга					
$0,191 \pm 0,097$	$0,283 \pm 0,005$	$0,208 \pm 0,005$	$0,164 \pm 0,008$	$0,349 \pm 0,029$	$0,209 \pm 0,003$
p ₁	<0,001	>0,05	<0,01	<0,001	<0,01
p ₂		<0,001	<0,001	<0,05	<0,001
Гипоталамическая область					
$0,225 \pm 0,009$	$0,280 \pm 0,019$	$0,161 \pm 0,003$	$0,179 \pm 0,005$	$0,311 \pm 0,015$	$0,260 \pm 0,005$
p ₁	<0,05	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
p ₂		<0,001	<0,001	<0,05	<0,001
Стволовая область мозга					
$0,157 \pm 0,011$	$0,190 \pm 0,003$	$0,256 \pm 0,006$	$0,173 \pm 0,003$	$0,433 \pm 0,007$	$0,236 \pm 0,004$
p ₁	<0,01	<0,001	>0,05	<0,001	<0,001
p ₂		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

вызывает повышение содержания гистамина. При смертельном кровоупускании и клинической смерти уровень гистамина снижается как по сравнению с контролем, так и с наркозным фоном. Содержание гистамина в этой части мозга, как и в целом мозгу, заметно увеличивается на 40-й мин восстановительного периода, достигая $0,416 \pm 0,011$ мкг/г, а на 80-й мин оно ниже уровня контроля. В отличие от лобной доли уровень гистамина в височно-теменной доле коры мозга сравнительно низкий и составляет $0,200 \pm 0,007$ мкг/г. Его содержание повышено не только при уретановом наркозе, но и при смертельном кровоупускании.

При клинической смерти и восстановительном периоде после оживления организма отмечаются аналогичные с лобной долей изменения в содержании гистамина.

В затылочной доле коры мозга содержание гистамина наименьшее. Уретановый наркоз вызывает повышение содержания гистамина. Динамика изменений уровня гистамина в этой доле при смертельном кровопускании и клинической смерти аналогична изменениям, отмеченным в лобной и височно-теменной долях. Однако процесс восстановления содержания гистамина в этом отделе мозга в постреанимационном периоде происходит медленно: его уровень здесь на 40-й мин после оживления по сравнению с тем же состоянием в вышеуказанных долях коры остается сравнительно низким.

При наркозе, терминальных состояниях и восстановительном периоде в гипоталамической области мозга отмечаются однонаправленные с тремя вышеуказанными отделами изменения в содержании гистамина, за исключением периода смертельного кровопускания, при котором его содержание значительно снижено. Аналогичная картина отмечена в лобной доле при смертельном кровопускании. На 80-й мин после оживления здесь уровень гистамина отстает от контроля. При смертельном кровопускании и клинической смерти наиболее страдает лобная доля и гипоталамус, в которых уровень гистамина значительно понижается.

В стволовой части мозга в контроле отмечается очень низкое содержание гистамина— $0,157 \pm 0,023$ мкг/г по сравнению с $0,227 \pm 0,013$ мкг/г в цельной ткани мозга и $0,243 \pm 0,023$ мкг/г в лобной доле коры мозга. В отличие от лобной, височно-теменной, затылочной долей и гипоталамической области уровень гистамина в стволовой части при смертельном кровопускании остается высоким как по сравнению с контролем, так и его содержанием в других исследованных отделах мозга. Является также исключением сравнительно высокий уровень содержания гистамина в стволовой части мозга при клинической смерти, составляющий $0,173 \pm 0,003$ мкг/г по сравнению с $0,157 \pm 0,011$ мкг/г в контроле. Нормализация уровня гистамина в этой части мозга также протекает своеобразно. Увеличение содержания гистамина на 40-й и 80-й мин после оживления, хотя и имеет однонаправленность по сравнению с другими участками мозга, более выражено— $0,433 \pm 0,007$ и $0,236 \pm 0,004$ мкг/г, что соответственно в 2,7 и 1,5 раза выше контрольного уровня.

Динамика наибольшего повышения содержания гистамина в исследованных отделах мозга на 40-й мин после оживления имеет следующую последовательность: лобная, височно-теменная, затылочные доли, гипоталамус, хотя наибольшая концентрация гистамина на 80-й мин после оживления, наряду со стволовой частью мозга, отмечается в гипоталамической области.

Направленность обмена и распределение гистамина в мозгу при изученных нами терминальных состояниях имеют определенное сход-

ство с аналогичными данными в отношении серотонина, полученными в нашей лаборатории [14], и подтверждают мнение авторов относительно снижения количества биологически активных веществ при гипоксических состояниях различного генеза. Терминальные состояния и возникающая на их фоне глубокая гипоксия организма нарушают биоэнергетический обмен мозга. Нормализация уровней гистамина в мозгу в восстановительном периоде по сравнению с контрольным фоном значительно запаздывает.

В механизме снижения содержания гистамина в мозгу при стрессовых и терминальных состояниях, по-видимому, может играть определенную роль его усиленное разрушение под действием диаминооксидазы. Как показывают данные табл. 3, активность фермента в контроле составляет $0,0671 \pm 0,0035$ мкмоль/г/ч, а при уретановом наркозе понижается. При этом во всех отделах мозга отмечается повышенное содержание гистамина. Смертельное кровопускание, сопровождаемое усилением кровотока, учащением сердечного ритма и дыхания [15], вызывает достоверное понижение содержания гистамина в лобной, височно-теменной, затылочной долях коры и гипоталамической области, за исключением стволовой части, в которой содержание гистамина не претерпевает особых изменений. При наступлении гипоксии в период клинической смерти активность диаминооксидазы по сравнению с контролем и смертельным кровопусканием падает соответственно в 2 и 2,4 раза. Нормализация активности фермента в период восстановления жизненных функций организма наступает значительно позднее. На 20-й мин после оживления активность диаминооксидазы почти в 2 раза ниже активности контрольного фона и составляет всего $0,0384 \pm 0,0012$ мкмоль/г/ч. Характерно, что запаздывание нормализации активности фермента отмечается и на 40-й мин после оживления, при этом активность фермента составляет всего 62% от исходной величины и лишь на 80-й мин уровень активности фермента приближается к контрольному, составляя $0,0585 \pm 0,0019$ мкмоль/г/ч.

Анализ полученных данных показывает наличие прямой зависимости между активностью диаминооксидазы и уровнем содержания гистамина в мозгу в норме, при наркозе и смертельном кровопускании. В период оживления организма при сравнительно низких уровнях активности фермента низок и уровень содержания гистамина как в целом мозгу, так и в его различных отделах. По сравнению с другими биологически активными аминами, такими как норадреналин и дофамин [14], нормализация уровня гистамина значительно запаздывает, что соответствует низкому уровню активности диаминооксидазы.

Сопоставление кинетических характеристик и субклеточной локализации гистидиндекарбоксилазы [11] и полученных нами данных о характере изменений диаминооксидазы в мозгу при терминальных состояниях показывает нарушение синхронной регуляции уровня гистамина в мозгу и его различных отделах, в особенности в период восстановления жизненных функций организма. По сравнению с норадрена-

лином и дофамином [14] гистамин, как и серотонин, менее чувствителен к терминальным состояниям. Очевидно, в уменьшении количества гистамина в начальных стадиях терминального состояния немаловажное значение имеет его усиленное выделение и разрушение, что является защитно-компенсаторной реакцией ЦНС. Но при прекращении доступа кислорода к тканям в результате наступления клинической смерти, возможно, имеет место нарушение биосинтеза гистамина в результате ингибирования активности гистидиндекарбоксилазы.

Учитывая важное значение требуемых концентраций гистамина в мозгу в гистаминергической передаче информации, уравнивания процессов возбуждения и торможения ЦНС и обнаруженного нами эффекта запаздывания нормализации уровня гистамина мозга в восстановительном периоде после клинической смерти, исследовали целенаправленное воздействие ряда индукторов из группы природных соединений на содержание гистамина в мозгу путем введения их с выпущенной кровью при оживлении организма. При этом преследовали конкретную цель — изыскать средства, индуцирующие биосинтез и мобилизацию амина, ускоряющие нормализацию его уровня в мозгу. Основанием для этого послужили некоторые литературные данные, показывающие значительное увеличение содержания аденозина в мозгу при острой гипоксии [16], сохранение его уровня при хронической гипоксии. При общей ишемии (инсульт, декапитация) мозга порадриналиновая индукция 8-кратно повышает содержание сАМР в срезах коры мозга [17]. Компенсаторная роль этих процессов пока остается нераскрытой. Роль аденозина, сАМР и других нуклеотидов в ЦНС в настоящее время интенсивно изучается. Подобно таким нейротрансмиттерам, как порадриналин, дофамин и серотонин, аденозин вызывает накопление сАМР в тканях мозга [18]. Деполяризация центральных нейронов приводит к заметному выбросу аденозина в экстрацеллюлярную жидкость. Эндогенный уровень аденозина функционально связан с сАМР-системой и регулируется аденозиндезаминазой и аденозинзахватывающей системами [19]. Производные аденозина в синаптической щели регулируют уровень сАМР в терминали нерва непосредственно аденозиновым рецептором на поверхности пресинаптической мембраны [20]. Образование сАМР стимулируется также гистамином, дофамином, ADP и ATP в синапсоммах, обработанных аденозиндезаминазой. По типу обратной связи гистамин может повышать уровень аргининазопрессина в цереброспинальной жидкости [21], проявлять трофическое влияние на синаптогенез посредством стимуляции орнитиндекарбоксилазы при его внутрицеребральном введении [22]. Показано выделение гистамина и серотонина под влиянием других нейропептидов.

Исходя из вышеприведенных данных и учитывая взаимосвязь регуляторных механизмов биосинтеза и метаболизма многих биологически активных веществ, в том числе и гистамина, в первой ткани и чрезвычайно активную роль нуклеотидов в указанных процессах, мы испытали действие аденозина и гуанозина на процесс нормализации

уровня гистамина в мозгу в постреанимационном периоде. Аденозин и гуанозин («Sigma», США) вводили вместе с выпущенной кровью в концентрации 50 и 100 мкг/200 г массы животного и определяли содержание гистамина в мозгу после оживления организма. Как показывают данные табл. 4, аденозин в указанной дозе вызывает раннюю нормализацию содержания гистамина. Как было описано выше, без введения индукторов нормализация уровня гистамина наступала лишь на 80-й мин после оживления. Содержание гистамина при введении гуанозина в тех же концентрациях на 20-й мин после оживления значительно повышается, составляя соответственно $0,318 \pm 0,026$ и $0,334 \pm 0,011$ мкг/г. Таким образом, эффект гуанозина на повышение содержания гистамина в восстановительном периоде оказывается более значительным, чем эффект аденозина. Оба нуклеозиды намного ускоряют нормализацию уровня гистамина в мозгу.

Таблица 4

Содержание гистамина (мкг/г ткани) в мозгу в восстановительном периоде при действии аденозина и гуанозина

Контроль	На 20-й мин после оживления				
	без введения нуклеозидов	с введением нуклеозидов			
		а д е н о з и н		г у а н о з и н	
		50 мкг	100 мкг	50 мкг	100 мкг
$0,227 \pm 0,013$ (24) p_1 p_2	$0,119 \pm 0,004$ (8) $<0,01$	$0,220 \pm 0,004$ (4) $>0,05$ $<0,001$	$0,327 \pm 0,026$ (4) $<0,01$ $<0,01$	$0,318 \pm 0,026$ (4) $<0,01$ $<0,001$	$0,334 \pm 0,011$ (4) $<0,001$ $<0,001$

Примечание. В скобках указано количество опытов. p_1 —достоверность различия данных по сравнению с контролем; p_2 —достоверность различия данных по сравнению с данными постреанимационного периода без введения нуклеозидов (20-я мин после оживления).

Выявленное нами индуцированное аденозином и гуанозином повышение уровня гистамина в различных отделах мозга в постреанимационном периоде, по-видимому, связано не только с их непосредственным транзмиттерным эффектом на стимулирование биосинтеза и мобилизацию нейромедиаторов, в том числе и гистамина, но и с механизмами генерации cAMP и cGMP и других нуклеотидов в качестве внутриклеточных и внеклеточных вторичных мессенджеров сигналов информации посредством индукции активности специфических циклаз и ингибирования активности фосфодиэстераз, деятельности которых модулируется соответственно катехоламин-, холин-, серотонин-, гистаминергическими и другими нейромедиаторами, их агонистами и антагонистами [23—25].

DISTRIBUTION OF HISTAMINE AND DIAMINO-OXIDASE IN DIFFERENT BRAIN REGIONS IN TERMINAL CONDITION, DURING REABILITATION AND EFFECT OF PHYSIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS

KHACHATRYAN G. S., VARTANYAN G. G.

Armenian Department of All-Union Research Institute of Hygiene and
Toxicology of Pesticides, Polymers and Plastic Compounds, Yerevan

Distribution of histamine and diaminoxidase in brain different areas has been studied in experimental clinical death and rehabilitation conditions. Massive bloodletting results in a decrease of histamine content in frontal lobe and hypothalamus with its concomitant increase in truncus cerebri and parietotemporal lobe. In clinical death the amount of histamine decreased drastically in frontal, parietotemporal and occipital lobes and hypothalamus, but increased in truncus cerebri. In postre-animation period the amount of histamine comes to its normal level in 80 min. Massive bloodletting leads to increase in diaminoxidase activity in brain; in clinical death the activity of enzyme drops about 2-fold and comes to its initial level in 80 min—in all cases correlating with the level of histamine in brain. Injection of adenosine and guanosine accelerates the normalization rate.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Schwartz J. C., Pollard H., Quach T. T. J. *Neurochem.*, v. 35, № 1, p. 26—33, 1980.
2. Ferrer I., Pícatoste F., Rodérgas E., García A., Sapria J., Blanco I. J. *Neurochem.*, v. 32, № 2, p. 587—592, 1979.
3. Philippu A., Hanesch U., Hagen R., Robinson R. L. *Arch. Pharmacol.*, v. 321, p. 282—286, 1982.
4. Хачатрян Г. С., Степанян Л. А., Аветисян Н. Г. *Вопр. биохимии мозга*, Ереван, Изд-во АН АрмССР, т. 8, с. 221—237, 1973.
5. Хачатрян Г. С., Казарян К. А. *Журн. эксперим. и клин. мед.*, т. 20, № 5, с. 169—174, 1980.
6. Хачатрян Г. С., Бакунц Г. Г. *Биол. журн. Армении*, № 1, с. 5—11, 1984.
7. Неговский В. А. *Оживление организма и искусственная гипотермия*, Москва, 1960.
8. Левин Ю. М., Березовская Е. М., Дьякова А. М., Маруев Д. С., Никитина Р. Г., Подгорный В. Ф., Словиков Б. Н.—В кн.: *Восстановительный период после оживления организма. Патфизиология в эксперименте и клинике*, с. 68. Москва, 1968.
9. Shore P. A.—In: *Methods in Enzymology*, v. 17, part B, p. 812—845, 1971.
10. Cohn V. H., Shore P. A. *Federal. Proc.*, v. 20, p. 286, 1961.
11. Martres M. P., Baudry M., Schwartz J. C. *Brain Res.*, v. 83, p. 261—275, 1975.
12. Hill S. J., Emson P. C., Young J. M. J. *Neurochem.*, v. 31, p. 997—1004, 1978.
13. Green L. P.—In: *Handb. Psychopharmacol.* (eds. Iversen L. L., Iversen S. D., Snyder S. H.), v. 17, p. 385—420, Plenum, New York, 1983.
14. Хачатрян Г. С., Казарян К. А. *Журн. эксперим. и клин. мед.*, т. 18, № 5, с. 20—29, 1973.
15. Хачатрян Г. С., Азгалдян Н. Р. *Биол. журн. Армении*, т. 23, № 7, с. 3—11, 1970.

16. Winn H., Richard R. R., Berne R. M. Amer. J. Physiol., v. 241, № 2, p. 235—242, 1981.
17. Lin M. R., Henteloff H. B., Nemoto E. M. J. Neurochem., v. 40, № 2, p. 595—598, 1983.
18. Daly J.—In: Physiological and regulatory functions of adenosine and adenine nucleotides (eds. Baer H. P., Drummond G. I.), p. 229—241, Raven Press, New York, 1979.
19. Nimit Y., Scolnick P., Daly J. J. Neurochem., v. 36, № 3, p. 908—912, 1981.
20. Kobayashi K., Kuroda Y., Yoshioka M. J. Neurochem., v. 36, № 2, p. 651—660, 1981.
21. Foreman J., Jordan C. Agents and Actions, v. 13, № 2—3, p. 105—116, 1983.
22. Morris G., Seidler F. J., Slotkin T. A. Life Sci., v. 32, № 4, p. 1565—1571, 1983.
23. Greengard P. Chem. Neurotransm., 75 Years (Proc. Nobel. Conf.), (eds. Stjaerne L., Lagercranz H.) p. 377—384, Henquist, Per. Academic, London, 1981.
24. Goldberg N. D., Haddox M. K. Annu. Rev. Biochem., v. 46, p. 832—896, 1977.
25. Личатрян Г. С. Биохимия нуклеиновых кислот и высшие функции головного мозга, Ереван, Айастан, 1981.

Поступила 14. III 1986

УДК 612.8.015:577.15/17.153.

УЧАСТИЕ ГАМК В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ТИРОЗИНГИДРОКСИЛАЗЫ ГИПОТАЛАМУСА КРЫСЫ

ТОВМАСЯН А. Х., *МИНЕЕВА М. Ф., КАЗАРЯН Б. А.

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР, Ереван

*Институт фармакологии АМН СССР, Москва

Установлено непосредственное взаимодействие ГАМК с тирозингидроксилазой гипоталамуса крысы, приводящее к увеличению величины V без изменения K_m для тирозина. Этот процесс представляет собой составную часть молекулярного механизма, модулирующего действия ГАМК на пресинаптическую регуляцию биосинтеза катехоламинов. Показано, что, несмотря на одинаковую физиологическую направленность эффектов взаимодействия ГАМК и антипсихотического вещества фторфеназина с тирозингидроксилазой, их молекулярные механизмы существенно отличаются.

ГАМК-ергическая и дофаминергическая нейромедиаторные системы связаны сложными функциональными отношениями. Однако молекулярные механизмы влияния ГАМК на дофаминергические процессы в мозгу изучены недостаточно [1, 2].

Ранее с использованием препаратов из синапсом стриатума крысы было экспериментально установлено, что ГАМК может оказывать непосредственное влияние на активность тирозингидроксилазы (ТГ) (КФ 1.14.16.2, α -тирозин-кислород оксидоредуктаза, 3-гидроксилирующая), лимитирующего фермента биосинтеза катехоламинов. Влияние

16. Winn H., Richard R. R., Berne R. M. Amer. J. Physiol., v. 241, № 2, p. 235—242, 1981.
17. Lin M. R., Henteloff H. B., Nemoto E. M. J. Neurochem., v. 40, № 2, p. 595—598, 1983.
18. Daly J.—In: Physiological and regulatory functions of adenosine and adenine nucleotides (eds. Baer H. P., Drummond G. I.), p. 229—241, Raven Press, New York, 1979.
19. Nimit Y., Scolnick P., Daly J. J. Neurochem., v. 36, № 3, p. 908—912, 1981.
20. Kobayashi K., Kuroda Y., Yoshioka M. J. Neurochem., v. 36, № 2, p. 651—660, 1981.
21. Foreman J., Jordan C. Agents and Actions, v. 13, № 2—3, p. 105—116, 1983.
22. Morris G., Seidler F. J., Slotkin T. A. Life Sci., v. 32, № 4, p. 1565—1571, 1983.
23. Greengard P. Chem. Neurotransm., 75 Years (Proc. Nobel. Conf.), (eds. Stjaerne L., Lagercranz H.) p. 377—384, Henquist, Per. Academic, London, 1981.
24. Goldberg N. D., Haddox M. K. Annu. Rev. Biochem., v. 46, p. 832—896, 1977.
25. Личатрян Г. С. Биохимия нуклеиновых кислот и высшие функции головного мозга, Ереван, Айастан, 1981.

Поступила 14. III 1986

УДК 612.8.015:577.15/17.153.

УЧАСТИЕ ГАМК В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ТИРОЗИНГИДРОКСИЛАЗЫ ГИПОТАЛАМУСА КРЫСЫ

ТОВМАСЯН А. Х., *МИНЕЕВА М. Ф., КАЗАРЯН Б. А.

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР, Ереван

*Институт фармакологии АМН СССР, Москва

Установлено непосредственное взаимодействие ГАМК с тирозингидроксилазой гипоталамуса крысы, приводящее к увеличению величины V без изменения K_m для тирозина. Этот процесс представляет собой составную часть молекулярного механизма, модулирующего действия ГАМК на пресинаптическую регуляцию биосинтеза катехоламинов. Показано, что, несмотря на одинаковую физиологическую направленность эффектов взаимодействия ГАМК и антипсихотического вещества фторфеназина с тирозингидроксилазой, их молекулярные механизмы существенно отличаются.

ГАМК-ергическая и дофаминергическая нейромедиаторные системы связаны сложными функциональными отношениями. Однако молекулярные механизмы влияния ГАМК на дофаминергические процессы в мозгу изучены недостаточно [1, 2].

Ранее с использованием препаратов из синапсом стриатума крысы было экспериментально установлено, что ГАМК может оказывать непосредственное влияние на активность тирозингидроксилазы (ТГ) (КФ 1.14.16.2, α -тирозин-кислород оксидоредуктаза, 3-гидроксилирующая), лимитирующего фермента биосинтеза катехоламинов. Влияние

ГАМК на ТГ выражалось в увеличении величины V и имело по отношению к тирозину неконкурентный характер [3]. Однако оставалось невыясненным, специфично ли взаимодействие с ГАМК для ТГ из стриатума, типичной дофаминергической структуры, или аналогичное взаимодействие может быть также присуще ТГ из норадренергических нейронов.

С целью выяснения возможности непосредственного взаимодействия ГАМК с ТГ из норадренергических нейронов были поставлены эксперименты с использованием ТГ из синапсом гипоталамуса, который является преимущественно норадренергической структурой мозга, хотя норадренергические терминалы в гипоталамусе имеют пресинаптические дофаминовые рецепторы [4]. В гипоталамусе ГАМК содержится в более высокой концентрации, сопоставимой с ее содержанием в черной субстанции и бледном шаре, входящем в состав стриатума [5]. Для изучения возможности взаимодействия ГАМК с ТГ в условиях, моделирующих физиологические, были поставлены эксперименты на синапсомах, которые широко используют в качестве модели функционирующих нервных окончаний [6]. Для сравнения был взят фторфеназин, обладающий свойствами антагониста дофаминовых рецепторов и аллостерического регулятора ТГ [7, 8], поскольку физиологически влияние этих веществ на дофаминергические процессы в мозгу имеет во многих аспектах одинаковую направленность: ГАМК оказывает тормозящее влияние на дофаминергические процессы в мозгу, пусковой же механизм действия нейролептиков, к которым относится фторфеназин, также связан с их угнетающим влиянием на эти процессы [7, 9].

Материалы и методы

Крыс деканитировали, мозг извлекали на холоду, отделяли гипоталамус и выделяли из него мембраносвязанную и растворимую ТГ по методу Kuczenski, Mandell [10].

Из гипоталамуса также выделяли синапсомы по методу Hajos [11], которые в дальнейшем использовали как для проведения экспериментов по изучению регуляции ТГ опосредовано через пресинаптическую мембрану по методике, описанной ранее [12], так и для очистки фермента путем биоспецифической хроматографии на дийод-тирозил-сефарозе 4В [15]. Скорость реакции определяли спектрофотометрически [13], теплоту реакции — по термодинамическому методу [14], белок — по методу Lowry и соавт. [16], K_m и V рассчитывали по методу Коринши-Бойдена [17].

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены результаты экспериментов по изучению непосредственного влияния ГАМК на мембраносвязанную ТГ из гипоталамуса крысы. Показано, что ГАМК в концентрации 10^{-5} М увеличивает скорость ТГазной реакции в широком диапазоне концентраций тирозина ($p < 0.01$), не вызывая качественных изменений в характере кривой зависимости скорости от концентрации субстрата и не влияя на субстратное торможение фермента. Таким образом, эффект ГАМК на

ТГ гипоталамуса оказался сходным с влиянием ГАМК на ТГ стриатума [3]. Однако изучение действия ГАМК на растворимую фракцию ТГ гипоталамуса показало, что, в отличие от стриатума, активность фермента остается неизменной, в связи с чем мы нашли целесообразным эти данные не приводить в статье.

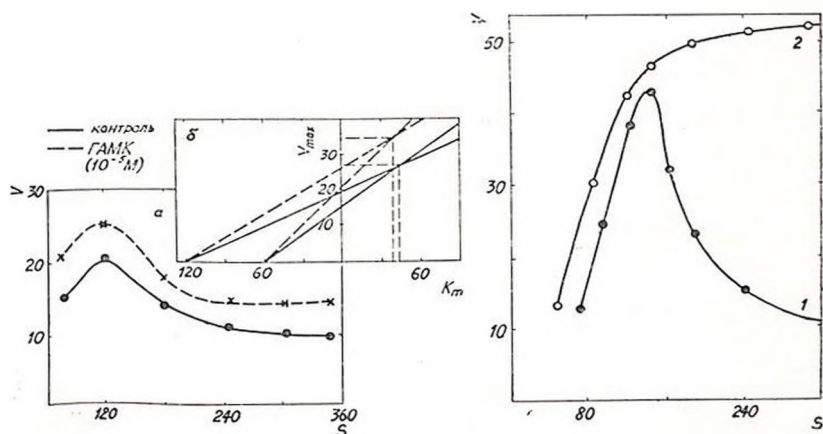


Рис. 1. Влияние ГАМК на активность тирозингидроксилазы гипоталамуса крысы при различных концентрациях тирозина (а) и зависимость скорости тирозингидроксилазной реакции от концентрации тирозина в присутствии ГАМК в координатах Корнис-Боудена (б)

Рис. 2. Влияние фторфеназина на активность тирозингидроксилазы (V, нМ/мин/мг белка) гипоталамуса крысы в присутствии различных концентраций тирозина (S, мкМ; n=5); 1—контроль; 2—фторфеназин 10⁻⁵ M

Из рис. 2 видно, что фторфеназин в концентрации 10⁻⁵ M, в отличие от ГАМК, изменяет характер зависимости скорости ТГ-реакции от концентрации тирозина в гипоталамусе. Фторфеназин элиминирует субстратное торможение ТГ: зависимость скорости реакции от концентрации тирозина в присутствии фторфеназина характеризуется гиперболической кривой вместо колоколообразной, описывающей зависимость скорости реакции от концентрации тирозина для ТГ в контрольных опытах. Сравнивая рис. 1 и 2, можно заметить, что в присутствии ГАМК и особенно фторфеназина наблюдается высокая скорость ТГ-реакции при ингибирующих концентрациях тирозина. Однако в молекулярном механизме влияния ГАМК и фторфеназина на ТГ имеются существенные различия, которые находят отражение в том, что ГАМК не влияет на субстратное торможение фермента, а фторфеназин устраняет его, иными словами, при взаимодействии с фторфеназином фермент утрачивает свойство ингибироваться избытком субстрата.

Различие в механизмах эффектов ГАМК и фторфеназина на ТГ позволяет предположить, что эти вещества взаимодействуют с разными

участками молекулы фермента. Для выяснения этого вопроса были поставлены эксперименты по измерению теплового эффекта взаимодействия очищенной ТГ с тирозином и фторфеназином (таблица). Проведенные исследования показали, что растворение фермента в концентрации 10^{-7} М в 0,05 М K^+ -фосфатном буфере, pH 6,0 сопровождается выделением тепла, составляющим 13,3 мДж. При добавлении тиро-

Таблица

Влияние фторфеназина и ГАМК на тепловой эффект взаимодействия очищенной ТГ и тирозина

Условия опыта	Тепловой эффект взаимодействия
Тирозин	+32,5 мДж
ГАМК	-39,5 мДж
Тирозин+ГАМК	-7,57 мДж
Фторфеназин	+15,1 мДж
Тирозин+фторфеназин	+15,8 мДж

Примечание. Тепловые эффекты указаны с поправкой на тепловой эффект растворения фермента. Поглощение тепла обозначено знаком (+), выделение тепла—знаком (-), $n=10$.

зина в пробу концентрации 10^{-4} М происходит поглощение 20,2 мДж тепла. Взаимодействие ТГ с тирозином в концентрации 10^{-4} М сопровождается поглощением 32,5 мДж тепла. Введение в среду с ферментом фторфеназина (10^{-5} М) вызывает эндотермический эффект, составляющий 2,8 мДж, что соответствует тепловому эффекту взаимодействия фторфеназина с ТГ, равному +15,1 мДж. При добавлении фторфеназина в той же концентрации к ферменту после внесения в пробу тирозина в ингибирующей концентрации 10^{-4} М общий эффект взаимодействия равен +16,8 мДж, что близко к величине взаимодействия фторфеназина с ферментом в отсутствие тирозина. Как видно из этих данных, тепловые эффекты взаимодействия тирозина и фторфеназина не суммируются. В совокупности с данными об устранении субстратного торможения полученные данные о теплоте взаимодействия фторфеназина с комплексом фермент—тирозин показывают, что взаимодействие ТГ с фторфеназином может происходить в присутствии тирозина в ингибирующей концентрации, создавая препятствия для взаимодействия тирозина с ТГ в регуляторном участке молекулы фермента, как это предполагалось ранее [7].

В то же время взаимодействие ГАМК с ТГ в отличие от фторфеназина сопровождается выделением тепла, равного 39,5 мДж. Общий тепловой эффект взаимодействия тирозина (10^{-4} М) и ГАМК (10^{-5} М) с ТГ равен 7,57 мДж. Тепловой же эффект взаимодействия тирозина с ферментом, равный разности величин тепловых эффектов взаимодействия ТГ с тирозином в присутствии и в отсутствие ГАМК, составляет +31,9 мДж, что хорошо согласуется с величиной +32,5 мДж, полученной нами в другой пробе для эффекта взаимодействия тирозина с ТГ в отсутствие других добавок. Тепловые эффекты взаимодействия ГАМК и тирозина аддитивны, в отличие от эффекта совместного кон-

такта фторфеназина и тирозина с ТГ. Эти результаты подтверждают предположение, что ГАМК и фторфеназин взаимодействуют с разными участками молекулы ТГ.

Для оценки роли эффекта непосредственного взаимодействия ГАМК с ТГ в механизме влияния ГАМК на катехоламинергические процессы в мозгу были поставлены эксперименты на синапсосомах. Суспензию синапсосом из гипоталамуса крысы делили на четыре части и инкубировали одновременно в термостате Варбурга при постоянном встряхивании в течение 15 мин пробы следующего состава: контроль (без добавок), в присутствии 10^{-5} М ГАМК или 10^{-5} М дофамина, с добавлением одновременно ГАМК и дофамина. Результаты экспериментов представлены на рис. 3, где показана зависимость скорости ТГазной реакции от концентрации тирозина мембраносвязанной ТГ (ввиду того, что активность растворимой ТГ не изменялась под действием ГАМК, данные не приводятся). Проба, инкубированная с дофамином, характеризуется уменьшением K_m (6 мкМ) и увеличением V (40 ммоль/мин/мг белка), рассчитанных для восходящей ветви кривой по сравнению с аналогичной кривой для контрольной пробы и сохранением субстратного торможения ТГ. Эти результаты совпадают с ранее полученными данными об уменьшении K_m для тирозина при взаимодействии дофамина с синапсосомной мембраной. Для мембраносвязанного фермента, выделенного из синапсосом, при инкубации с ГАМК, в отличие от фермента из контрольной пробы, наблюдается увеличение V (93 ммоль/мин/мг белка) с небольшим уменьшением K_m (27 мкМ) для тирозина (рис. 3). Сравнение данных, приведенных на рис. 1 и 3, дает основание полагать, что влияние ГАМК на ТГ синапсосом обусловлено непосредственным действием на фермент и может иметь место в физиологических условиях. Вместе с тем, следует отметить хотя и небольшое, но заметное уменьшение K_m при контакте ГАМК с синапсосомной мембраной в отсутствие дофамина, которое может быть отражением слабого деполаризующего действия ГАМК, описанного для срезов стриатума [18] и клеток периферических ганглиев и их аксонов [19]. Однако на синапсосомах из прилежащего ядра деполаризующее действие ГАМК не выявлялось, о чем судили по отсутствию влияния ГАМК на спонтанное высвобождение дофамина в этой структуре мозга [20]. Предположение о возможности непосредственного взаимодействия ГАМК с ТГ при добавлении ГАМК в среду инкубации синапсосом правомерно, так как ГАМК может транспортироваться внутрь синапсосом [21]. При совместном добавлении в среду инкубации синапсосом дофамина и ГАМК (рис. 3) обнаруживается эффект ГАМК, сходный с таковым в отсутствие дофамина. Вместе с тем, характер кривой 4 указывает на суммирование кривых 1 и 2, что позволяет предположить, что ГАМК не полностью препятствует изменениям кинетических свойств ТГ, которые происходят при воздействии дофамина на наружную мембрану синапсосом. Однако благодаря повышению величины V при этом сохраняется вы-

сокая скорость реакции в условиях, при которых ТГ из пробы синап-
тосом, контактировавших с дофамином, ингибирована.

Эксперименты с фторфеназином на синаптосомах были поставле-
ны аналогично исследованиям, проведенным с ГАМК. Из данных,
представленных на рис. 4, видно, что при совместном добавлении в
среду инкубации дофамина и фторфеназина не наблюдается измене-
ний кинетики ТГазной реакции, которые четко проявляются при воз-
действии дофамина на синаптосомную мембрану. Таким образом, до-
бавление фторфеназина к синаптосомам препятствует регуляторному

	контроль	дофамин	ГАМК	ГАМК + дофамин
K_m , мкМ	30	6	27	9
V_{max} , нмоль/мин/мг белка	30	40	93	58

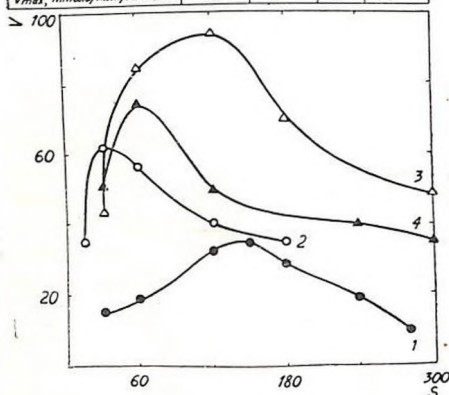


Рис. 3. Влияние ГАМК и дофамина на активность тирозингидроксилазы (V , нМ/мин/мг белка) из синапсом гипоталамуса крысы при различных концентрациях тирозина (S , мкМ; $n=6$); 1—контроль; 2—дофамин; 3—ГАМК; 4—ГАМК + дофамин

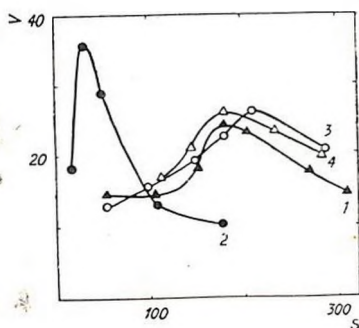


Рис. 4. Влияние фторфеназина и дофамина на активность тирозингидроксилазы (V , нМ/мин/мг белка) из синапсом гипоталамуса крысы при различных концентрациях тирозина (S , мкМ; $n=5$); 1—контроль; 2—дофамин; 3—фторфеназин + дофамин; 4—фторфеназин

воздействию пресинаптической мембраны (пресинаптических рецепто-
ров), активированной природным агонистом дофамином на скорость
ТГазной реакции. Однако антагонизм с дофамином проявляется, по
всей вероятности, не только на уровне пресинаптической мембраны,
но и на уровне ТГ, так, при сравнении характера кривых 4 (рис. 4) и
2 (рис. 2) можно заметить собственный эффект фторфеназина. Таким
образом, полученные результаты показывают, что представитель фар-
макологического класса нейролептиков фторфеназин блокирует пре-
синаптическое действие дофамина на ТГ двумя путями: опосредован-
но через пресинаптическую мембрану и путем непосредственного вза-
имодействия с ТГ. Сравнение результатов, представленных на рис. 3 и
4, показывает, что хотя функционально эффекты взаимодействия

ГАМК и фторфеназин с синаптической мембраной однонаправлены, они существенно различаются по молекулярным механизмам.

Приведенный экспериментальный материал позволяет предположить, что ГАМК, оказывая непосредственное влияние на ТГ, может нарушать осуществляемую дофамином пресинаптическую регуляцию активности этого фермента, выполняющего лимитирующую функцию в биосинтезе катехоламинов.

INVOLVEMENT OF GABA IN THE REGULATION OF TYROSINE HYDROXYLASE ACTIVITY IN RAT HYPOTHALAMUS

TOVMASYAN H. Kh., *MINEEVA M. F., KAZARYAN B. A.

Institute of Experimental Biology, Armenian Academy of Sciences, Yerevan

*Institute of Pharmacology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

A direct interaction of GABA with tyrosine hydroxylase (TH) in rat hypothalamus has been established, that results in elevation of maximal reaction rate without a change in K_m for tyrosine. Studies on hypothalamic synaptosomes showed that direct interaction between GABA and TH is the part of molecular mechanism, which modulates action of GABA on presynaptic regulation of catecholamine biosynthesis. Comparative studies indicate that an antipsychotropic drug, fluorophenazine, and GABA interact with TH by different molecular mechanisms.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Scheel-Krüger J., Mageland G., Ollanos M.—In: Amino Acid Neurotransmitters, Adv. Biochem. Psychopharmacol. (eds. T. V. D. Feudis, P. Mandel), v. 29, p. 23—26, Raven Press, New York, 1981.
2. Hutchins D. A., Rayevskiy K. S., Sharman D. F. Brit. J. Pharmacol., v. 46, p. 409—415, 1972.
3. Касабян А. Х., Минеева М. Ф., Раевский К. С., Казарян Б. А. Биол. журн. Армении, т. 34, с. 1251—1253, 1981.
4. Dibokovich M. L., Langer S. L. J. Physiol. (Gr. Brit.), v. 251, p. 737—762, 1975.
5. Fahn S.—In: GABA in Nervous System Function (eds. E. Roberts, T. N. Chase, D. B. Tower), p. 170—186, Raven Press, New York, 1976.
6. De Belleruche J. S., Bradford H. F., Jones D. A. J. Neurochem., v. 26, p. 561—571, 1976.
7. Минеева М. Ф.—В сб.: Нейрохимические основы психотропного эффекта (под ред. А. А. Вальдмана), с. 53—66, М., Изд. ВНИИТИ, 1982.
8. Минеева М. Ф., Раевский К. С.—Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 98, № 10, с. 453—455, 1981.
9. Pycock G. J., Horton R. W. J. Neural. Transm., v. 45, p. 17—33, 1979.
10. Kuczenski R. T., Mandell A. J. J. Biol. Chem., v. 247, p. 3114—3121, 1972.
11. Hajos T. Brain Res., v. 93, p. 485—489, 1975.
12. Минеева М. Ф., Тюмлер Д., Кузнецова Е. А., Васильев А. Е., Раевский К. С. Докл. АН СССР, т. 258, с. 501—504, 1981.
13. Минеева-Вялых М. Ф. Вopr. мед. химии, т. 22, с. 274—279, 1976.
14. Кальве Э., Прат А. Микрокалориметрия. М., Изд. Ин. лит., 1963.

15. *Shlman R., Akino N., Kaufman S.* J. Biol. Chem., v. 246, p. 1330—1334, 1971.
16. *Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randal R. J.* J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
17. *Корниш-Бовден Э.* Основы ферментативной кинетики, М., Мир, 1979.
18. *Krnjevic K.*—In: GABA in Nervous System Function (eds. E. Roberts, T. N. Chase, D. B. Tower), p. 269—281, Raven Press, New York, 1976.
19. *Obata K.*—In: GABA in Nervous System Function (eds. E. Roberts, T. N. Chase, D. B. Tower), p. 283—286, Raven Press, New York, 1976.
20. *Ковалев Г. Н., Хетев Л.* Нейрохимия, т. 2, с. 315—318, 1983.
21. *Pastuszko A., Willson D. F., Eresinsca M.* J. Biol. Chem., v. 257, p. 7514—7520, 1982.

Поступила 28. XII 1985

УДК 577.159

СУБСТРАТНО-ИНГИБИТОРНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ НЕРВНОЙ ТКАНИ КОМАНДОРСКОГО КАЛЬМАРА

БРЕСТКИН А. П., КОВАЛЕВ И. Н., РОЗЕНГАРТ Е. В.,
ХОВАНСКИХ А. Е., ФЕДОРЕЦ Ю. А., ЭПШТЕИН Л. М.

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

Изучена субстратная и ингибиторная специфичность холинэстеразы (ХЭ) зрительных ганглиев командорского кальмара (*Berytheutis magister*). С помощью набора специфических тioxолиновых субстратов и фосфорорганических ингибиторов (ФОИ) показано, что холинэстеразная активность обусловлена действием одного фермента. Отмечено, что ХЭ командорского кальмара по чувствительности к некоторым гидрофобным ФОИ отличается от ХЭ тихоокеанского (*Todarodes pacificus*), что подтверждает представления о видоспецифичности ХЭ кальмаров. Впервые изучено действие на ХЭ командорского кальмара ФОИ, содержащих ацетиленовую группировку. Величина «ацетиленового эффекта» существенно зависела от структуры ФОИ.

Как отмечалось ранее [1, 2], у кальмаров свойства ХЭ существенно зависят от их видовой принадлежности и условий обитания. В этой связи свойства ХЭ командорского кальмара, которые до сих пор практически не изучены, представляют особый интерес. В отличие от других видов дальневосточных кальмаров командорский кальмар имеет наиболее высокоширотный ареал обитания. Весь его жизненный цикл проходит при средней температуре воды 2—4°. Он ведет придонный образ жизни и значительно менее подвижен, чем пелагические виды, такие как тихоокеанский кальмар или кальмар Бартрама. Можно предположить, что эти особенности биологии вида должны сказаться на функционировании ЦС, а значит и на свойствах ХЭ нервной ткани.

В настоящей работе приведены свидетельства в пользу того, что холинэстеразная активность в зрительных ганглиях командорского

кальмара обусловлена действием одного фермента, получены данные о его субстратной специфичности и о взаимодействии этого фермента с различными по структуре ФОИ. В связи с тем, что среди дальневосточных кальмаров, обитающих в северной акватории Тихого океана, наиболее изучены свойства ХЭ зрительных ганглиев тихоокеанского кальмара [3], проведено сопоставление характеристик ХЭ нервной ткани командорского и тихоокеанского кальмаров.

Материалы и методы

Зрительные ганглии командорского кальмара извлекали из особей обоего пола III—IV стадии зрелости, выловленных в районе Северо-Курильских островов. В качестве ферментного препарата ХЭ использовали центрифугат (5000 об/мин) водного гомогената (3 мг/мл) ткани предварительно замороженных зрительных ганглиев. Активность ХЭ определяли колориметрическим методом Ellman и соавт. [4] (рН 7,5; 25°). В качестве субстратов использовали ацетилтихохолинбромид (АТХ), пропионилтихолинбромид (ПрТХ) и бутирилтихолинбромид (БуТХ) фирмы «Chemapol» (ЧССР). Изучены ФОИ, синтезированные в Институте элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова АН СССР [5].

Результаты и обсуждение

Идентификация ХЭ. Известно, что мозг млекопитающих содержит две ХЭ. Нервная ткань некоторых видов кальмаров по содержанию ХЭ также оказалась гетерогенной [6, 7], поэтому необходимо было ответить на вопрос, ответствен ли за холинэстеразную активность нервной ткани командорского кальмара один фермент или здесь присутствует смесь ХЭ? Одним из надежных способов такой проверки является субстратно-ингибиторный метод [8]. В опытах были использованы четыре ФОИ, существенно отличающиеся друг от друга по строению (табл. 1) и обладающие различной избирательностью ингибирую-

Таблица 1

Исследование однородности холинэстеразной активности в ткани зрительных ганглиев командорского кальмара с использованием специфических субстратов и фосфорорганических ингибиторов (K_{II} , $M^{-1} \text{ мин}^{-1}$; 25°; рН 7,5)

N соединения	Ингибиторы	С у б с т р а т ы		
		ацетилтихо- лин	пропионилтихо- лин	бутирилтихо- лин
I	$((CH_3)_2CHO)_2P(O)F$	$(1,1 \pm 0,1) \cdot 10^7$	$(8,0 \pm 0,2) \cdot 10^6$	$(9,5 \pm 0,2) \cdot 10^6$
II	$C_2H_5O(CH_3)P(O)SC_2H_4SCH_3C_2H_5$	$(1,6 \pm 0,1) \cdot 10^7$	$(1,1 \pm 0,1) \cdot 10^7$	$(1,3 \pm 0,1) \cdot 10^7$
III	$(C_2H_5O)_2P(O)SC \equiv C - C_4H_9$	$(7,0 \pm 0,1) \cdot 10^6$	$(5,5 \pm 0,2) \cdot 10^6$	$(5,6 \pm 0,1) \cdot 10^6$
IV	$(C_2H_5O)_2P(O)SC_6H_{13}$	$(1,5 \pm 0,1) \cdot 10^3$	$(1,5 \pm 0,2) \cdot 10^3$	$(1,1 \pm 0,1) \cdot 10^3$

щего действия на холинэстеразы, и три субстрата: АТХ, с наибольшей скоростью гидролизующийся под действием АХЭ, ПрТХ и БуТХ, являющийся специфическим субстратом бутирилхолинэстеразы (БХЭ). Как видно из табл. 1, величины K_{II} для каждого из ФОИ практически

не зависели от природы субстрата. Следовательно, можно заключить, что холинэстеразная активность нервной ткани командорского кальмара обусловлена одним ферментом, т. к. невозможно, чтобы два фермента обладали одинаковой субстратной специфичностью и чувствительностью к столь различным по структуре ФОИ. Исследователи свойств ХЭ зрительных ганглиев тихоокеанского кальмара также пришли к выводу об однородности ферментативной активности у этого вида [3].

Субстратная специфичность. В табл. 2 представлены кинетические параметры гидролиза тирохолиновых эфиров по действию ХЭ коман-

Таблица 2

Субстратная специфичность холинэстераз командорского и тихоокеанского кальмаров

Кальмары	Субстраты	П а р а м е т р ы		
		$V_{max}, M \cdot c^{-1} M^{-1}$	$V_{отн}, \%$	K_m, M
Командорский	Ацетилтихолин	$(1,6 \pm 0,2) \cdot 10^{-8}$	100	$(3,8 \pm 0,5) \cdot 10^{-4}$
	Пропионилтихолин	$(1,6 \pm 0,1) \cdot 10^{-8}$	100	$(2,8 \pm 0,8) \cdot 10^{-4}$
	Бутирилтихолин	$(1,3 \pm 0,1) \cdot 10^{-8}$	75	$(1,6 \pm 0,4) \cdot 10^{-4}$
Тихоокеанский	Ацетилтихолин	$2,2 \cdot 10^{-8}$	100	$6,6 \cdot 10^{-5}$
	Пропионилтихолин	$2,1 \cdot 10^{-8}$	95	$6,4 \cdot 10^{-5}$
	Бутирилтихолин	$1,1 \cdot 10^{-8}$	50	$8,2 \cdot 10^{-5}$

дорского и тихоокеанского [9] кальмаров. В случае обоих ХЭ скорость гидролиза АТХ и ПрТХ была одинаковой, а гидролиз БуТХ под действием ХЭ тихоокеанского кальмара протекал с меньшей скоростью. В этом проявилось своеобразие свойств ХЭ обоих кальмаров по сравнению с типичной АХЭ ($V_{АТХ} > V_{ПрТХ}$; $V_{БуТХ} = 0$) и БХЭ ($V_{БуТХ} > V_{ПрТХ} > V_{АТХ}$) [10]. Величины K_m у ХЭ командорского кальмара оказались несколько выше, чем у ХЭ тихоокеанского кальмара.

Сравнительное исследование антихолинэстеразной эффективности ФОИ различной структуры. В табл. 3 сопоставлена чувствительность к группе ФОИ у ХЭ двух видов кальмаров и двух «реперных» ХЭ — АХЭ эритроцитов человека и БХЭ сыворотки крови лошади. Динизопропифторфосфат (соединение I), будучи специфическим ингибитором БХЭ, оказался практически столь же эффективным ингибитором ХЭ обоих видов кальмаров. Сульфониевый ФОИ (соединение II), специфический ингибитор АХЭ, несколько сильнее тормозил ХЭ тихоокеанского кальмара, чем командорского, причем по своей чувствительности ХЭ кальмаров занимали промежуточное положение между АХЭ и БХЭ. Сульфидный аналог (соединение V) оказался в 110—160 раз слабее сульфониевого (соединение II). Это различие в случае АХЭ и БХЭ составляет, соответственно, 3300 и 700 раз и объясняется не только большей подвижностью сложноэфирной связи у соединения II (константы щелочного гидролиза у соединения V ниже, чем у соедине-

ния II более, чем на 2 порядка [8]), что повышает фосфорилирующую способность ФОИ, но и взаимодействием сульфоневой группировки с анионным участком каталитического центра ХЭ. Соединения V ингибировало ХЭ кальмаров в 5—50 раз сильнее, чем «реперные» АХЭ и БХЭ. Ранее отмечалась необычно высокая чувствительность ХЭ тихоокеанского кальмара к ФОИ с 3,3-диметилбутильным радикалом в отщепляемой части (соединения VI и VIII) [11]. По отношению к ХЭ

Таблица 3

Антихолинэстеразная эффективность некоторых фосфорорганических ингибиторов (k_{II} , $M^{-1} \text{ мин}^{-1}$; 25°; pH 7,5; субстрат—ацетилтихолинбромид)

N соединения	Ингибитор	Источники холинэстеразы			
		зрительные ганглии кальмаров		сыворотка крови лошади	эритроциты человека
		командорский	тихоокеанский	бутирилхолинэстераза	АХЭ
I	$((CH_3)_2CHO)_2P(O)F$	$(1,1 \pm 0,1) \cdot 10^7$	$6,9 \cdot 10^6$ [12]	$1,5 \cdot 10^7$ [13]	$9,5 \cdot 10^4$ [13]
II	$C_2H_5O(CH_3)P(O)SC_2H_4SCH_3C_2H_5$	$(1,6 \pm 0,1) \cdot 10^7$	$4,3 \cdot 10^7$ [12]	$3,7 \cdot 10^6$ [8]	$1,3 \cdot 10^8$ [8]
V	$C_2H_5O(CH_3)P(O)SC_2H_4SC_2H_5$	$(1,4 \pm 0,1) \cdot 10^5$	$2,8 \cdot 10^5$ [3]	$5,2 \cdot 10^3$ [3]	$4,0 \cdot 10^4$ [3]
VI	$C_2H_5O(CH_3)P(O)SC_2H_4C(CH_3)_3$	$(6,3 \pm 0,2) \cdot 10^5$	$2,6 \cdot 10^6$ [11]	$4,7 \cdot 10^3$ [3]	$1,6 \cdot 10^3$ [11]
	$C_2H_5O(CH_3)P(O)SC_6H_{13}$	$(7,0 \pm 0,1) \cdot 10^3$	$2,4 \cdot 10^5$ [11]	$3,8 \cdot 10^4$ [3]	$1,6 \cdot 10^4$ [3]
VIII	$(C_2H_5O)_2P(O)SC_2H_4C(CH_3)_3$	$(1,7 \pm 0,1) \cdot 10^4$	$1,6 \cdot 10^5$ [3]	$3,5 \cdot 10^3$ [14]	$8,0 \cdot 10^2$ [14]
IV	$(C_2H_5O)_2P(O)SC_6H_{13}$	$(1,5 \pm 0,1) \cdot 10^3$	$8,4 \cdot 10^3$ [3]	$3,3 \cdot 10^4$ [5]	$3,8 \cdot 10^3$ [5]

командорского кальмара эффективность этих ФОИ была в 4—9 раз ниже, однако она оставалась более высокой по сравнению с «реперными» ХЭ. Еще одно различие между ХЭ командорского и тихоокеанского кальмаров выявилось при сравнении ингибирующего действия соединения VI и его изомера нормального строения соединения VII: в первом случае снижение было 90-кратным, а во втором—10-кратным. У производных диэтоксифосфорной кислоты (соединения VIII и IV) столь существенных различий между ХЭ кальмаров не наблюдалось. В целом чувствительность к гидрофобным ФОИ (соединения IV—VIII) у ХЭ командорского кальмара была ниже, чем у ХЭ тихоокеанского кальмара.

Изучение ацетиленовых ФОИ и их аналогов. В табл. 4 представлены данные исследования чувствительности ХЭ командорского кальмара к группе ацетиленовых и соответствующих им насыщенных ФОИ. Эти соединения, весьма сильные ингибиторы различных ХЭ [5], срав-

ниваются между собой по величине «ацетиленового эффекта» — отношению величин k_{II} ацетиленового ФОИ и его насыщенного аналога. В первой подгруппе изученных ФОИ (соединения IX—XIV) прослеживается влияние на антиферментное действие эффекта «отодвигания» ацетиленовой группировки от сложнэфирной связи. Во-первых, сама величина «ацетиленового эффекта» у ХЭ кальмара значительно ниже, чем у АХЭ и БХЭ: так, в случае соединения IX и X «эффект» был ниже соответственно в 340 и 900 раз. Во-вторых, введение ацетиленовой группировки в γ -положение (соединения XIII и XIV) приводит к тому, что в случае ХЭ кальмара насыщенное соединение (XIV) эффективнее ацетиленового ФОИ (соединения XIII), в то время как

Таблица 4

Антихолинэстеразная эффективность ацетиленовых ФОИ и их насыщенных аналогов общей формулы $(C_2H_5O)_2P(0)S-R$
(k_{II} , $M^{-1} \text{ мин}^{-1}$; 25°; pH 7,5; субстрат—ацетилтихолинбромид)

N соединения	R	ХЭ командорско-го кальмара	АХЭ [5]	Бтирихолинэстераза [5]
IX	$-C \equiv CH$	$(1,6 \pm 0,1) \cdot 10^5$	$2,3 \cdot 10^1$	$5,6 \cdot 10^7$
X	$-C_2H_5$	$(6,7 \pm 0,4) \cdot 10^2$ (240)	$2,7 \cdot 10^3$ (82000)	$2,7 \cdot 10^2$ (210000)
XI	$-CH_2-C \equiv CH$	$(2,5 \pm 0,1) \cdot 10^3$	$2,2 \cdot 10^5$	$4,0 \cdot 10^5$
XII	$-C_3H_7$	$(3,3 \pm 0,2) \cdot 10^2$ (8)	$7,0 \cdot 10^1$ (3200)	$7,0 \cdot 10^2$ (570)
XIII	$-CH_2CH_2-C \equiv CH$	$(4,7 \pm 0,1) \cdot 10^3$	$4,0 \cdot 10^3$	$2,4 \cdot 10^1$
XIV	$-C_4H_9$	$(1,6 \pm 0,1) \cdot 10^1$ (0,3)	$6,4 \cdot 10^2$ (6)	$4,9 \cdot 10^3$ (5)
III	$-C \equiv C-C_4H_9$	$(7,0 \pm 0,1) \cdot 10^6$	$9,5 \cdot 10^6$	$1,0 \cdot 10^8$
IV	$-C_6H_{13}$	$(1,5 \pm 0,1) \cdot 10^3$ (4700)	$3,8 \cdot 10^3$ (2500)	$3,3 \cdot 10^1$ (3000)
XV	$-CH_2-C \equiv C-C_3H_7$	$(1,8 \pm 0,1) \cdot 10^5$ (120)	$1,4 \cdot 10^1$ (1)	$1,0 \cdot 10^6$ (30)
XVI	$-CH_2CH_2-C \equiv C-C_2H_5$	$(1,0 \pm 0,1) \cdot 10^1$ (7)	$4,0 \cdot 10^3$ (1)	$1,2 \cdot 10^5$ (4)

Примечание. В скобках указана величина «ацетиленового эффекта».

у «реперных» ХЭ «ацетиленовый эффект» хотя и незначительный, но сохраняется. В другой подгруппе (соединения III, IV, XV, XVI), где представлены ФОИ с разным положением ацетиленовой группировки при общей длине алкила C_6 , «ацетиленовый эффект» в случае ХЭ кальмара оказался даже несколько выше, чем у «реперных» ХЭ. Сравнение трех пар соединений—III и IX, XV и XI, XVI и XIII—позволяет проанализировать влияние на антиферментное действие наличия алкильного радикала рядом с ацетиленовой группировкой. Когда ацетиленовая группировка находится в α - (соединения III и IX) и β -положении (соединения XV и XI), наличие алкильного радикала существенно повышает эффективность по отношению к ХЭ кальмара (в 45—70 раз) и очень незначительно—к БХЭ. В случае АХЭ незамещенные ацетиленовые ФОИ (соединения IX, XI) были эффективнее своих алкилсодержащих гомологов (соединения III, XV). Несхожими оказались зависимости эффективности ФОИ от длины алкильного ради-

кала (соединения X, XII, XIV, IV): в случае ХЭ кальмара более активным был бутильный гомолог (соединения XIV), а в случае «реперных» ХЭ—гексилный (соединение IV). Высокая эффективность ФОИ с тиобутильной группировкой отмечалась ранее по отношению к ХЭ тихоокеанского кальмара [11].

Исследование субстратной и ингибиторной специфичности ХЭ зрительных ганглиев командорского кальмара выявило определенные отличия от свойств ХЭ тихоокеанского кальмара, что подтверждает представления о видоспецифичности ХЭ кальмаров.

Изучение взаимодействия с группой ацетиленовых ФОИ и их аналогов выявило своеобразие свойств, а значит и особенностей структуры каталитического центра ХЭ нервной ткани командорского кальмара.

SUBSTRATE SPECIFICITY AND SUSCEPTIBILITY TO INHIBITORS OF KOMANDOR'S SQUID NERVE TISSUE CHOLINESTERASE

BRESTKIN A. P., KOVALJEV N. N., ROZENGART E. V., KHOVANSKIKH A. E.,
FEDORETZ U. A., EPSTEIN L. M.

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

For the first time the substrate specificity and susceptibility to inhibitors of cholinesterase (ChE) from optic ganglions of *Komandor* squid, *Berrytheutis* magister, have been studied. It has been shown the cholinesterase activity was due to a single enzyme. It was noted that Komandor squid ChE differs from that of Pacific squid (*Todarodes pacificus*). This points to the species specificity of cholinesterase in different kinds of squids. The action of organophosphorus inhibitors, containing acetylene group, on Komandor squid's cholinesterase was also studied for the first time and structure-dependent effect of inhibitors has been demonstrated.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Шевцова С. П., Бресткин А. П., Несис К. Н., Розенгарт Е. В. Океанология, т. 17, с. 1109—1113, 1977.
2. Шевцова С. П., Бресткин А. П., Несис К. Н., Розенгарт Е. В. Океанология, т. 19, с. 481—486, 1979.
3. Turpaev T. M., Abashkina L. I., Brestkin A. P., Brich I. L., Grigorjeva I. M., Pevzner D. L., Rozengart V. J., Rozengart E. V., Sakharov D. A. Eur. J. Biochem., v. 6, p. 55—59, 1968.
4. Ellmann G. N., Courtney R. D., Feather K. M. Biochem. Pharm., v. 7, p. 88—95, 1961.
5. Балашова Е. К., Бресткин А. П., Жуковский Ю. Г., Розенгарт В. И., Шерстобитов О. Е., Вихрева Л. А., Годовиков Н. Н., Бабашева К. К., Кабачник М. И. Докл. АН СССР, т. 272, с. 503—506, 1983.
6. Григорьева Г. М.—В кн.: Сравнительная нейрофизиология и нейрохимия (под ред. Е. М. Крепса), Л., Наука, с. 3—12, 1976.
7. Григорьева Г. М., Конычева Н. В.—В кн.: Физиология и биохимия морских и пресноводных животных (под ред. Е. М. Крепса), с. 194—204, Л., Наука, 1979.

8. Садыков А. С., Розенгарт Е. В., Абдувахобов А. А., Асланов Х. А. Холинэстеразы. Активный центр и механизм действия. Ташкент, Фан, 1976.
9. Виняр Т. Н. Взаимодействие аммониевых соединений с холинэстеразой и холинорецептором одного и того же животного, канд. дис., Л., 1985.
10. Бресткин А. П., Кабачник М. И., Розенгарт Е. В. Докл. АН СССР, с. 274, с. 960—965, 1984.
11. Розенгарт Е. В. Реакционная способность органических соединений, т. 4, с. 954—962, Тарту, 1967.
12. Шевцова С. П. Субстратно-ингибиторный анализ холинэстеразы ткани оптических ганглиев кальмаров и биохимический признак вида, канд. дис., Киев, 1983.
13. Яковлев В. А. Кишечка ферментативного катализа, М., Наука, 1965.
14. Шмелева В. Г. Исследование антихолинэстеразного действия некоторых фосфорорганических соединений, канд. дис., Л., 1967.

Поступила 15. II 1986

УДК 577.150.7—158.4:611.81

КИНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ОЧИЩЕННОЙ И МЕМБРАНОСВЯЗАННОЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ МОЗГА

ХВАТОВА Е. М., ГАРСИЯ А.

Горьковский медицинский институт им. С. М. Кирова

Разработан метод выделения митохондриальной малатдегидрогеназы (мМДГ) мозга, основанный на ИОХ на катионите «Биокарб». Изучены кинетические свойства очищенной мМДГ мозга, солюбилизированной мМДГ и фермента митохондриальной фракции мозга. Показано, что для мМДГ мозга характерны существенные различия в кинетических характеристиках прямой и обратной реакции. Установлено, что для очищенной мМДГ характерна гиперболическая зависимость начальной скорости реакции от концентрации малата и NADH. В то же время для фермента, солюбилизованного с митохондриальными мембранами, но не очищенного от других растворимых митохондриальных белков, выявлена возможность наряду с классической кинетикой Михаэлиса-Ментен проявлять положительную кооперативность по NADH. Для мМДГ митохондриальной фракции мозга характерна четко выраженная положительная кооперативность, проявляющаяся S-образной кривой насыщения фермента NADH, нелинейностью графиков в координатах Лайнуивера-Бэрка и Эди-Хофсти, а также в значениях коэффициентов pH и q .

Малатдегидрогеназа (L-малат: NAD оксидоредуктаза; КФ 1.1.1.37) представлена в клетках эукариот двумя генетически детерминированными формами—цитоплазматической и митохондриальной. К настоящему времени наиболее изучена мМДГ из сердца и печени. Исследованы их физико-химические свойства, установлены основные кинетические характеристики, определен механизм каталитического

действия. В то же время мМДГ мозга остается мало изученной, хотя участвует в наиболее активном для нервной ткани малат-аспартатном пути переноса восстановительных эквивалентов [1, 2].

Имеющиеся в литературе единичные работы по мМДГ мозга [3, 4] не дают полного представления о свойствах этого ключевого для метаболизма мозга фермента. Вместе с тем, даже эти скудные данные указывают на то, что мозговая мМДГ не идентична по своим свойствам ферменту из других тканей. Имеющиеся методики выделения фермента из ткани мозга сложны и трудоемки.

Данные литературы свидетельствуют о существенном влиянии на свойства ферментов взаимодействия с митохондриальными мембранами. Для мМДГ такие исследования проводились только на ткани печени [5—7].

Цель настоящего исследования—разработка простого и доступного метода получения очищенной мМДГ мозга и изучение кинетических характеристик мМДГ мозга в зависимости от взаимодействия с митохондриальными мембранами.

Материалы и методы

Активность малатдегидрогеназы определяли общепринятым спектрофотометрическим методом по изменению концентрации NADH. Прямую малатдегидрогеназную реакцию ($\text{Малат} + \text{NAD} \rightarrow \text{Оксалоацетат} + \text{NADH}$) исследовали в системе, предложенной Aspray и соавт. [8] в нашей модификации (не используется сеникарбазид). Концентрация малата составляла от 0,275 до 17,6 мМ. Обратную реакцию ($\text{Оксалоацетат} + \text{NADH} \rightarrow \text{Малат} + \text{NAD}$) изучали по методу Forster, Harrison [9]. Концентрация NADH варьировала от 0,0125 до 0,4 мМ. Реакцию начинали внесением фермента в реакционную среду.

Значения начальных скоростей рассчитывали математическим методом, описанным Atkins, Nimmo [10]. K_m и V реакции определяли по формулам, представленным Корниш-Бовденом [11], величину pH рассчитывали графически, коэффициент q —по Курганову [12]. Зависимость начальной реакции от концентрации субстратов выражали в прямых величинах и в координатах Эди-Хофсти и Лайнуивера-Берка. Концентрацию белка определяли по Lowry и соавт. [13] или спектрофотометрически [14]. Гомогенность препарата мМДГ проверяли электрофорезом в ПААГ по Мауреру [15], величину M_r субъединиц мМДГ определяли электрофоретически [16]. Препарат очищенной мМДГ мозга получали методом, разработанным в нашей лаборатории из митохондриальной фракции головного мозга крупного рогатого скота. Центрифугирование на центрифуге «Beckman L-5 65B» и все остальные этапы очистки проводили при 0—4°.

Ткань мозга промывали 0,15 М раствором KCl и готовили 10%-ный гомогенат на 0,25 М сахарозе (pH 7,4), который центрифугировали последовательно при 1500 и 5000g для осаждения неразрушенных клеток, ядер и клеточных мембран. Митохондриальную фракцию получали центрифугированием супернатанта в течение 10 мин при 12500g и далее очищали центрифугированием в градиенте плотности сахарозы (наслоение 0,7:1,2:1,4 М растворов сахарозы в соотношении 1:1:1, pH 7,4) в течение 2 ч при 50000g [17]. По данным электронной микроскопии, на этом этапе происходит очистка митохондриальной фракции от загрязняющих ее синапсом и миелина. Очищенную фракцию митохондрий суспендировали в 0,01 М фосфатном буфере (pH 7,4) и осаждали при 12500g. Осадок вновь суспендировали в том же буфере и разрушали митохондрии в гомогенизаторе типа «Блендор» в течение 5 мин при ско-

рости 13000 оборотов в мин. От митохондриальных мембран освобождались центрифугированием при 130000g. Полученный супернатант служил источником мМДГ мозга для дальнейшей очистки; он же был объектом исследования свойств солиобилизированной мМДГ мозга.

Дальнейшую очистку препарата мМДГ проводили с применением кислотной precipitation части балластных белков при pH 6,0 и ИОХ на отечественном катионите «Биокарб». Сорбцию мМДГ осуществляли в колонке с 3,2—4,2 см³ катионита со скоростью 85—90 мл/ч. По окончании сорбции колонку промывали деионизированной водой до исчезновения в промывных водах белка.

Десорбцию фермента проводили в ступенчатом градиенте pH тремя 0,1 М фосфатными буферными растворами с pH 6,0; 6,5 и 7,0. Скорость десорбции составляла 40—45 мл/ч. На выходе из колонки отбирали фракции элюата, в которых определяли малакдегидрогеназную активность. Фракции с величиной У.А. более 1000 мкмоль NADH/мг белка/мин объединяли в общий объем, в дальнейшем этот препарат использовали для исследования свойств очищенной мМДГ мозга.

Результаты и обсуждение

Разработанные условия выделения и очистки мМДГ мозга позволили получить препарат со степенью очистки фермента 200—250 раз. Величина У. А. составила 1800—2500 мкмоль NADH/мг белка/мин. В препарате в качестве примеси присутствовал еще один белок, идентифицировать который не удалось.

Электрофорез в ПААГ в присутствии ДДС-Na показал, что для субъединицы мМДГ мозга характерна величина M_r 35 кД, что близко M_r субъединицы мМДГ сердца [18].

Изучена зависимость скорости реакции восстановления оксалоацетата от pH среды (рис. 1). Показано, что кривая зависимости имеет типичную колоколообразную форму с максимумом активности при pH 7,6. Эти данные близки результатам, полученным Bracht, Campello [19] на мМДГ сердца. Особенностью мМДГ мозга является более щелочной оптимум и широкий диапазон pH.

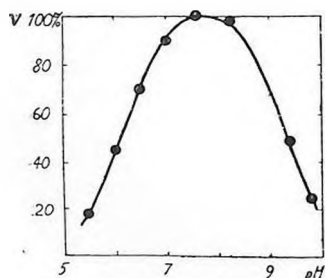


Рис. 1.

Рис. 1. Зависимость активности мМДГ мозга в реакции восстановления от pH среды. По оси ординат — активность фермента в % от максимально регистрируемой

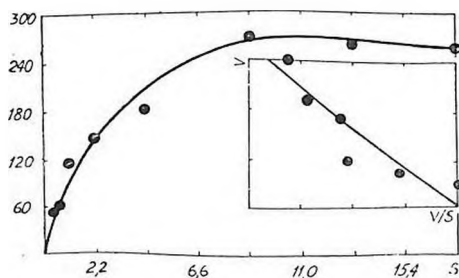


Рис. 2.

Рис. 2. Зависимость начальной скорости реакции (V , нМ/мин) от концентрации малата (мм) для очищенной мМДГ мозга

Установлены существенные различия в кинетических характеристиках очищенной мМДГ мозга для малата и NADH (таблица). Более низкое значение K_m для NADH по сравнению с K_m для малата свидетельствует в пользу большего сродства фермента к восстановленному коферменту, чем к восстановленному субстрату реакции. Существенно выше и V окисления NADH.

Кривая зависимости начальной скорости реакции от концентрации малата имеет гиперболическую форму (рис. 2). Активность фермента достигает максимально регистрируемой скорости при концентрации малата 8,8 мМ. Дальнейшее увеличение его концентрации не ведет к существенному изменению скорости реакции. В координатах Эди-Хофсти и Лайнуивера-Бэрка графики имеют линейную форму, что подтверждает классический характер кинетики фермента. Кривая насыщения NADH для очищенной мМДГ мозга имеет гиперболическую форму (рис. 3, а). Насыщение фермента достигается при концентрации восстановленного кофермента 0,2 мМ, дальнейшее увеличение ее не ведет к изменению скорости реакции. В координатах Лайнуивера-Бэрка и Эди-Хофсти графики линейны.

Таблица

Кинетические характеристики мМДГ мозга

		Очищенная мМДГ	Солюбилизованная мМДГ	МДГ митохондриальной фракции
Малат	K_m (мМ)	0,9	-----	1,9
	V (мкмоль/мг белка/мин)	$1,69 \cdot 10^3$	-----	0,39
NADH	K_m (мМ)	0,034	0,044	0,067
	V (мкмоль/мг белка/мин)	$2,03 \cdot 10^3$	25,4	3,54

Изучены кинетические характеристики МДГ мозга митохондриальной фракции. Значения K_m и V для малата и NADH представлены в таблице. Как и в случае очищенного фермента, для МДГ митохондриальной фракции установлено более высокое сродство к NADH, чем к малату, и высокая скорость окисления NADH. Вместе с тем, форма кривой насыщения фермента восстановленным коферментом существенно отличается от аналогичной кривой для очищенной мМДГ (рис. 3, б). Сигмовидный характер кривой насыщения свидетельствует о неподчинении фермента классической кинетике Михаэлиса-Ментен и может оцениваться как проявление аллостерических свойств. В митохондриальной фракции обнаружено изменение по сравнению с очищенной мМДГ чувствительности фермента к высоким концентрациям NADH. При увеличении концентрации NADH свыше 0,2 мМ наблюдается от-

четливое ингибирование активности фермента. В координатах Лайнувера-Бэрка и Эди-Хофсти графики не линейны, что свидетельствует о проявлении мМДГ митохондриальной фракции мозга выраженной положительной кооперативности по NADH. Это подтверждается высокими значениями величин p_H и q , равных соответственно 1,6 и 1,68.

Митохондриальная МДГ мозга, солюбилизированная с мембран, но не очищенная от других растворимых митохондриальных белков, проявляет кинетические свойства, близкие, но не идентичные очищенному ферменту (таблица). Солюбилизированная мМДГ характеризует-

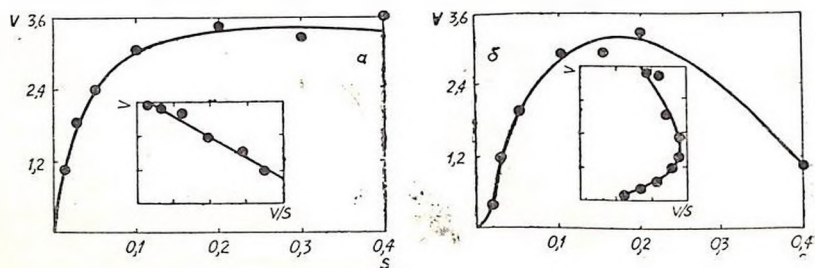


Рис. 3. Зависимость начальной скорости реакции (V , нМ/мин) от концентрации NADH (S , мМ): а—для очищенной мМДГ, б—для мМДГ митохондриальной фракции мозга

ся гиперболической кривой насыщения NADH (рис. 4), позволяющей предполагать подчинение фермента уравнению Михаэлиса-Ментен. Однако это предположение подтверждается не во всех опытах. При анализе отдельных экспериментов отмечена как линейная форма графиков в координатах Эди-Хофсти и значение p_H и q около 1, так и существенное отклонение от линейности графика Эди-Хофсти (рис. 4) и

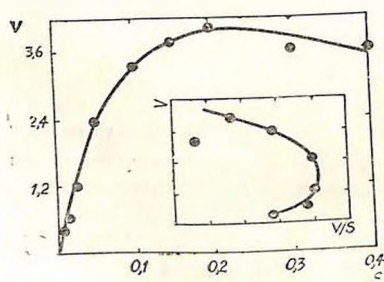


Рис. 4. Зависимость начальной скорости реакции (V , нМ/мин) от концентрации NADH (S , мМ) для мМДГ, солюбилизированной с митохондриальных мембран (график в координатах Эди-Хофсти представляет пример из группы опытов с неклассической кинетикой)

увеличение коэффициента q до 1,5. Последнее можно расценивать как проявление положительной кооперативности для NADH. Одной из причин такого рода отклонений от кинетики Михаэлиса-Ментен может явиться присутствие в растворе, по крайней мере, двух форм фермента с различающимися кинетическими характеристиками (одна из которых может обладать аллостерическими свойствами). Однако для

конкретного выяснения причин такой неоднородности в свойствах солюбилизированной мМДГ мозга требуются дальнейшие эксперименты.

В работе установлено, что для очищенной мМДГ мозга характерно более высокое сродство к NADH, чем к малату, что соответствует данным, касающимся мМДГ из других тканей [19, 20]. Зависимость начальной скорости реакции от концентрации малата и NADH имеет гиперболическую форму, что указывает на классический характер кинетики фермента. Такого рода зависимость установлена для очищенной мМДГ сердца [21, 22]. Вместе с тем, в наших исследованиях выявлена более низкая чувствительность мМДГ мозга к изменению концентрации NADH, что позволяет сделать вывод о близких, но не идентичных свойствах мМДГ мозга и других тканей.

Показано, что мМДГ мозга, солюбилизированная с митохондриальными мембранами, но не очищенная от других митохондриальных белков, по ряду кинетических свойств близка очищенной мМДГ мозга. Для обеих форм мМДГ мозга свойственна низкая чувствительность к высоким концентрациям NADH, гиперболическая форма кривых насыщения восстановленным коферментом и близкие значения K_m для NADH. Однако для солюбилизованного фермента график в координатах Эди-Хофсти может быть нелинейным. По мнению Диксона и Уэбба [23], при построении графика в этих координатах наиболее отчетливо проявляются отклонения фермента от кинетики Михаэлиса-Ментен. Характер отклонения от линейности и значение коэффициента q свидетельствуют о проявлении положительной кооперативности к NADH. На принципиальную возможность проявления мМДГ мозга аллостерических свойств указывают данные Kashiwamata и соавт. [3], установивших, что при взаимодействии очищенной мМДГ мозга с билирубином форма кривой насыщения фермента NADH меняется с гиперболической на S-образную.

Выявлены различия в кинетических свойствах очищенной мМДГ мозга и фермента митохондриальной фракции мозга. Для фермента, связанного с митохондриальными мембранами, установлено выраженное проявление аллостерических свойств, что выражается в значениях n и q , форме графиков в координатах Лайнуивера-Бэрка и Эди-Хофсти и форме кривой насыщения фермента NADH. Полученные данные позволяют предполагать, что мМДГ мозга, сохраняя связь с митохондриальными мембранами, проявляет положительную кооперативность к NADH, которую утрачивает при солюбилизации с мембраны. На примере ткани печени показано, что мМДГ, связанные с мембраной и солюбилизированные с ней, отличаются друг от друга по физико-химическим и кинетическим свойствам [5—7].

Представленные результаты указывают на возможность регуляции мМДГ мозга путем взаимодействия фермента с митохондриальными мембранами и, вероятно, с другими растворимыми митохондриальными белками. Можно полагать, что существование подобного меха-

низма *in vivo* значительно расширяет каталитические возможности фермента, регулируя его активность в широком диапазоне концентраций восстановленного кофермента.

THE KINETIC CHARACTERISTICS OF MEMBRANE-BOUND AND PURIFIED BRAIN MITOCHONDRIAL MALATE DEHYDROGENASE

KHVAIOVA E. M., GARCIA A.

S. M. Kirov Medical School, Gorky

A new method for the purification of brain mitochondrial malate dehydrogenase (mMDH), using ion-exchange chromatography on „Bio-carb“, has been developed. Kinetic properties of brain mitochondrial fraction MDH, purified brain mMDH and mMDH solubilized from mitochondrial membranes have been studied. Significant differences in the forward and backward reaction kinetic properties have been detected for brain mMDH. The classic kinetics of purified brain mMDH for malate and NADH has been established. As for the enzyme solubilized from mitochondrial membranes but not separated from another soluble mitochondrial proteins there has been established a possibility to manifest positive cooperativity for NADH along with the classic kinetics. Brain mitochondrial fraction MDH is characterized by a pronounced positive cooperativity for NADH.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Dawson A. G. Trends in Biochem. Scient., v. 4, № 8, p. 171—176, 1979.
2. Строев Е. А.—В кн.: Дегидрогеназы в норме и патологии (под ред. Е. М. Хватовой), с. 28—36, Горький, Волго-Вятское Изд-во, 1980.
3. Kashiwamata S., Niwa F., Katoh R. J. Neurochem., v. 84, p. 189—191, 1975.
4. Lai J. C. K., Clark J. B. Biochem. Soc. Trans., v. 6, p. 993—995, 1976.
5. Comte J., Gantheron D. Biochimie, v. 60, p. 1299—1305, 1978.
6. Casado F., Cortes A., Bozal J. Int. J. Biochem., v. 11, p. 437—447, 1980.
7. Kircova M., Russanov E. Acta Physiol. Pharmacol. Bulg., v. 5, № 4, p. 57—62, 1979.
8. Aspray T. E., Rihimaki G. M., Wolfe R. G. J. Biol. Chem., v. 254, p. 1576—1579, 1979.
9. Foster M., Harrison J. H. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 64, p. 528—534, 1975.
10. Atkins G. L., Nimmo I. A. Anal. Biochem., v. 104, p. 1—9, 1980.
11. Корниш-Бовден Э. Основы ферментативной кинетики, М., Мир, 1979.
12. Курганов Б. И. Аллостерические ферменты, М., Наука, 1978.
13. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.

14. Кочетков Г. А. Практическое руководство по энзимологии, М., Высшая школа, 1980.
15. Маурер Г. Р. Диск-электрофорез. Теория и практика электрофореза в полиакриламидном геле, М., Мир, 1971.
16. Weber K., Osborn M. J. Biol. Chem., v. 244, p. 4406—4412, 1969.
17. Fonyo A., Somogyi J. Acta physiol. Acad. sci. hung., v. 18, № 3, p. 191—198, 1960.
18. Banaszak L. J., Bradshaw P. A.—In: The Enzymes (ed. P. D. Boyer), N.-Y., v. XI, part A, p. 369—396, 1975.
19. Bracht A., Campello A. P. Experientia, v. 35, p. 1559—1561, 1979.
20. Thorne C. J. R., Kapan N. O. J. Biol. Chem., v. 238, p. 1861—1868, 1963.
21. Bracht A., Campello A. P. Arg. Biol. Technol., v. 23, p. 337—341, 1980.
22. Kitto G. B., Kaplan N. O. Biochemistry, v. 5, p. 3966—3980, 1966.
23. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты, т. 1, М., Мир, 1982.

Поступила 14. V 1986

УДК 546.001.1:547.963:616.8.009

НАРУШЕНИЯ КАТАБОЛИЗМА БИОГЕННЫХ АМИНОВ И ДРУГИХ АЗОТИСТЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ГОЛОВНОМ МОЗГУ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ

ХУЖАМБЕРДИЕВ М., САЙДУЛЛАЕВ Т., МАМАДИЕВ М., *ГОРКИН В. З.

Андижанский государственный медицинский институт им. М. И. Калининна
*Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

В динамике развития экспериментального атеросклероза на фоне выраженных нарушений содержания в крови холестерина, триглицеридов и β -липопротеидов обнаружено снижение дезаминирования моноаминов—серотонина, бензиламина и тирамина—при одновременном усилении дезаминирования АМР и появлении качественно новой кадавериндезаминазной активности в митохондриальной фракции ткани головного мозга кроликов. Полученные результаты указывают на возможность качественного обратимого модифицирования свойств митохондриальных МАО. При способствующем развитию атеросклероза гипотиреозе, но не при гипертиреозе, такие нарушения катаболизма азотистых соединений были выражены в еще большей мере, что согласуется с предположением о возможном патогенетическом значении качественного модифицирования активности МАО при атеросклерозе.

Нарушения метаболизма биогенных аминов в головном мозгу при атеросклерозе давно привлекают внимание исследователей [1] вследствие того, что амины и ферменты, участвующие в их метаболизме, имеют первостепенное значение для регуляции жизнедеятельности мозга [2], а также в связи с важностью для медицины нарушений его функций при атеросклерозе [3].

Целью настоящей работы было изучение в ткани головного мозга в динамике развития экспериментального атеросклероза особенностей нарушения ферментативного дезаминирования биогенных аминов и других азотистых соединений как ключевой реакции их катаболизма [4].

277

Материалы и методы

Опыты проводили на беспородных кроликах-самцах массой 2,2—2,5 кг. Экспериментальную алиментарную гиперхолестеринемию вызывали путем ежедневного введения в желудок животных при помощи эластичного зонда эмульсии холестерина в хлопковом масле в течение 30, 60 или 90 суток из расчета 0,3 г/кг массы тела [5]. Гипертиреоз у кроликов вызывали ежедневным добавлением к корму тиреонидина по соответствующей схеме в течение 4 недель [6]. Для получения гипертиреоза на фоне гиперхолестеринемии животным в течение 30 дней ежедневно вводили эмульсию холестерина, а затем (через 1,5—2 г) тиреонидин. Гипотиреоз вызывали ежедневным добавлением к корму 1-метил-2-меркаптоимидазола (мерказолил, мети-мазол) из расчета 10 мг/кг массы тела в течение 30 дней [7, 8].

Методы и условия выделения митохондриальной фракции, исследования скорости дезаминирования азотистых соединений, определения содержания белка, холестерина, триглицеридов, β -липопротеидов, проведения морфометрических и электрокардиографических исследований указаны ранее [9, 10]. Содержание в сыворотке крови связанного с белками йода (СБИ), определяли, используя свойство йода служить катализатором в реакции восстановления сульфата церия мышьяковистой кислотой [11].

Результаты и обсуждение

Как следует из данных, представленных в табл. 1, на 90-ые сутки развития экспериментальной гиперхолестеринемии в митохондриальной фракции головного мозга кроликов были обнаружены особенно

Таблица 1

Дезаминирование некоторых азотистых соединений при их инкубации с митохондриями головного мозга кроликов в динамике развития экспериментального атеросклероза

Группы кроликов	Дезаминирование (мкмоль аммиака/ мг белка/45 мин)				
	серотонина	бензиламина	тирамина	кадаверина	АМР
Интактные	0,29±0,02 (10)	0,36±0,03 (10)	0,53±0,05 (10)	0 (10)	0,30±0,02 (10)
Атеросклероз (сутки) 30	0,23±0,02 (8) *p<0,05	0,26±0,02 (8) p<0,05	0,46±0,03 (8)	0 (8)	0,48±0,03 (8) p<0,001
60	0,29±0,02 (8)	0,29±0,03 (8)	0,47±0,04 (8)	0 (8)	0,43±0,04 (8) p<0,05
90	0,23±0,02 (7) p<0,05	0,23±0,03 (7) p<0,05	0,34±0,03 (7) p<0,01	0,11±0,01 (7)	0,52±0,04 (7) p<0,001

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3 *p по сравнению с группой интактных кроликов. В скобках—число опытов.

отчетливые нарушения дезаминирования азотистых соединений. Эти нарушения характеризовались статистически достоверным снижением дезаминирования всех трех исследованных моноаминов: серотонина (специфический субстрат МАО типа А), бензиламина (специфический субстрат МАО типа В) и тирамина, условно причисляемого к числу так называемых смешанных субстратов, окисляемых при участии МАО

типов А и Б [4]. Одновременно имели место статистически достоверное увеличение дезаминирования АМР и появление качественно нового для митохондриальной фракции мозга кролика свойства дезаминировать субстрат динминоксидазы кадаверин, причем скорость этой последней реакции достигала при оптимальных условиях измерения 48% от скорости дезаминирования серотонина в данном биологическом объекте. Усиление дезаминирования в сложной биологической системе АМР [12], кадаверина или других азотистых соединений, не относящихся к числу субстратов МАО, на фоне снижения ее активности может происходить либо в результате стимуляции аденилатдезаминазы, либо как следствие качественной обратной модификации каталитических свойств МАО. Ранее было установлено, что в каждом конкретном случае ответить на этот вопрос удастся с помощью избирательных ингибиторов МАО [4]. Если правильна вторая гипотеза, то ингибиторы МАО, в особенности такие избирательные ингибиторы МАО типа А, как хлоргидин или пипразидол, должны предотвращать усиление дезаминирования азотистых соединений, не относящихся к числу субстратов МАО, что и было экспериментально доказано в целом ряде систем [4].

В опытах с высокоочищенными препаратами МАО из различных биологических объектов вызываемое обработкой окислителями частично обратимое окисление тиоловых групп до остатков сульфеновых кислот приводило не только к снижению скорости окисления моноаминов, но и к предотвращаемому специфическими ингибиторами МАО появлению качественно новых свойств катализировать дезаминирование (как окислительное, так и гидролитическое) целого ряда азотистых соединений, в частности днаминов, АМР, аминосахаров и др., не являющихся субстратами МАО [4]. В пробах, содержавших фрагменты митохондриальных мембран и каталитические концентрации Fe^{2+} , а также в организме при различных патологических состояниях, сопровождающихся накоплением в тканях липидных перекисей (лучевые поражения, гипервитаминоз D_2 , интоксикации кислородом под высоким давлением и др.) именно они инициировали частичное окисление тиоловых групп МАО [15].

Было выдвинуто предположение [9, 10], что подобное явление могло бы иметь место также при атеросклерозе или экспериментальной гиперхолестеринемии, сопровождающихся накоплением в тканях липидных перекисей [16], что подтверждается данными, представленными в табл. 1. Однако существенные для его проверки опыты с избирательными ингибиторами МАО, необходимую и достаточную тканевую концентрацию которых надо создать и поддерживать в организме на протяжении всего эксперимента [4], не удалось осуществить вследствие большой продолжительности эксперимента. Сравнительное исследование каталитических и физико-химических свойств высокоочищенных препаратов МАО, выделенных из тканей головного мозга в норме и при атеросклерозе, позволит в дальнейшем однозначно доказать выдвинутое предположение.

Из данных, приведенных в табл. 2, следует, что наиболее значительные изменения в содержании липидов отмечались в сыворотке крови кроликов именно на 90-й день развития гиперхолестеринемии, когда были обнаружены и особенно значительные нарушения дезаминирования азотистых соединений, косвенно указывающие на возможность качественного модифицирования каталитических свойств MAO.

Таблица 2

Содержание липидов в сыворотке крови кроликов в динамике развития экспериментального атеросклероза

Группы кроликов	Холестерин, мг %	Триглицериды, мг %	β -липопротеиды, мг %
Интактные	65,8 $\pm$ 4,15 (9)	50,5 $\pm$ 3,62 (9)	118 $\pm$ 12,8 (9)
Атеросклероз (сутки) 30	387,37 $\pm$ 42,7* (8)	94,36 $\pm$ 6,94* (8)	685 $\pm$ 76,67* (8)
60	465,92 $\pm$ 35,17* (11)	118,66 $\pm$ 7,53* (11)	998,18 $\pm$ 52,46* (11)
90	644,4 $\pm$ 50,41* (7)	140,57 $\pm$ 12,93* (7)	1400 $\pm$ 139,4* (7)

Примечание. * $p < 0,001$.

Если предположить, что обнаруженные при экспериментальном атеросклерозе нарушения реакций дезаминирования азотистых соединений не просто сопровождают развитие патологического процесса, а имеют определенное патогенетическое значение, то можно было ожидать, что в условиях гипотиреоза эти нарушения должны быть выражены в большей мере, чем у животных с нормально функционирующей щитовидной железой. Дисфункции щитовидной железы существенно влияют на процессы развития атеросклероза, причем гипотиреонидные состояния в общем способствуют формированию атеросклеротических изменений [1]. Имеются сведения о приводящих к повышению скорости окисления серотонина изменениях при гипотиреозе свойств фосфолипидного микроокружения MAO в наружных митохондриальных мембранах [7].

Результаты исследований, проведенных с целью проверки этого предположения, представлены в табл. 3.

Эксперименты проводили на 30-й день развития атеросклероза, когда, несмотря на наличие гиперхолестеринемии и повышение содержания в сыворотке крови триглицеридов и β -липопротеидов (табл. 2), содержание в ней СБИ еще не снижено, что характерно для выраженного атеросклероза [13, 14]. На внутренней поверхности аорты атеросклеротические бляшки в этот период еще отсутствуют, а прижизненные электрокардиографические исследования указывают лишь на относительно небольшие отклонения от нормы. При этом в митохондриальной фракции головного мозга кроликов было выявлено лишь статистически достоверное снижение дезаминирования серотонина и в особенности бензиламина, а также увеличение АМР-дезаминазной активности. Однако тираминдезаминазная активность статистически

Таблица 3

Дезаминирование некоторых азотистых соединений при их инкубации с митохондриями головного мозга кроликов при экспериментальном атеросклерозе (30 суток) на фоне гипер- или гипотиреоза

Группы кроликов	Дезаминирование (мкмоль аммиака/мг белка/45 мин)				
	серотонина	бензпламина	тираммина	кадаверина	АМР
I Интактные	$0,29 \pm 0,02$ (10)	$0,36 \pm 0,03$ (10)	$0,53 \pm 0,05$ (10)	0 (10)	$0,30 \pm 0,02$ (10)
II Атеросклероз	$0,23 \pm 0,02$ (8) $p < 0,05$	$0,26 \pm 0,02$ (8) $p < 0,05$	$0,46 \pm 0,03$ (8)	0 (8)	$0,48 \pm 0,03$ (8) $p < 0,001$
III Гипертиреоз	$0,28 \pm 0,05$ (12)	$0,39 \pm 0,02$ (12)	$0,80 \pm 0,04$ (12)	0 (12)	$0,26 \pm 0,03$ (12)
IV Гипертиреоз+атеросклероз	$0,24 \pm 0,02$ (7)	$0,35 \pm 0,04$ (7)	$0,52 \pm 0,04$ (7)	0 (7)	$0,29 \pm 0,06$ (7)
V Гипотиреоз	$0,22 \pm 0,02$ (7) $p < 0,02$	$0,30 \pm 0,04$ (7) $p < 0,05$	$0,38 \pm 0,02$ (7) $p < 0,02$	$0,12 \pm 0,02$ (7)	$0,26 \pm 0,02$ (7)
VI Гипотиреоз+атеросклероз	$0,21 \pm 0,01$ (9) $p < 0,001$	$0,23 \pm 0,02$ (9) $p < 0,01$	$0,31 \pm 0,02$ (9) $p < 0,001$	$0,17 \pm 0,01$ (9)	$0,37 \pm 0,02$ (9) $p < 0,02$

достоверно не изменялась, а кадавериндезаминазную активность не удалось обнаружить (табл. 3, группа II).

При гипертиреозе никаких отклонений по сравнению с нормой в катаболизме исследованных азотистых соединений обнаружено не было (табл. 3, группа III). Аналогичный результат был получен и при сочетанном воздействии гипертиреоза и атеросклероза (табл. 3, группа IV), что свидетельствует об устранении в условиях гипертиреоза [1] тех нарушений катаболизма азотистых соединений, которые отмечались в митохондриальной фракции ткани головного мозга кроликов на 30-ый день развития экспериментального атеросклероза (табл. 3, группа II).

При гипотиреозе наблюдалось статистически достоверное снижение дезаминирования моноаминов. Дезаминирование АМР не изменялось по сравнению с нормой, но появлялась кадавериндезаминазная активность, достигавшая при оптимальных условиях 55% по сравнению со скоростью дезаминирования серотонина (табл. 3, группа V). Подобное нарушение катаболизма азотистых соединений может рассматриваться как косвенное указание на возможность атипичной, не сопровождаемой усилением АМР-дезаминазной активности, качественной обратной модификации каталитических свойств митохондриальной МАО [4, 15]. Такое изменение функции МАО при гипотиреозе не было известно ранее. Оно может быть связано со снижением антиоксидательной активности липидного компонента биомембран в условиях имевшего место в наших опытах выраженного дефицита природного антиоксиданта тироксина [19], когда содержание СБИ в сыворотке крови снижалось статистически достоверно (табл. 2). При морфометрических исследованиях интимы аорты таких животных были выявлены определенные признаки образования атеросклеротических бляшек, занимавших в среднем $1,46 \pm 0,3\%$ общей площади интимы; в группе II, то есть у животных с алиментарным атеросклерозом эта величина составляла $5,20 \pm 1,54\%$, достоверно отличаясь по сравнению с группой V ($p < 0,05$), тогда как у животных в группах III и IV атеросклеротических бляшек не было вообще. Таким образом, в условиях гипотиреоза появление атеросклеротических бляшек как бы сопровождает развитие нарушений катаболизма азотистых соединений, указывающих на возможность качественной модификации свойств МАО, что согласуется с предположением о возможном патогенетическом значении таких нарушений при атеросклерозе [9, 10].

Снижение скорости дезаминирования моноаминов с одновременным появлением свойства дезаминировать субстраты диаминоксидаз (кадаверин, путресцин, гистамин) и АМР, хотя и было отмечено в опытах с высокоочищенными препаратами моноаминоксидаз и с фрагментами биомембран в качестве одного из признаков качественного обратимого модифицирования свойств МАО, имело место не во всех случаях. Так, например, инкубация очищенных препаратов МАО из печени быка с окисленным глутатионом (но не с перекисью водорода

или окисленной олеиновой кислотой) приводила к снижению тирамин-дезаминирующей активности и появлению свойства дезаминировать АМР, однако гистаминдезаминирующая активность при этом не проявлялась [20]. Преннкубация фрагментов митохондриальных мембран из печени крысы с 0,01 мМ Fe^{2+} приводила к некоторому снижению скорости дезаминирования тирамина и статистически достоверному снижению скорости дезаминирования триптамина. Одновременно отмечали появление свойства дезаминировать гистамин, кадаверин и АМР. Преннкубация фрагментов митохондриальных мембран в присутствии Fe^{2+} в более высокой концентрации (0,1 мМ) сопровождалась некоторым усилением дезаминирования гистамина и кадаверина по сравнению с опытами, проведенными в присутствии 0,01 мМ Fe^{2+} , однако скорость АМР-дезаминирующей реакции, индуцированной в фрагментах митохондриальных мембран, при этом не нарастала, а даже несколько снижалась [24]. Эти данные согласуются с основанными на кинетических доказательствах представлениями о том, что кадаверин и АМР дезаминируются при участии идентичных друг другу активных центров модифицированных МАО [15, 17, 18, 20—22]. Эти центры не идентичны также каталитическим центрам обычных (не подвергнутых воздействию окислителей) МАО, хотя и локализованы на поверхности макромолекул, не различимых по электрофоретической подвижности в ПААГ [23].

При гипотиреозе (табл. 3, группа V) обнаруживалось достоверное снижение дезаминирования всех исследованных моноаминов с одновременным появлением значительной кадавериндезаминирующей активности. При сочетании воздействия гипотиреоза и экспериментального атеросклероза (группа VI) интенсивность дезаминирования бензиламина и тирамина по сравнению с гипотиреотическими животными (группа V) еще более снижалась, при этом отмечалось повышение уровня кадавериндезаминирующей и АМР-дезаминирующей активности.

Таким образом, в этих условиях удалось показать усугубление вызываемых гиперхолестеринемией нарушений катаболизма азотистых соединений в условиях сочетания гипотиреоза с гиперхолестеринемией. Это заключение согласуется с результатами морфометрических исследований по измерению площади патологически измененных участков интимы аорты у этих двух групп животных.

Появление признаков качественных нарушений катаболизма азотистых соединений в ткани головного мозга и других органов, наблюдаемых при атеросклерозе, может быть предотвращено и устранено при помощи антиоксидантов, нуклеофильных реагентов и ряда соединений [10, 24, 25].

CHANGES IN THE CATABOLISM OF BIOGENIC AMINES AND OTHER AMINO COMPOUNDS IN BRAIN UNDER EXPERIMENTAL ATHEROSCLEROSIS

KHUZHAMBERDIEV M., SAIDULLAYEV T., MAMADIEV M.,
*GORKIN V. Z.

Andizhan School of Medicine; *Institute of Biological and Medical
Chemistry, Moscow

Under experimental atherosclerosis decrease in deamination of serotonin, benzylamine, tyramine and AMP has been detected in addition to appearance of cadaverin-deaminating activity in rabbit brain mitochondrial fraction. Data obtained point to a possible modification of mitochondrial MAO properties in atherosclerosis. Hypothyreosis that aggravates atherosclerosis leads to more pronounced changes in the catabolism of amino compounds.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Чеботарев Д. Ф., Коркушко О. В., Маньковский Н. Б., Миц А. Я. Атеросклероз и возраст, Л., Медицина, 1982.
2. Catecholamines: basic and clinical frontiers (eds. E. Usdin, I. J. Kopin, J. Bar-chas), New-York, Pergamon Press, 1979.
3. Банищikov В. М., Белкин Л. И. Пробл. эндокринологии, № 4, с. 82—88, 1963.
4. Горкин В. З. Аминоксидазы и их значение в медицине, М., Медицина, 1981.
5. Hall J. E., Mills S. E., Carey R. M. Atherosclerosis, v. 35, p. 87—92, 1980.
6. Гольбер Л. М., Кандрор В. И. Тиреотоксическое сердце, с. 67—71, М., Медицина, 1972.
7. Viscari A., Blassoni P., Timiras P. S. J. Neurochem., v. 40, p. 1019—1025, 1983.
8. Жукова О. Т. Пробл. эндокринологии, № 1, с. 72—78, 1958.
9. Хужамбердиев М., Мамадиев М., Горкин В. З. Вопр. мед. химии, т. 27, с. 829—835, 1981.
10. Мамадиев М., Хужамбердиев М., Горкин В. З. Вопр. мед. химии, т. 29, № 2, с. 83—89, 1983.
11. Комарова Т. Ф., Тендлер Д. С., Соколова Е. В. Пробл. эндокринологии, № 4, с. 72—76, 1964.
12. Арутюнян А. В., Гулян Э. А., Нерсисян Ц. М., Манукян Л. А., Абрамян К. С. Укр. биохим. журн., т. 50, № 5, с. 554—558, 1978.
13. Гриндева Л. Н., Суворов Н. Н., Горкин В. З. Вопр. мед. химии, т. 22, № 2, с. 245—253, 1976.
14. Исаханян Г. Д., Горкин В. З. Вопр. мед. химии, т. 22, № 3, с. 380—388, 1976.
15. Gorkin V. Z. Amine oxidases in clinical research, Oxford, Pergamon Press, 1983.
16. Ланкин В. З. Кардиология, № 8, с. 42—48, 1980.
17. Фабри Э. И. Бюл. эксперим. биол. и мед., № 8, с. 35—36, 1969.
18. Бабаджанов С. Н. Мед. журн. Узбекистана, № 4, с. 44—46, 1981.
19. Буракова Е. Б., Алесенко А. В., Молочкина Е. М., Пальмина Н. П., Храпова Н. Г. Бисантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте, М., Наука, 1975.
20. Akopyan L. I., Kulligina A. A., Terzeman I. I., Gorkin V. Z. Biochim. et biophys. acta, v. 289, p. 44—56, 1972.

21. *Гаришвили Т. Г., Кривченко Р. С., Горкин В. З.* *Вопр. мед. химии*, т. 21, с. 511—518, 1975.
22. *Горкин В. З., Аюлян Ж. И., Верекина И. В., Гриднева Л. И., Стасина Л. Н.* *Биохимия*, т. 35, с. 140—151, 1970.
23. *Гаришвили Т. Г., Горкин В. З.* *Сообщ. АН СССР*, т. 89, с. 185—188, 1978.
24. *Горкин В. З.* *Нейрохимия*, т. 4, № 1, с. 68—79, 1985.
25. *Горкин В. З., Хужамбердиев М., Мамадиев М.* *Успехи гепатологии*, т. 11, с. 40—51, 1985 г.

Поступила 7. II 1986

К СВЕДЕНИЮ ЧИТАТЕЛЕЙ!

С 1 квартала 1978 года в издательстве «Наука» будет выходить новый ежеквартальный журнал «Сенсорные системы».

В журнале будут освещаться различные аспекты физиологии органов чувств. В соответствии с комплексным, междисциплинарным характером исследований в области сенсорной физиологии в журнале будут публиковаться оригинальные работы по следующим основным направлениям:

- молекулярные, мембранные и клеточные механизмы сенсорной рецепции;
- нейрофизиологические механизмы передачи и переработки информации на всех уровнях сенсорных систем;
- нейро- и психофизиологические механизмы реализации сенсорной информации, опознания образов;
- моделирование сенсорных процессов и функций;
- широкий круг прикладных аспектов, в том числе медицинских, робототехнических, оптимизации операторской деятельности, восприятие сенсорной информации в процессах обучения и различного рода трудовой деятельности.

Кроме статей экспериментального характера, будут печататься обзоры по актуальным проблемам сенсорной физиологии, а также рецензии на книги и информация о конференциях по этой тематике.

Журнал рассчитан как на специалистов в области нормальной и патологической физиологии, биофизики, психологии сенсорного восприятия, так и на широкий круг биологов, медиков, инженеров, педагогов, интересующихся современным состоянием и перспективами развития физиологии органов чувств.

На журнал «Сенсорные системы» можно подписаться в отделениях «Союзпечати», на почте и у общественных распространителей. Индекс журнала 70810 в «Каталоге советских газет и журналов» на 1987 год. Подписная цена за 4 номера в год — 5 р. 20 коп., за каждый номер — 1 р. 30 коп.

Адрес редакции: 117312, Москва, В-312, ул. Вавилова, 39, ком. 20.



КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 612.822.1

СТИМУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ МОРФИНА НА
ВЫСВОБОЖДЕНИЕ НОРАДРЕНАЛИНА ИЗ СИНАПТОСОМ

*КАЛМАН М., ЧИФЛИКЯН М. Д., АРМЕНЯН А. Р., ГАЛОЯН А. А.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

*† Институт анатомии Земельейского университета, Будапешт, Венгрия

Известно, что опиоиды ингибируют высвобождение ряда нейротрансмиттеров, включая норадреналин и ГАМК, из срезов мозга, синапсом, автономных ганглиев [1—4]. Настоящее сообщение посвящено сравнению действия морфина на высвобождение норадреналина и ГАМК из синапсом, выделенных из мезодienceфальной области и коры головного мозга крыс соответственно.

Синапсомы из коры головного мозга крыс выделяли по методу Hajos [5]. Синапсомы из мезодienceфальной области получали этим же методом с той разницей, что их осаждали в градиенте сахарозы, так как установлено, что они тяжелее синапсом, выделенных из коры головного мозга (Hajos, персональное сообщение). Электронно-микроскопическое изучение подтвердило, что приблизительно 50% синапсом, разделяемых в градиенте сахарозы, находятся в осадке, тогда как синапсомы, выделенные из коры головного мозга, сосредоточены в 0,8 М сахарозе.

Синапсомы (около 0,5 мг/мл) инкубировали при 37° в аэрируемом смеси 95% O₂ и 5% CO₂ Кребс-бикарбонатном буфере, содержащем в mM NaCl—113, KCl—4,8, CaCl₂—2,5, MgSO₄—1,2, KH₂PO₄—1,2, NaHCO₃—25, глюкозу—11,5, pH 7,4. Инкубационная среда содержала 0,1 mM аминоксикусной кислоты или 0,1 мг/мл ипразида и 0,2 мг/мл витамина «С» для предотвращения метаболизма ГАМК и норадреналина соответственно.

После 5-минутной преинкубации синапсом в Кребс-бикарбонатном буфере добавляли 37 нМ ³H-ГАМК (1 MBq/имоль) или 100 нМ ³H-норадреналина (0,555 MBq/имоль) фирмы «Amersham» (Англия). Далее инкубацию синапсом продолжали еще 10 мин. Для изучения высвобождения нейротрансмиттеров по 1 мл инкубационной смеси переносили на миллипоровые фильтры диаметром 0,65 мк в суперфузионные камеры, как описано у Raiteri и соавт. [6], и суперфузию проводили Кребс-бикарбонатным буфером со скоростью 1 мл/мин. Каждые 30 с суперфузат собирали в сцинтилляционные кюветы.

Радиоактивность фракций и фильтра измеряли на сцинтилляционном счетчике «Intertechnique SL-4221» (Франция) в диоксановом сцинтилляторе Брея. Высвобождаемую радиоактивность каждой фракции выражали в процентах от общей радиоактивности (радиоактивность фракций + радиоактивность фильтра).

Использовали аминоксикусную кислоту, ипразид («Sigma», США), морфин («Reanal», Венгрия).

Действие морфина на высвобождение ^3H -норадреналина из синапсом, выделенных из мезодienceфальной области мозга, показано на рис. 1, а: в присутствии 0,1 и 1 мМ морфина вызванное 40 мМ K^+ высвобождение норадреналина увеличивается на 20 и 40% соответственно. Схожий эффект морфина наблюдается и тогда, когда морфин добавляется раньше K^+ -обогащенной среды (рис. 1, б). Морфин не влияет на спонтанное высвобождение норадреналина, однако вызывает более раннее и выраженное K^+ -вызванное высвобождение норадреналина (рис. 1, б), в отличие от одновременного действия

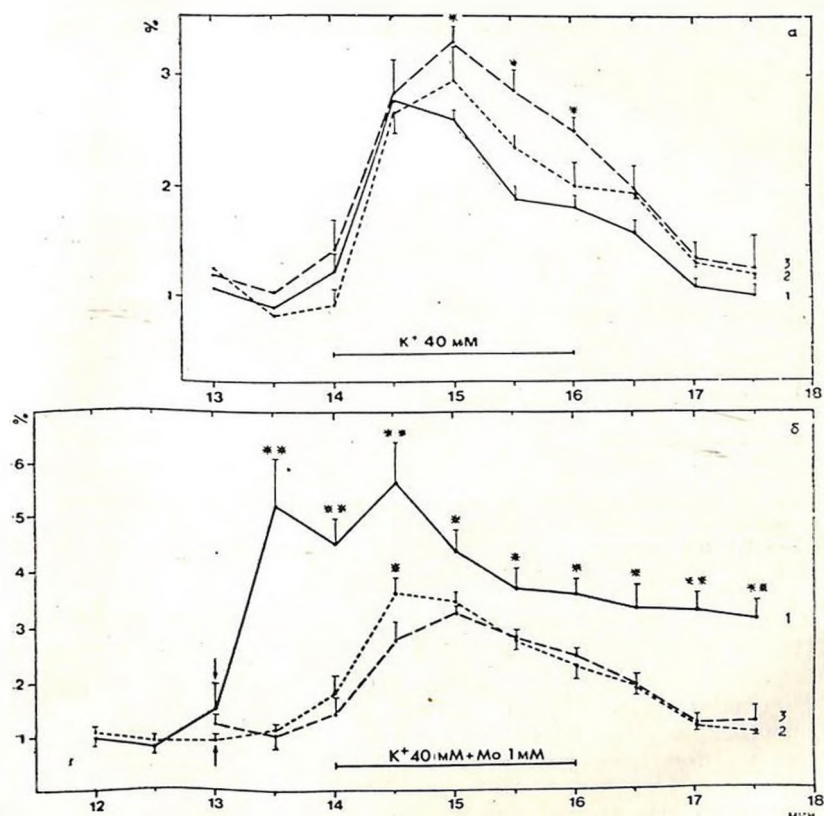


Рис. 1. Действие морфина (а), налуксона + морфина (б) на высвобождение ^3H -норадреналина из синапсом, выделенных из мезодienceфальной области мозга крыс; а) 1—контроль ($n=11$), 2—0,1 мМ морфина ($n=3$), 3—1 мМ морфина ($n=5$). Морфин добавляли одновременно с K^+ -обогащенной средой; б) 1—контроль ($n=11$), 2—1 мМ морфина присутствует в фракциях, начиная с указанной стрелки ($n=6$), 3—1 мМ налуксона присутствует в фракциях, начиная с указанной стрелки ($n=4$). * $p<0,05$; ** $p<0,01$

морфина и 40 мМ K^+ на высвобождение нейротрансмиттера (рис. 1, а). Налоксон (1 мМ) вызывает увеличение спонтанного высвобождения норадреналина (рис. 1, б), а в концентрациях 0,01—1 мМ способен увеличивать также K^+ -вызванное высвобождение 3H -норадреналина (данные не приведены). K^+ вызванное высвобождение 3H -норадреналина значительно выше при совместном применении морфина и налоксона по сравнению с одним морфином (рис. 1, а).

Действие морфина на высвобождение 3H -ГАМК из синапсом, выделенных из коры головного мозга, показано на рис. 2. В присутствии морфина в концентрации 0,1 и 1 мМ K^+ -вызванное высвобождение 3H -ГАМК составляет 75 и 50% от контроля соответственно.

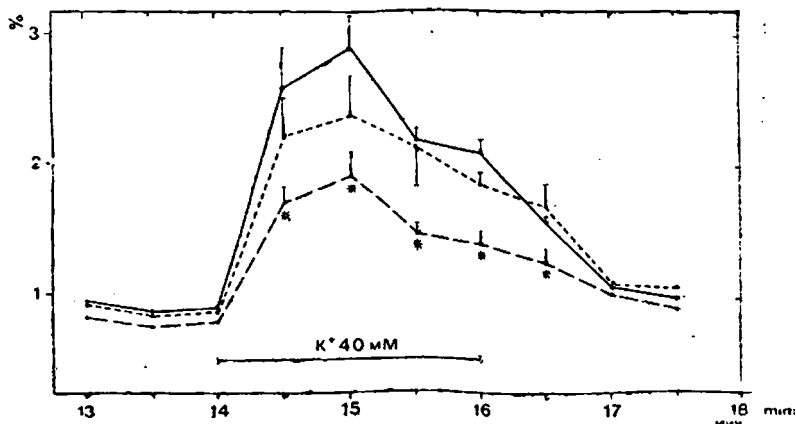


Рис. 2. Действие морфина на высвобождение 3H -ГАМК из синапсом, выделенных из коры головного мозга крысы: — контроль ($n=7$), --- 0,1 мМ морфина в K^+ -обогащенной среде ($n=4$), — 1 мМ морфина ($n=4$). * $p<0,05$

Показано, что опиоиды ингибируют высвобождение норадреналина [1—4] из различных препаратов, включая срезы мезодienceфальной области мозга [7, 8]. Однако описанный ингибиторный эффект опиоидов на мозговых срезах может быть обусловлен непрямым пресинаптическим действием, так как эти препараты содержат сеть нейронов, которые косвенно влияют на высвобождение нейротрансмиттеров.

На гипоталамических синапсосомах Clouet и Williams [9] не обнаружили эффект морфина на высвобождение норадреналина, несмотря на увеличение концентрации морфина до 1 мМ, чему противоречат наши данные. Это можно объяснить тем, что в наших исследованиях изучалась динамика действия морфина на высвобождение норадреналина каждые 30 с, а в работе Clouet, Williams [9] время изучения действия морфина составляло 20 мин и, вполне естественно, что действие морфина не было обнаружено. Выявленный нами эффект

морфина не подавляется налоксоном, а наоборот, в их действии наблюдается синергизм. Сопоставляя и учитывая данные, опубликованные Henderson и соавт. [10], и результаты наших исследований о том, что сам налоксон также вызывает высвобождение норадреналина, можно было не ожидать антагонизма действия налоксона и морфина на этот процесс. Стимулирующее действие морфина на высвобождение норадреналина не следует относить к неспецифическому феномену, который обусловлен высокой концентрацией морфина (0,1—1 мМ). Схожие концентрации морфина снижали K^+ -вызванное высвобождение 3H -серотонина из синапсом, выделенных из мезодиэнцефальной области мозга [11]. K^+ -вызванное высвобождение ГАМК из синапсом, выделенных из коры головного мозга, также подавлялось под действием морфина. Эффект морфина на высвобождение ГАМК, обнаруженный нами, согласуется с данными Веггпап и соавт. [12] в отношении действия энкефалинов на этот процесс. Электрофизиологические данные также свидетельствуют в пользу того, что морфин (0,01—1 мМ) ингибирует высвобождение ГАМК из ингибиторных нейронов коры головного мозга [13].

Стимулирующий эффект морфина на высвобождение норадреналина *in vitro* согласуется с некоторыми наблюдениями *in vivo* о том, что, возможно, действие опиоидов может осуществляться посредством активации норадренергических систем [14, 15].

MORPHINE STIMULATED RELEASE OF NORADRENALINE FROM RAT BRAIN STEM SYNAPTOSOMES

*KALMAN M., CHIFLIKIAN M. D., ARMENIAN A. R., GALOYAN A. A.

Institute of Biochemistry of the Armentan Academy of Sciences,
Yerevan, USSR

*First Department of Anatomy, Semmelweis University Medical
School, Budapest, Hungary

The effect of morphine was studied on the potassium—evoked release of 3H - γ -aminobutyric acid and 3H -noradrenaline from rat cortical and brain stem synaptosomes, respectively. Our findings suggest that while morphine (0,1—1,0 мМ) inhibits the release of GABA, it stimulates that of noradrenaline. This effect of morphine on the release of noradrenaline is its first stimulatory action on the release of a transmitter hitherto described.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Eldelberg E. Progress in Neurobiology, v. 6, p. 81—102, 1976.
2. Frederickson R. C. A. Life Sci., v. 21, p. 23—42, 1977.
3. Vlzi E. S. Progress in Neurobiology, v. 12, p. 181—190, 1979.
4. Starke K. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., v. 21, p. 7—30, 1981.
5. Hajos F. Brain Res., v. 93, p. 485—489, 1975.

6. Raiteri M., Angelini F., Levi G. Eur. J. Pharmacol. v. 25, p. 411—414, 1974.
7. Schwartz J.—Ch. Trends in Neurosci., v. 2, p. 137—138, 1979.
8. Taube H. D., Starke K., Boroński E., Nauyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., v. 299, p. 123—141, 1977.
9. Clouet D. H., Williams N. J. Pharmacol. and Exp. Ther., v. 188, p. 419—428, 1974.
10. Henderson G., Hughes J., Kosterlitz H. W.—In: The release of catecholamines from adrenergic neurons (ed. D. M. Paton), p. 217—228, Pergamon Press, Oxford—New York—Toronto—Sidney—Paris—Frankfurt, 1979.
11. Армения А. Р., Аракелян Л. Н., Галоян А. А. Нейрохимия, т. 4, с. 359—364, 1985.
12. Brennan M. J. W., Cantrill R. C., Wyle B. A. Life Sci., v. 27, p. 1097—1101, 1980.
13. Robinson J. H., Deadwater S. A. Brain Res., v. 224, p. 375—397, 1981.
14. Farris T. S., Richards G. E. Life Sci., v. 27, p. 1345—1349, 1980.
15. Yacquel Y. F., Lajtha A. Science, v. 185, p. 1055, 1974.

Поступила 5. II 1986

УДК 612.82+577.23

СНИЖЕНИЕ АКТИВНОСТИ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В КОРЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ДЕПРИВАЦИИ КАТЕХОЛАМИНЕРГИЧЕСКИХ СИСТЕМ

ОКОН Е. Б., СЕМЕНОВА Т. П., ГРИЦЕНКО Е. И.

Институт биологической физики АН СССР, Пущино

В последнее время в опытах *in vivo* показано участие катехоламинов (КА) в регуляции энергетического обмена мозговой ткани: в утилизации глюкозы [1], в регуляции скорости энергопродукции [2, 3]. Ряд данных свидетельствует о связи КА с окислением важнейшего энергетического субстрата митохондрий (МХ) сукцината. Иммобилизационный стресс вызывает выброс адреналина из надпочечников, повышение уровня КА в крови [4], усиление метаболизма биогенных аминов в мозгу [5] и изменение энергетических реакций МХ печени и мозга при окислении ими сукцината [6, 7]. Показано непосредственное увеличение скоростей окисления сукцината и активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) в печени как при введении адреналина и норадреналина *in vivo*, так и при добавлении его к МХ *in vitro* [8, 9]. Результаты этих исследований согласуются с предположением, что адреналин реализует свое действие в МХ посредством активации окисления сукцината [10]. По-видимому, и в энергопродукции мозга окисление сукцината играет более важную, чем принято считать, роль, и КА участвуют в регуляции его окисления. При этом модулирующая функция КА-ергических систем мозга в регуляции процессов адаптации, обучения и уровня активации ЦНС [11, 12] может проявляться на митохондриальном уровне в регуляции активности СДГ.

Таблица

Изменение величины У. А. сукцинатдегидрогеназы (СДГ) (в нмоль ТФМД/мин/10 мг сухого веса ткани) и содержания катехоламинов (в%) в структурах головного мозга крыс при хронической депривации активности катехоламинергических систем, обусловленной введением 6-оксидофамина

Возраст крыс	Структура мозга	У. А. СДГ		Изменения показателей опыта по сравнению с контролем			Превышение У. А. СДГ в гомогенате неокортекса по сравнению с гомогенатом ствола	
		контроль	опыт	У. А. СДГ	содержание***		контроль	опыт
					норадрена- лина	дофамина		
1 месяц	Неокортекс	131,1 $\pm$ 1,5	108,2 $\pm$ 7,1	-22,9*	-70,1**	-82,8**	27,2**	0,5
	Ствол	103,3 $\pm$ 3,1	107,7 $\pm$ 5,8	+3,8	-46,6**	-58,8**		
3 месяца	Неокортекс	155,8 $\pm$ 8,5	126,1 $\pm$ 11,2	-29,8*	-100,0**	-100,0**	43,9**	9,8
	Ствол	112,5 $\pm$ 5,5	116,3 $\pm$ 6,4	+4,3	-43,6**	-100,0**		
6 месяцев	Неокортекс	129,6 $\pm$ 8,7	107,8 $\pm$ 1,8	-21,8*	-67,3**		32,9**	16,1*
	Ствол	95,7 $\pm$ 7,7	91,7 $\pm$ 8,1	-5,0	-34,3**			

Примечание. * $p < 0,05$ по критерию Вилкоксона; ** $p < 0,01$ по критерию Вилкоксона. ***Данные взяты из работы Семеновой и соавт. [13].

Было изучено влияние хронической химической депривации активности КА-ергических систем мозга, обусловленной введением новорожденным животным специфического нейротоксина 6-оксидофамина (6-ОНДА) фирмы «Sigma» (США) [13], на активность СДГ в гомогенатах неокортекса и каудального отдела ствола головного мозга крыс линии *Wistar* ($n=34$) трех возрастных групп: 1-месячных ($n=10$), 3-месячных ($n=15$) и 6-месячных ($n=9$). В каждом опыте использовали пару животных (контрольное и опытное) для применения непараметрических методов статистической обработки результатов. Крыс декапитировали, извлекали мозг, на холоду выделяли исследуемые регионы и гомогенизировали их в среде, содержащей 0,3 М сахарозу, 10 мМ трис-НСl, pH 7,5. К 2 частям среды добавляли 1 часть измельченной ткани. Измерение величины У. А. СДГ проводили непосредственно после гомогенизации, регистрируя спектрофотометрически при 612 нм восстановление искусственного акцептора электронов катион-радикала тетраметил-п-фенилендиамин (ТМФД), используемого в концентрации 200—300 мкМ. Для этого в 2 мл среды, содержащей кроме указанных выше ингредиентов 5 мМ сукцината и 1 мМ KCN, вносили 0,2 мл гомогената ткани мозга.

Установлено, что депривация КА-ергических систем вызывает снижение величины У. А. СДГ в неокортексе мозга крыс, которое коррелирует со значительным понижением уровня КА (таблица). Изменения У. А. СДГ сходны у животных всех возрастных групп, но наиболее отчетливо выражены у 3-месячных крыс.

Необходимо отметить превышение величины У. А. СДГ в неокортексе по сравнению со стволом, эволюционно более древним образованием, что согласуется с литературными данными, указывающими на более интенсивный энергетический обмен в структурах, преимущественно содержащих серое вещество [1]. Как следует из таблицы, депривация активности КА-ергических систем мозга снижает эту величину. Разница в У. А. СДГ между неокортексом и стволовыми структурами наблюдается во всех трех возрастных группах. Однако наиболее отчетливо он выражен в группе молодых половозрелых животных. Этот факт, наряду с наибольшей чувствительностью У. А. СДГ к депривации КА-ергических систем у 3-месячных животных, свидетельствует о максимальном развитии исследуемых систем регуляции к данному возрасту. Более высокая чувствительность энергетического обмена в неокортексе к действию 6-ОНДА может быть обусловлена разрушением широко дивергированных в нем восходящих проекций от КА-ергических ядер мозга [4, 15].

DECREASE IN RAT NEOCORTEX SUCCINATE DEHYDROGENASE ACTIVITY AFTER CHRONIC CHEMICAL DEPRIVATION OF CATECHOLAMINERGIC SYSTEMS

OKON E. B., SEMENOVA T. P., GRISHCHENKO N. I.

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

The specific activity of succinate dehydrogenase—the important enzyme of energy metabolism in mitochondria—decreases after chronic chemical deprivation of catecholaminergic systems activity caused by administration of specific neurotoxin: 6-hydroxydopamine (6-OHDA) to

newborn rats. Changes in succinate dehydrogenase activity are more pronounced in neocortex than in brain stem, especially in young animals. Data obtained indicate the importance of catecholaminergic systems in brain energy metabolism regulation.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Sokoloff L. I. J. Neurochem., v. 29, p. 13—26, 1977.
2. La Manna I. C., Harrie S. I., Light A. I., Rosenthal M. Brain Res., v. 204, № 1, p. 87—101, 1981.
3. Segal M., Sagie D. B., Maevsky A. Brain Res., v. 202, p. 387—399, 1980.
4. Kvetnansky R.—In: Catecholamines and Stress: Recent Advances (eds. E. Usdin, R. Kvetnansky, I. J. Koplin), Developments in Neuroscience, v. 8, p. 7—18, Elsevier/North-Holland. N. Y.—Amsterdam—Oxford, 1980.
5. Snider S. R., Brown R. M., Carlsson A. J. Neurochem. Transm., v. 35, p. 283—291, 1974.
6. Кондрашова М. Н., Гузар И. Б., Григоренко Е. В., Окон Е. Б. Биофизика, т. 26, с. 687—691, 1981.
7. Kondrashova M. N., Grigorenko E. V., Gusev I. B., Okon E. B. 2nd Europ. Bioenerg. Conf., p. 589—590, Lyon, France, Abstracts, 1982.
8. Кулинский В. Н., Воробьева Л. М. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 3, с. 291—294, 1979.
9. Кулинский В. Н., Кунцевич А. К., Труфанова Л. Ф. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 8, с. 33—34, 1981.
10. Maevsky E. I., Gusev I. B., Rosenfeld A. S., Vdovichenko V. I., Maljuk J. I., Rotenberg Yu. S., Kondrashova M. N. 2nd Europ. Bioenerg. Conf., p. 637—638, Lyon, France, Abstracts, 1982.
11. Громова Е. А. Эмоциональная память и ее механизмы, М., Наука, 1980.
12. Семенова Т. П.—В кн.: Катеcholаминергические нейроны, с. 66—75, М., Наука, 1979.
13. Семенова Т. П., Третьяк Т. М., Грищенко Н. И., Смирнова Г. И. Журн. высш. нерв. деят-сти, т. 33, № 1, с. 163—165, 1983.
14. Lindvall O., Bjorklund A., Moore R. Yu., Stenevi U. Brain Res., v. 81, p. 325—331, 1974.
15. Буданцев А. Ю. Моноаминергические системы мозга, М., Наука, 1976.

Поступила 15. VIII 1985

УДК 577.612.015

ИЗУЧЕНИЕ СИНТЕЗА СИНАПТОСОМНЫХ ГЛИКОПРОТЕИНОВ ВЕНТРОМЕДИАЛЬНОГО ГИПЕРСТРИАТУМА ЦЫПЛЯТ В ПРОЦЕССЕ ИМПРИНТИНГА

СОЛОМОНΙΑ Р. О., МИКЕЛАДЗЕ Д. Г.

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

Успешное исследование тонких биохимических механизмов, лежащих в основе восприятия, консолидации и воспроизводства информации, во многом зависит от знания точного местонахождения ней-

293

ронных ансамблей, ответственных за фиксацию памяти. Особый интерес представляет феномен импринтинга (запечатлевания)—своеобразной самой ранней формы образной долговременной памяти. Импринтинг проявляется в особой привязанности щенков или детенышей после рождения к первому движущемуся предмету и следовании за ним [1]. С помощью мультисциплинарного подхода (авторадиография с использованием [^{14}C]-2-дезоксиглюкозы, [^3H]-урацила, повреждение разных участков головного мозга и др.) была показана ведущая роль определенного локуса вентромедиального гиперстриатума (ВМГ)—локуса импринтинга—при формировании этого вида памяти [2—4]. ВМГ является составной частью Wulst, что по современным данным, представляет собой аналог зрительной коры млекопитающих [5].

Синаптическое ремоделирование считается одной из основных клеточных реакций, происходящих при консолидации следов долговременной памяти [6]. Большинство синаптических белков представляет собой гликопротеины [7], которым отводится ведущая роль в детерминации и регуляции эффективности синаптических контактов [8]. Удобным предшествующим для изучения биосинтеза гликопротеинов является L-[^3H]-фукоза, так как она не конвертируется в другие сахара и не представляет собой значительную составную часть гликолипидов и мукополисахаридов [9, 10]. Целью настоящей работы являлось изучение сдвигов в синтезе гликопротеинов (изменение включения [^3H]-фукозы) в синаптосомной фракции ВМГ цыплят в процессе импринтинга.

Эксперименты проводили на цыплятах породы «белый леггорн». За день до вылупления яйца изолировали в отдельные коробки для устранения неспецифических побочных раздражений. Цыплят импринтировали в сенситивном периоде через 17—20 ч после вылупления в аппарате Гесса [1]. Импринт-объектом служил красный полиэтиленовый цилиндр диаметром 9,6 см, высотой 14 см, с лампой мощностью 25 вт. Световой прибор вращался на маневре по кругу с радиусом 60 см. Экспозиция импринт-объекта продолжалась 15—20 мин, за это время цыпленок пробежал 15—20 м. Контролем служили цыплята, которые за этот же период времени освещались диффузным светом.

До введения L-[^3H]-фукозу (29 Ки/ммоль, «Amersham», Англия) унаривали и растворяли в 0,9%-ном NaCl, так что каждый мкл содержал 4 мКи радиоактивности. [^3H]-фукозу по 1 мкл вводили интракраниально микроинжектором фирмы «Hamilton» (США) в каждое полушарие. Продолжительность пульсового введения во всех случаях составляла 60 мин. После декантации проводили монолатеральную экстирпацию медиальной части ВМГ и замораживали фракции в жидком азоте.

Синаптосомы выделяли методом Dodd и соавт. [11]. Полученный осадок растворяли в 10%-ном ДДС-Na при 37°. Белок определяли по Lowry [12].

Определение включенной радиоактивности в фракции синаптосом проводили следующим образом: к 5 мкл образца добавляли 100 мкл раствора бычьего сывороточного альбумина (1 мг/мл) и 1 мл 10%-ной трихлоруксусной кислоты (ТХУ), центрифугировали, осадок промывали еще два раза 10%-ной ТХУ. Полученный осадок растворяли в 0,5 мл 1%-ном ДДС-Na при 60° и вносили в диоксановую сцинтилляционную смесь. Радиоактивность подсчитывали с учетом тушения по специальной программе на жидкостном сцинтилляционном спектрометре «Intertechnique SL-400», Франция. Результаты пересчитывали на dpm/мг белка.

В каждом отдельном случае эксперимент проводили с тремя цыплятами. Число

таких опытов на каждой отдельной временной точке было равно пяти. Результаты обрабатывали статистическим методом неравноточных измерений. Достоверность различия и уровень значимости определяли по распределению Стьюдента для малых выборок. Во всех случаях $p < 0,01$.

На рисунке представлены данные о включении $[^3\text{H}]$ -фукозы во фракцию синаптических мембран ВМГ обученных и контрольных цыплят в процессе импринтинга. Установлено, что в период времени 0—1 ч ВМГ обоих полушарий контрольных цыплят, а также ВМГ левого полушария при импринтинге не отличаются друг от друга по включению $[^3\text{H}]$ -фукозы, в то время как количество включенной $[^3\text{H}]$ -фукозы в ВМГ правого полушария подопытных цыплят превосходит контрольные величины на 106—110%.

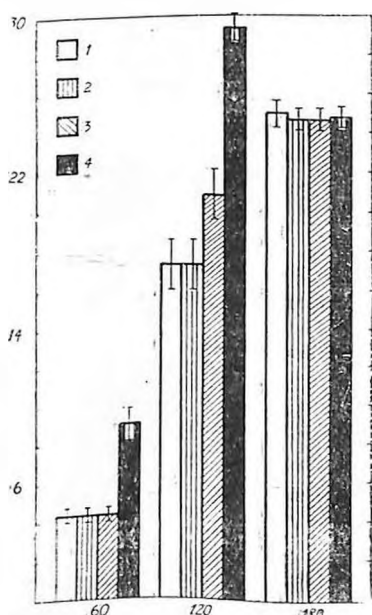


Рис. Изменение включения ^3H -фукозы в синаптических фракциях ВМГ контрольных и импринтированных цыплят в зависимости от времени после импринтинга. 1—синаптическая фракция ВМГ левого полушария (контроль), 2—синаптическая фракция ВМГ правого полушария (контроль), 3—синаптическая фракция левого полушария (эксперимент), 4—синаптическая фракция правого полушария (эксперимент)

Через 1—2 ч после импринтинга во всех четырех вариантах отмечается повышение синтеза гликопротеинов. При этом наблюдается функциональная асимметрия полушарий головного мозга цыплят, которая проявляется в том, что ВМГ правого полушария реагирует на импринтинг значительно сильнее по сравнению с левым. Через 2—3 ч после импринтинга практически вся разница по включению $[^3\text{H}]$ -фукозы между правым и левым полушарием экспериментальных и контрольных цыплят элиминируется.

Увеличение включения $[^3\text{H}]$ -фукозы показано на разных моделях обучения и памяти [13—15]. Несмотря на преимущественно синаптическую локализацию гликопротеинов, во всех цитируемых работах исследования проводили на ТХУ осажденных фракций клеточных го-

могенатов. Настоящее исследование является первой попыткой идентифицировать изменения в биосинтезе гликопротеинов на специфических для мозга структурах—синапсах.

Известно, что гликопротеинам отводится ведущая роль в организации синапсов [6, 8]. Исходя из этого факта, наши данные согласуются с литературными, свидетельствующими о преобладании для зоны синаптических контактов после импринтирования в правом ВМГ по сравнению с левым [7]. Более быстрое и сильное реагирование ВМГ правого полушария в процессе импринтинга наблюдалось также в случае холинорецептора мускаринового типа [8] и активности АХЭ. Проведенные исследования показали, что через 1—2 ч после импринтинга и в ВМГ левого полушария синтез гликопротеинов превосходит контрольный уровень. Поскольку повышенному синтезу гликопротеинов отводится ведущая и обязательная роль в консолидации следов долговременной памяти, можно предположить, что окончательная запись энграммы памяти импринтинга происходит в течение 2 ч после обучения.

SYNAPTOSOMAL GLYCOPROTEIN SYNTHESIS IN CHICKEN MEDIAL VENTRAL HYPERSTRIATUM DURING IMPRINTING

SOLOMONIA R. O., MIKELADZE D. G.

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

The incorporation of ^3H -fucose in the synaptosomal fraction of chick medial ventral hyperstriatum (MVH) during imprinting was studied. In one hour the synthesis of synaptosomal glycoproteins of right hemisphere MVH exceeds that in the contralateral region as well as in control chickens by 106—110%. Between the period of 1 to 2 hr the incorporation of ^3H -fucose in right hemisphere MVH of experimental group is higher than in the corresponding control group and in the left hemisphere by 70% and 43% respectively, in MVH of the left hemisphere this time exceeds the control level by 20%. During the period of 2—3 hr after imprinting the difference between the hemispheres MVH of experimental and control chicken is eliminated.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Понугаева А. Г. Импринтинг (под ред. А. Д. Слонина), Л., Наука, 1973.
2. Koshaka S., Takamatsu K., Aoki E., Tsukada Y. Brain Res., v. 172, p. 539—544, 1979.
3. Horn G., McCabe B. J. J. Physiol. (Gr. Brit.), v. 275, p. 2—3, 1978.
4. McCabe B. J., Cipolla-Neto J., Horn G., Bateson P. P. G. Exp. Brain Res., v. 48, p. 13—21, 1982.
5. Vischer A., Guenod M., Henke H. J. Neurochem., v. 38, p. 1372—1382, 1982.
6. Rose S. P. R. Neuroscience, v. 6, p. 811—821, 1981.

7. Kelly P. T., Cotman C. W. J. Biol. Chem., v. 252, p. 786—793, 1977.
8. Barondes S. H. In the Neurosciences; Second Study Program. (ed. Schmitt F. O.), p. 747—760, Rockefeller University Press, New-York, 1970.
9. Zats M., Barondes S. H. J. Neurochem., v. 34, p. 157—163, 1970.
10. Dutton G., R. Barondes S. H. J. Neurochem., v. 17, p. 913—920, 1970.
11. Dodd P. R., Hardy J. A., Oakley A. E., Edwardson J. A., Perry E. K., Delaunoy J. P. Brain Res., v. 226, p. 117—118, 1981.
12. Markuelli M. A., Hass S. W. Anal. Biochem., v. 87, p. 206—210, 1983.
13. Sukumar R., Rose S. R. P., Burgoune R. D. J. Neurochem., v. 34, p. 1000—1007, 1980.
14. Popov N., Schlzeck S., Pohle W., Matthies H. Neuroscience, v. 52, p. 161—167, 1980.
15. Rose S. P. R., Harding S. Neuroscience, v. 12, p. 663—667, 1984.

Поступила 12. II 1986

УДК 577.15

ВЛИЯНИЕ НЕЙРОГОРМОНОВ «К» и «С» НА АКТИВНОСТЬ АРГИНАЗЫ МОЗГА И ПЕЧЕНИ КРЫС

ГАЛОЯН К. А., *ДАВТЯН М. А., СРАПИОНЯН Р. М.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван
*Ереванский государственный университет

В магнoцеллюлярных ядрах гипоталамуса вырабатываются пептидные нейрогормоны, оказывающие регулирующее влияние на сердечную деятельность [1]. Было установлено, что помимо своего коронаторасширяющего действия указанные соединения влияют на обменные процессы клетки. В частности, нейрогормон «С» ускоряет распад гликогена, повышает активность фосфорилазы в ряде органов [2], способствует накоплению лактата [3], ингибирует фосфодиэстеразу cAMP [4] и т. д. Несмотря на интенсивное изучение этих гормонов до настоящего времени не было исследовано их влияние на азотистый обмен, в частности на орнитинный цикл. Представляло интерес изучение действия гипоталамических нейрогормонов на один из важных ферментов мочевинообразования—аргиназу. Этот фермент имеет широкое распространение, однако в основном содержится в печени, в меньшей степени в почках, мозгу, молочной железе.

Опыты проводили на крысах линии Wistar массой 150—250 г. Животным наркотизированным внутрибрюшинным введением нембутала, вводили различные дозы очищенных препаратов нейрогормонов «К» и «С» [5] в яремную вену. Контрольным крысам вводили физиологический раствор. Дозировку нейрогормона «С» осуществляли ранее разработанным методом [4]. За единицу активности нейрогормона «С» принимали то количество препарата, которое ингибировало 1 мЕ ФДЭ cAMP гомогената мозга крыс в мин при pH 7.5. Использовали 5—304 мЕ нейрогормона «С». Стан-

лартизацию препарата нейрого르몬а «К» проводили на основе его коронарорасширяющего действия в опытах на кошках в условиях *in situ*. За единицу биологической активности нейрого르몬а «К» принимали количество препарата, увеличивавшее объем крови, оттекающей из венозных сосудов сердца на 100%. В опытах использовали 0,06—0,24 доз биологической активности нейрого르몬а «К».

Животных декапитуировали, быстро извлекали головной мозг и печень, далее мозг гомогенизировали в 0,4 М глициновом буфере pH 9, а печень—в 0,1 М растворе KCl, pH 7,4 (1:10). Инкубацию 20%-ного гомогената мозга и печени проводили при 37° в течение 60 и 20 мин соответственно при постоянном встряхивании. Инкубационная смесь для определения активности фермента содержала 0,5 мл гомогената, 5 мМ L-аргинина, 5 мМ $MnCl_2$, 0,4 М глициновый буфер, pH 9 (аргиназа мозга), а для определения активности аргиназы печени (АП) добавляли 0,2 М глициновый буфер pH 9,5. Общий объем пробы равен 3,6 мл. Реакцию останавливали добавлением ТХУ, в экстракте определяли количество образовавшейся мочевины методом Archibald [6] с использованием набора реактивов для стандартных исследований биологических жидкостей («Ляхема», СССР).

Опыты по изучению влияния нейрого르몬а «К» на аргиназу мозга (АМ) проводили в условиях *in vivo* и *in vitro* (табл. 1). Через 5—15 мин после введения нейрого르몬а «К» (0,12—0,24 единиц биологической активности) наблюдается очень незначительное ингибирование (10%), через 15 мин—25%, однако через 30—40 мин оно достигает 40%, а к 60-й мин значительно ослабевает (20%). В условиях *in vitro* АМ под воздействием нейрого르몬а «К» ингибируется на 26%. Результаты экспериментов, проведенных *in vivo*, показали, что внутривенное введение нейрого르몬а «К» в дозе 0,12 единиц биологической активности через 30 мин вызывает ингибирование АП на 61%, а через 40 мин—на 69% (табл. 1). Через 60 мин после введения нейрого르몬а «К» ингибирующий эффект ослабевает до 33%. При введении вдвое больших концентраций (0,24 единиц биологической активности) через 30 мин после введения ингибирующий эффект намного ниже, чем при введении предыдущей концентрации—15% ингибирования, а через 40 мин—25%, но к 60-й мин ингибирующее влияние ослабевает и составляет 7%. Наблюдаемый эффект понижения активности фермента при внутривенном введении нейрого르몬а обусловлен либо репрессией биосинтеза фермента, либо подавлением его активности. Результаты последующих экспериментов, проведенных в условиях *in vitro*, доказывают возможность непосредственного ингибирования активности АП нейрого르몬ом «К» (табл. 1).

Полученные данные показывают, что нейрого르몬 «К» в дозах 0,12 и 0,24 единиц биологической активности *in vitro* достоверно ингибирует АП на 28% *in vitro*. Пороговой дозой является 0,12 единиц биологической активности нейрого르몬а «К».

В следующей серии экспериментов изучали действие нейрого르몬а «С» на активность АМ крыс. Показано, что активность АМ значительно ингибируется под воздействием нейрого르몬а «С» в условиях *in vivo*, однако в этом случае пороговой концентрацией является 228 мЕ нейрого르몬а «С» (табл. 2). Через 5 мин после введения этой дозы гормона АМ ингибируется на 26%, через 15 мин—на 38%, затем к

30 мин ингибирование усиливается и достигает 62%, но к 60-й мине ингибирующий эффект понижается до 35%. Эта же концентрация в условиях *in vitro* ингибирует АМ крыс на 33%. В условиях *in vivo*

Таблица 1

Влияние нейrogормона «К» на аргиназную активность мозга и печени крыс в условиях *in vivo* и *in vitro*

Время воздействия (мин)	Доза вводимого образца (в биологических дозах активности)					
	0,12—0,24		0,12		0,24	
	м о з г		п е ч е н ь			
	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
<i>in vivo</i>						
5	1,82±0,01 (5)	1,63±0,02* (5)	850±30 (4)	811±25* (4)	739±20 (4)	745±15* (4)
15	1,78±0,02 (6)	1,31±0,03* (6)	680±25 (4)	545±14* (4)	765±25 (4)	754±15* (5)
30	1,77±0,33 (4)	1,06±0,05* (4)	841±38 (4)	332±12* (5)	770±20 (5)	654±15* (5)
40	1,75±0,01 (4)	1,05±0,04* (4)	680±20 (5)	211±14 (5)	757±20 (5)	566±11 (5)
60	1,80±0,02 (4)	1,44±0,02* (4)	682±20 (4)	478±24 (5)	734±30 (6)	680±18 (5)
<i>in vitro</i>	1,85±0,01 (5)	1,37±0,02 (5)	576±16 (3)	416±18 (5)	600±15 (3)	432±15 (5)

Примечание. Здесь и в табл. 2 * $p < 0,001$. В скобках указано количество опытов.

(табл. 2) нейrogормон «С» в дозе 76 мЕ, являющейся пороговой, в отличие от нейrogормона «К» проявляет свое действие через 5 мин после введения, при этом ингибирование достигает 41%. Наибольшее снижение ферментативной активности наблюдается через 15 мин после введения нейrogормона «С»—61% ингибирования; затем ингибирующий эффект начинает ослабевать и через 30 мин достигает 46%, а к 60-й мин ингибирование составляет 22%.

Установлено, что активность АП через 5 мин после введения 114 мЕ гормона ингибируется на 46%, через 15 мин—на 62%, но к 30-й мин, как и в предыдущем случае, ингибирующий эффект начинает ослабевать (56%), а к 60-й мин ингибирующий эффект снижается до 37%. При повышении концентрации вводимого гормона (304 мЕ) наблюдается понижение ингибирующего влияния по сравнению с предыдущими концентрациями; через 5 мин после введения—30%, через 15 мин—50%, через 30 мин—43%, а к 60-й мин—16% ингибирования. Как и в случае нейrogормона «К», результаты исследований в условиях *in vitro* свидетельствуют о возможном непосредственном влиянии нейrogормона «С» на АП. В условиях *in vitro* 76 мЕ гормона подавляет активность фермента на 34%, 114 мЕ—на 38%, 190 мЕ—на 34%, 304 мЕ не оказывают ингибирующего воздействия.

Таблица 2

Влияние нейротермона «С» на аргиназную активность мозга и печени крыс в условиях *in vivo* и *in vitro* мкмоль/г свежей ткани/мин

Доза вводимого образца (в единицах активности ФДЭ сАМР)								
Время воздей- ствия (мин)	228 мЕ		76 мЕ		114-190 мЕ		304 мЕ	
	м о з г		п е ч е н ь					
	in vivo	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль
5	1,73±0,02 (4)	1,28±0,02 (4)	681±20 (4)	400±6 (4)	737±17 (7)	399±18 (7)	773±12 (6)	541±25 (6)
15	1,76±0,01 (5)	1,19±0,03 (5)	734±23 (7)	287±5 (7)	734±10 (4)	282±6 (4)	651±30 (5)	326±25 (5)
30	1,60±0,01 (4)	0,63±0,01 (4)	697±26 (8)	373±16 (8)	689±36 (5)	300±10 (5)	630±26 (5)	357±9 (6)
60	1,73±0,03 (5)	1,13±0,16 (5)	561±6 (5)	480±10 (5)	699±11 (5)	438±5 (5)	594±7 (5)	499±10 (5)
in vitro	228 мЕ		76 мЕ		114 мЕ		190 мЕ	
	1,15±0,01 (5)	0,76±0,02 (5)	643±36 (5)	426±26 (5)	757±28 (5)	467±24 (5)	632±50 (5)	417±7 (6)

Резюмируя полученные данные, можно заключить о непосредственном влиянии нейрогормонов «К» и «С» как на уреотелическую, так и на неуреотелическую аргиназы крыс, что представляет определенный интерес, поскольку имеющиеся в литературе данные о воздействии некоторых гормонов на активность аргиназы свидетельствуют лишь об изменении белкового анаболизма или катаболизма [7, 8]. Дальнейшие исследования позволят объяснить механизм действия указанных нейрогормонов на активность аргиназы.

EFFECT OF NEUROHORMONES «K» AND «C» ON ARGINASE ACTIVITY IN RAT BRAIN AND LIVER

GALOYAN K. A., DAVTYAN M. A., SRAPIONYAN R. M.

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

Both *in vitro* and *in vivo* experiments point to the inhibitory effect of neurohormones «K» and «C» on arginase activity in rat brain and liver. Thus, it's another evidence of these neurohormones' action on the key enzymes of cell metabolism.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Галоян А. А. Некоторые проблемы биохимии гипоталамической регуляции, Ереван Айастан, 1965.
2. Парсаданян Г. К., Абелян Ж. Г., Галоян А. А. Докл. АН АрмССР, т. 64, № 3, с. 164—167, 1978.
3. Галоян А. А., Алексанян С. С. Докл. АН АрмССР, т. 58, № 3, с. 183—187, 1974.
4. Гурвиц Б. Я., Сарибекян Г. А., Сомова Е. С., Галоян А. А. Докл. АН АрмССР, т. 66, № 3, с. 290—295, 1978.
5. Срапионян Р. М., Саакян С. А., Саакян Ф. М., Галоян А. А. Нейрохимия, т. 2, № 3, с. 263—271, 1983.
6. Archibald R. M., J. Biol. Chem., v. 156, p. 121—142, 1944.
7. Kasbekar D. K., Lavata W. V., Regr D. V., Sreenivasan A. Biochem. J., v. 72, p. 374—383, 1959.
8. Асланян Г. А., Давтян М. А. Биол. журн. Армении, т. 29, № 8, с. 8—13, 1976.

Поступила 7. 11 1986



УДК 543.545:547.96:591.481.1

Методы исследований

ДВУМЕРНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ ВОДОРАСТВОРИМЫХ
БЕЛКОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА СОБАКИ

ВОЛОЩУК С. Г., АКУЛОВ Н. Н., ЛАПТЕВ А. В., ДЕДУШКИН В. П.

Всесоюзный научный центр психического здоровья АМН СССР, Москва

Метод двумерного электрофореза (ЭФ), предложенный O'Farrell [1], широко используется в настоящее время для изучения белкового состава бактерий [2], биологических жидкостей, отдельных клеток и тканей человека и животных [3—6].

Существует множество вариантов двумерного ЭФ. Это объясняется тем, что для решения конкретных задач требуется определенный диапазон pH при изоэлектрическом фокусировании, определенные условия ЭФ в ПААГ и способы окрашивания [5—8].

В настоящей работе описана методика двумерного ЭФ, применяемая для анализа водорастворимых белков мозга собаки, и проведено сравнительное изучение белковых компонентов коры больших полушарий, коры мозжечка и хвостатого ядра.

Использовали ткань мозга пяти взрослых беспородных собак от 7,0 до 16 кг сразу после тrenaнкции черепа, проведенной под тиопенталовым наркозом.

Ткань гомогенизировали в соотношении 1:5 (вес/объем) 0,005 М натрий-фосфатном буфере (pH 7,0) ножным гомогенизатором «Virtis—45» (США). Полученный гомогенат центрифугировали при 100000g в течение 1 ч при 4° в ультрацентрифуге «Beckman L8—55» (США). Супернатант лиофилизировали и хранили при —20°.

Двумерный ЭФ выполняли по методу O'Farrell [1] со следующими модификациями: а—для приготовления образца лиофилизат растворяли в диссоциирующем растворе, содержащем 9 М мочевины, 1%-ный тритон X-100 (вес/объем), 1%-ный ионтигтергент 3—08 (вес/объем), 2%-ные амфолины (объем/объем), pH 3,5—10, pH 2,5—5, pH 4—6, pH 5—7 в соотношении 3:3:1:3 и 1 мМ дитиотреитол. Концентрация белка в образце составляла 5 мг/мл; б—ПААГ для ЭФ в 1-м направлении содержал 8 М мочевины, а тритон X-100, ионтигтергент 3—08 и амфолины—как в диссоциирующем растворе; в—ступенчатый ЭФ во 2-м направлении проводили в пластине размером 120×140×1,5 мм с 10 или 12%-ным разделяющим ПААГ.

Для определения величины M_r белков одновременно с фракционированием образца во 2-м направлении проводили ЭФ набора стандартных белков.

После ЭФ пластины окрашивали азотнокислым серебром [10]. Продолжительность рекомендуемых операций увеличивали с 30 до 45 мин, учитывая толщину пластины ПЛАГ.

ЭФ 15-и образцов (3 зоны мозга 5-и животных) проводили не менее двух раз. Электрофореграммы оценивали визуально. Индивидуальные особенности белкового состава мозга животных исключали путем сравнения воспроизводимых лент нескольких электрофореграмм одного образца и образцов, полученных от разных животных.

Были использованы следующие реактивы: акриламид, бис-акриламид, дитиотреитол («Seiva», ФРГ), персульфат аммония, трис, ДДС-Na, тритон X-100 («Merck», ФРГ), 2-меркаптоэтанол («Fluka», ФРГ), цинтергент 3—08 («Calbiochem-Behring Corp.», США), амфолины, агароза («LKB», Швеция), набор стандартных белков («Pharmacia», Швеция), глицин, глутаровый альдегид, ТЕМЕД («Reanal», Венгрия), остальные—«Союзхимреактив», СССР.

Все растворы готовили на деионизированной воде.

Для оптимизации анализа водорастворимых белков мозга собаки исследовали влияние различных интервалов pH, концентрации ПЛАГ для 2-го направления и способов окрашивания на общее число индивидуальных белковых компонентов.

Было показано, что высокие концентрации кислых амфолинов (pH 2,5—4 и 3,5—5) приводят к существенному уменьшению числа выявляемых белков и общему ухудшению их разделения за счет незначительного улучшения разделения белков с pI около 4.0. Кроме того, из-за практических трудностей получения стандартного градиента концентрации ПЛАГ использование во 2-м направлении градиентных гелей дает искажение фронта при ЭФ. В пластинках с 10%-ным ПЛАГ белковые пятна распределялись между верхней и нижней половинами геля неравномерно.

Наиболее удовлетворительные результаты и по числу разделившихся компонентов, и по воспроизводимости общей картины разделения наблюдали при изоэлектрическом фокусировании в диапазоне pH 4,3—7,3 и ЭФ в 12%-ном ПЛАГ во 2-м направлении (рис. 1).

Использование дитиотреитола вместо 2-меркаптоэтанолa после 1-го направления оказалось нецелесообразным, поскольку в таком варианте после окрашивания азотнокислым серебром появляется интенсивная горизонтальная полоса в области M_r около 20 кД и происходит искажение распределения белков этой зоны. Аналогичная замена в диссоциирующем растворе не влияет на распределение белковых фракций. В то же время слабоокрашенные горизонтальные полосы в области M_r 65 кД остаются в любом варианте. Горизонтальные полосы этой зоны, как правило, не мешают оценке результатов ЭФ и отмечены в работах других авторов [11]. Природа возникновения этих полос до сих пор остается неизвестной.

Разработанные нами условия ЭФ и окраски дают стандартные и хорошо воспроизводимые картины разделения. Общее содержание наблюдаемых индивидуальных белковых фракций—около 400.

Было проведено сравнительное исследование белковых компонентов некоторых отделов мозга собаки. На рис. 2 приведены два фраг-

мента двумерных электрофореграмм водорастворимых белков лобной коры полушарий, коры мозжечка и хвостатого ядра мозга.

Большинство белковых компонентов коры мозжечка совпадает с белками коры полушарий. Однако белок мозжечка с pI 5,0 и M_r 28 кД (5,0/28 К), выявленный на всех белковых картах этого отдела мозга, отсутствует на большинстве электрофореграмм других отделов, а на некоторых наблюдается в виде очень мелкого пятна. Возможно также, что это совершенно другой белок со сходными координатами. С другой стороны, белок с координатами 6,0/47К, присутствующий на всех белковых картах коры больших полушарий и хвостатого ядра, не обнаружен ни на одной из электрофореграмм мозжечка.

Белковая карта хвостатого ядра по составу близка к карте коры больших полушарий. Выявить достоверные количественные различия отдельных пятен путем визуальной оценки не представлялось возможным.

Можно предположить, что обнаруженные нами особенности в белковых картах коры больших полушарий, коры мозжечка и хвостатого ядра собаки являются следствием различий в нейронном составе этих отделов мозга.

Так, группа авторов описала белок, обнаруженный в цитозольной фракции мозжечка кролика [12—14], являющийся эндогенным субстратом GMP-зависимой протениназы, с M_r около 23 кД и pI в интервале 5,2—6,0 (три белковых пятна). Было установлено, что основное количество фермента и его субстрата находится в клетках Пуркинье, которые характерны именно для этого отдела мозга. Возможно, что обнаруженный нами характерный белок мозжечка собаки аналогичен белку из мозжечка кролика.

Подобные белки, характерные для различных зон мозга, могут иметь отношение к специфическим функциям этих зон и являться своеобразными структурными и функциональными маркерами. Изучение таких белков имеет большое значение для исследования как нормальных, так и патологических процессов, происходящих в мозгу.

TWO-DIMENSIONAL ELECTROPHORESIS OF WATER-SOLUBLE DOG BRAIN PROTEINS

VOLOSHCHUK S. G., AKULOV I. N., LAPTEV A. V., DEMUSHKIN V. P.

All-Union Research Center of Mental Health, USSR Acad. Med. Sci., Moscow

A modification of the classical two-dimensional electrophoresis method (according to O'Farrell) has been developed. The composition of the dissociating solution and of the first dimension polyacrylamide gel (PAAG) have been changed. Electrophoresis in the second dimension was carried out in the 12% PAAG. Electrophoregrams were stained with silver. The conditions chosen made it possible to investigate proteins with molecular weight of 14—100 kDa in the pH range 4.3—7.3. The

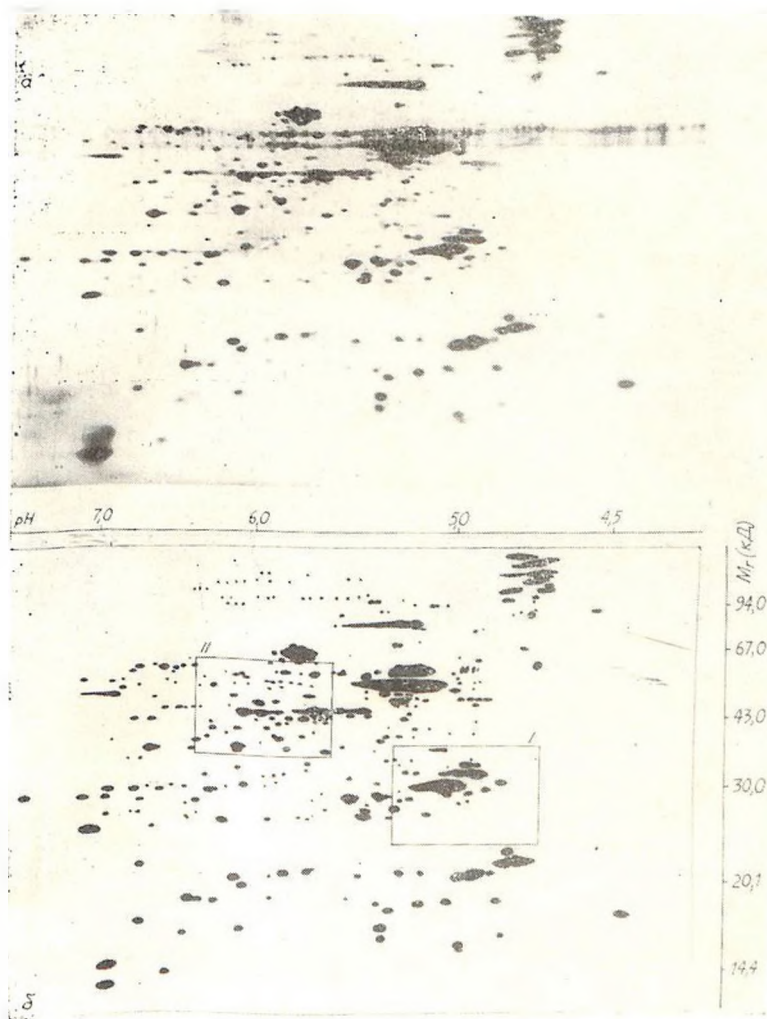


Рис. 1. Электрофоретграмма (а) и схема белковой карты (б) лобной коры больших полушарий мозга собаки. I и II—вариабельные участки, показанные на рис. 2

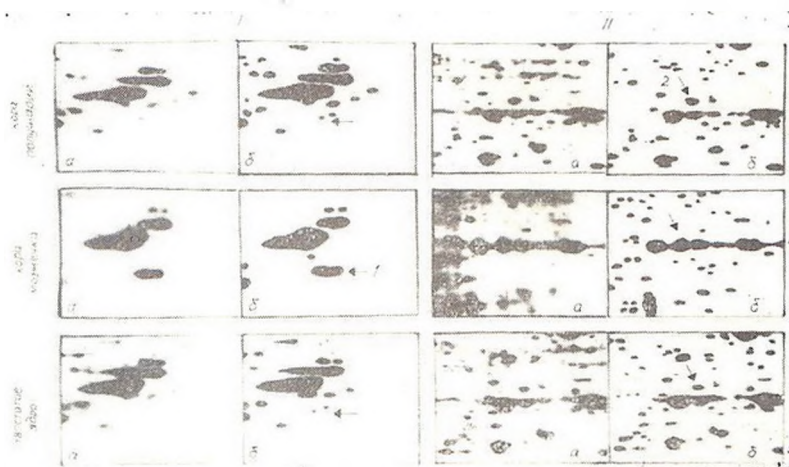


Рис. 2. Варибельные участки белковых карт лобной коры больших полушарий, коры мозжечка и хвостатого ядра мозга собаки. а—электрофореграмма, б—схема, 1 и II—соответствуют обозначению на рис. 1: 1—белок с координатами 5.0/28 кД, 2—белок с координатами 6.0/47 кД

comparative analysis of the protein maps of the frontal cortex of brain hemispheres, cerebellar cortex and n. caudatus was carried out. The protein of cerebellum with pI 5.0 and molecular weight 28 kDa (5.0/28K) was found to be absent in the majority of other brain regions. Another protein with 6.0/47K coordinates, discovered in the protein maps of the frontal cortex and n. caudatus, is absent in the samples of the cerebellar cortex. Electrophoregrams of the hemispheres cortex and of the n. caudatus are similar.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. O'Farrell P. H. J. Biol. Chem., v. 250, № 10, p. 4007—4021, 1975.
2. Bloch P. L., Phillips T. A., Neidhardt F. C. J. Bacteriol., v. 141, p. 1409—1420, 1950.
3. Manabe T., Hayama E., Okuyama T. Clin. Chem., v. 28, № 4, p. 824—827, 1982.
4. Anderson N. L., Giometti C. S., Gemmell M. A., Nance S. L., Anderson N. G. Clin. Chem., v. 28, № 4, p. 1084—1092, 1982.
5. Comings D. E. Clin. Chem., v. 28, № 4, p. 782—789, 1982.
6. Henslee J. G., Srere P. A. J. Biol. Chem., v. 254, № 12, p. 5488—5497, 1979.
7. O'Farrell P. Z., Goodman H. M., O'Farrell P. H. Cell, v. 12, p. 1133—1142, 1977.
8. Sammons D. W., Adams L. D., Nishizawa E. E. Electrophoresis, v. 2, p. 125—141, 1981.
9. Laemmli U. K. Nature, v. 227, p. 680—685, 1970.
10. Morrissey J. H. Anal. Biochem., v. 117, p. 307—310, 1981.
11. Merril C. R., Goldman D. Clin. Chem., v. 28, № 4, p. 1015—1020, 1982.
12. Schlichter D. J., Casnellie J. E., Greengard P. Nature, v. 273, p. 61—62, 1978.
13. Schlichter D. J., Detre J. A., Aswad D. W., Chehrizi B., Greengard P. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci., v. 77, № 9, p. 5537—5541, 1980.
14. Aswad D. W., Greengard P. J. Biol. Chem., v. 256, № 7, p. 3487—3493, 1981.

Поступила 7. VIII 1985



ОБЗОРЫ

УДК 577.15:024

МЕТАБОЛИЗМ ФОСФОИНОЗИТИДОВ И
НЕЙРОГУМОРАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ

ДОЛГО-САБУРОВ В. Б.

Институт токсикологии МЗ СССР, Ленинград

В обзоре обобщены литературные данные о роли метаболизма фосфоинозитидов в функционировании трансдуцирующих механизмов, сопряженных с воздействием нейромедиаторов на хеморепрессивные структуры.

Обсужден вопрос о вкладе продуктов распада фосфоинозитидов—диацилглицерина и инозит-1,4,5-трифосфата, накапливающихся в ответ на воздействие внешнего сигнала, в процессы трансинаптической регуляции биохимических систем иннервируемых клеток. Рассмотрены некоторые стороны взаимоотношения этих сигнальных молекул с другими системами «вторых мессенджеров» при реализации регулярных эффектов нервной импульсации.

Одним из принципиально важных аспектов проблемы регуляции биохимических систем клетки является анализ влияния НС на различные стороны обмена веществ. Эта проблема самым тесным образом сопряжена с концепцией трофической функции НС, решению которой посвящены классические исследования И. П. Павлова, Л. А. Орбели и А. Д. Сперанского. Успехи развития этой концепции в наше время обусловлены привлечением биохимических, фармакологических и молекулярно-биологических подходов. Существенным вкладом в теорию адаптивно-трофической функции НС является разработка представлений о трансинаптической регуляции метаболических механизмов клетки и их нейромедиаторном контроле.

В настоящее время достаточно хорошо известны структура самых различных нейромедиаторов, особенности их взаимодействия с соответствующими рецепторами, локализация последних в органах и тканях, а также сдвиги в состоянии обмена веществ в клетках-мишенях, развивающиеся в ответ на нервный импульс. Вместе с тем, недостаточно разработаны обобщенные представления о путях передачи информации с активной поверхности рецепторов после ее взаимодействия со специфическими лигандами к исполнительным биохимическим механизмам. Речь идет о системах, осуществляющих «пе-

перевод» с языка нервной импульсации на язык биохимических реакций аналогично тому, как в клетке осуществляется «перевод» с языка нуклеотидных триплетов ДНК на язык аминокислотной последовательности синтезируемого белка. Нам представляется удачным использование термина «системы трансинаптической трансдукции» («transducing system»), подчеркивающего их вклад в усиление и преобразование сигнала на пути между рецепторами плазматической мембраны и механизмами обмена веществ.

Существенный вклад в эту проблему был сделан в 60-ые годы Е. Сазерлендом, сформулировавшим представление о роли циклических нуклеотидов как «вторых мессенджеров», накапливающихся в ответ на нейромедиаторный или гормональный стимул («первый мессенджер») и осуществляющих связь между рецепторами и исполнительными системами. Однако циклическими нуклеотидами, как это становится все более понятным, не исчерпываются возможности трансинаптической регуляции. Чрезвычайно важную роль в этих процессах играют ионные механизмы. Не вызывает, в частности, сомнений значение ионов кальция в передаче нервного сигнала.

В последние годы все возрастающее внимание привлекает участие фосфоинозитидов (ФИ) плазматических мембран иннервируемых клеток в реализации получаемой рецепторным аппаратом информации. Многие десятилетия фосфолипиды, в том числе и ФИ, рассматривались только как структурные компоненты клеток и лишь относительно недавно стало ясно, что они являются важными участниками системы «вторых мессенджеров». Присутствие в мембранах фосфолипидов этого класса в значительной мере определяет возможность выполнения мембранными структурами контроля за транспортом ионов, ориентацию векторially направленных ферментных белков, передачу внутрь клетки поступающей трансинаптической информации в виде нервных и гормональных сигналов.

Преобладающим ФИ мембран эукариотических клеток является фосфатидилинозит (монофосфоинозитид), на долю которого приходится до 12% общего содержания фосфолипидов [1, 2]. В нервной и в некоторых других тканях фосфатидилинозит может подвергаться фосфорилированию в фосфокиназной реакции с образованием фосфатидилинозит-4-фосфата и фосфатидилинозит-4,5-дифосфата. Вопросы, касающиеся структуры и метаболических превращений ФИ, достаточно подробно изложены в ряде обзоров [3—10]. Структурные формулы ФИ и их метаболитов представлены на рис. 1.

Не касаясь специально вопросов обмена ФИ и его энзимологии, следует заметить, что присутствующие в мембранах киназы, осуществляющие фосфорилирование монофосфоинозитида с образованием ди- и трифосфорилированных форм, а также специфические фосфоэстеразы (фосфатидилинозитфосфоэстераза, КФ 3. 1. 4. 10.), осуществляющие гидролиз полифосфоинозитидов с накоплением диацилглицерина (ДГ) и инозит-1, 4, 5-трифосфата (ИТ), относятся к достаточно распространенным и активным ферментам [11, 12].

Около 30 лет назад было обнаружено, что АХ увеличивает *in vitro* включение ^{32}P в фосфатидную кислоту и фосфатидилинозит срезыв поджелудочной железы [13—16]. Это увеличение сопровождалось снижением содержания в ткани фосфатидилинозита и накоплением фосфатидной кислоты и ДГ. Проведенные исследования позволили позднее выдвинуть концепцию, согласно которой первичной реакцией в цепи метаболических превращений ФИ в ответ на воздействие нейромедиаторов или гормонов является ферментативный гидролиз фосфатидилинозит-4, 5-дифосфата с образованием ИТ и ДГ. Последний, как оказалось, в дальнейшем участвует в ресинтезе фосфатидной кислоты и ФИ [5, 7, 10]. Именно эти два продукта распада полифосфоинозитидов—ИТ и ДГ и следует рассматривать как сигнальные молекулы, возникающие в результате взаимодействия агонистов с соответствующими рецепторами и, наряду с циклическими нуклеотидами, выполняющие роль «вторых мессенджеров».

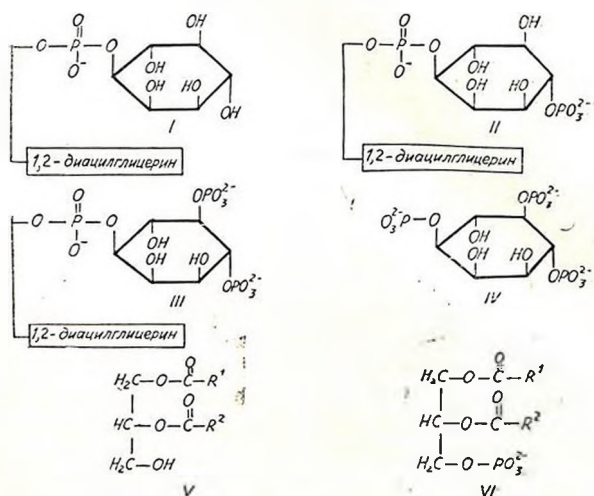


Рис. 1. Структура компонентов фосфоинозитидного цикла. I. Фосфатидилинозит; II. Фосфатидилинозит-4-фосфат; III. Фосфатидилинозит-4,5-дифосфат; IV. Инозит-1,4,5-трифосфат; V. Диацилглицерин; VI. Фосфатидная кислота

К числу агонистов, стимулирующих метаболизм мембранных ФИ, относят АХ [17, 18], норадреналин [19], гистамин [20], серотонин [21], а также ряд гормонов белковой природы (вещество Р, ангиотензин, панкреозимин, церулеин) и ростовых факторов [10]. Особенно подробно продемонстрирован вклад метаболизма ФИ в функционирование мускариночувствительных холинорецепторов, H_1 -рецепторов гистаминна и α_1 -адренорецепторов, то есть тех рецептивных структур, существенным моментом в деятельности которых является мо-

близация Ca^{2+} . В то же время следует иметь в виду, что сам по себе распад ФИ является процессом, не во всех случаях контролируемым изменениями концентрации Ca^{2+} [22, 23]. Достаточно напомнить, что Са-нонофор А23187 не стимулирует гидролиза. С другой стороны, для большинства биохимических систем показано, что в отсутствие Ca^{2+} ответ на воздействие агониста не развивается, хотя распад ФИ и имеет место. Важно подчеркнуть, что концентрационные зависимости насыщения рецептора агонистом и происходящего в результате этого распада ФИ совпадают [24]. Иными словами, приходится признать существование в клетках двух типов метаболизма ФИ: Ca^{2+} -зависимого и Ca^{2+} -независимого. К деятельности трансдуцирующих систем имеет отношение лишь Ca^{2+} -независимый распад ФИ, так как только он сопровождается накоплением информационно значимых сигнальных молекул—ИТ и ДГ.

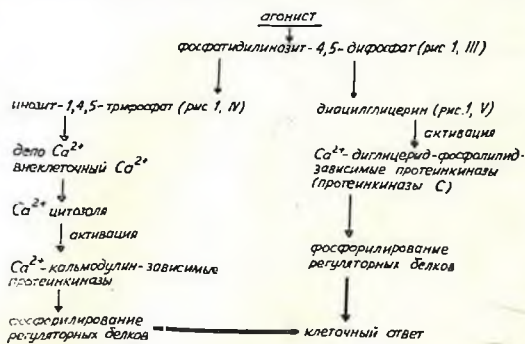


Рис. 2. Участие метаболитов фосфоинозитидов в регуляции биохимических систем клеток

Таким образом, следует считать достаточно обоснованным представление о том, что в результате взаимодействия группы рецепторов с соответствующими агонистами происходит распад фосфатидилинозит-4, 5-дифосфата с образованием ДГ и ИТ (рис. 2). Эти метаболиты удовлетворяют всем требованиям, предъявляемым к «вторым мессенджерам» — они быстро накапливаются в ответ на нейромедиаторный сигнал, активны в весьма малых концентрациях и быстро исчезают по мере прекращения действия стимула.

Michell, Kirk [5, 25] выдвинули гипотезу, в соответствии с которой ИТ играет принципиально важную роль в мобилизации Ca^{2+} то есть освобождения его из внутриклеточных депо и транспорте внутрь клетки. Уместно еще раз напомнить, что стимулируемый агонистами распад ФИ («фосфоинозитидный ответ» по Michell) сопряжен только с теми рецепторами, возбуждение которых сопровождается мобилизацией пониженого Ca^{2+} , то есть его накоплением в цитозоле. Это сопряжение достаточно специфично, например, из 4-х известных основных типов адренорецепторов (α_1 , α_2 , β_1 и β_2) оно характер-

но только для α_1 -типа, а из 2-х типов холинорецептора—только для мускариночувствительного, но не для никотиночувствительного.

Механизмы, обеспечивающие накопление Ca^{2+} в цитозоле под действием ИТ, во многом остаются не ясными. Вместе с тем, многочисленными экспериментами *in vitro* показано, что добавление к суспензии клеток ИТ вызывает освобождение Ca^{2+} из его депо в эндоплазматическом ретикулуме [26, 27]. Замена ИТ на инозит-1, 4-дифосфат, инозит-1-фосфат или инозит-1, 2-циклофосфат не сопровождалась мобилизацией Ca^{2+} [26].

Не исключено, что ИТ тормозит обратный захват Ca^{2+} и его секвестрацию в клетке или, напротив, стимулирует перемещение в цитозоль из депо с участием механизмов активного транспорта. Что же касается возможного вклада ИТ в повышение содержания Ca^{2+} в цитозоле клеток за счет поступления извне через плазматическую мембрану, то этот вопрос остается открытым. Высказываемые ранее предположения о том, что накопление внутриклеточного Ca^{2+} происходит в результате реализации ионофорного эффекта фосфатидной кислоты, образующейся, наряду с ИТ и ДГ, в процессе метаболизма ФИ при возбуждении рецепторов [28—30], более поздними экспериментами не подтвердились [31, 32]. Так или иначе, существование корреляции между накоплением в клетке ИТ в ответ на возбуждение хеморецептивных структур и мобилизацией Ca^{2+} является установленным фактом и подтверждением функционирования ИТ как участника сигнального каскада.

Как уже упоминалось, вторым продуктом стимулированного агонистами распада ФИ является ДГ (рис. 2). По-видимому, его основной функцией как «второго мессенджера» является активация протеинкиназы С, стимулирующей фосфорилирование ряда белков [33—35]. Обращает на себя внимание достаточно широкое распространение этого фермента у организмов, находящихся на различных ступенях эволюционной лестницы. В нервных клетках его активность наиболее высока. Активация протеинкиназы С представляется весьма сложным процессом, требующим для своего осуществления ионов кальция и фосфатидилсерина. Существенным этапом активации является отщепление от молекулы неактивного фермента пептида с M_r 26 кД под действием Ca^{2+} -зависимой тирозовой протеазы с образованием конечного продукта с M_r 51 кД. Роль же ДГ сводится, по-видимому, к формированию активного комплекса протеинкиназы С с фосфолипидом и Ca^{2+} .

Протеинкиназа С характеризуется широкой субстратной специфичностью. Объектом ее воздействия являются как мембранные белки, так и белки цитозоля, в особенности в ткани мозга. В ряде случаев удастся продемонстрировать существование общих субстратов для протеинкиназы С и сАМР-зависимых протеинкиназ, хотя участки фосфорилирования неидентичны [36].

Мы намеренно оставляем в стороне вопрос о не имеющих отно-

шения к метаболизму ФИ мембраносвязанной и растворимой форм. Ca^{2+} -кальмодулинзависимых протениназ, играющих важную роль в деятельности трансдуцирующих систем клетки — их значение для реализации эффектов нейромедиаторов и иных «первых мессенджеров» достаточно подробно изложенный в ряде обзоров [36—38].

Рассматривая роль ДГ в регуляции метаболизма клетки в ответ на стимулирующее воздействие агониста, не следует забывать еще об одной возможности, заложенной непосредственно в самой структуре этого соединения. Известно, что один из ацильных радикалов, этерифицирующий второй гидроксил глицерина (рис. 1, I) в структуре ФИ, представлен арахидоновой кислотой, освобождающейся при повышении концентрации Ca^{2+} в цитозоле [39, 40]. Накопление в клетке этой жирной кислоты вызывает активацию гуанилатциклазы с последующим увеличением содержания cGMP. Этот путь регуляции имеет особое значение для реализации эффектов холинергической импульсации и функции мускариночувствительных холинорецепторов, а также H_2 -рецепторов гистамина, для которых роль cGMP как «второго мессенджера» общепризнана. Таким образом, эти хеморецептивные системы достаточно своеобразны в том отношении, что, в отличие от других рецепторов нейромедиаторов, активация циклаз и последующий синтез cAMP или cGMP осуществляются как непосредственно в процессе взаимодействия агониста с рецептором, так и через стадию образования арахидоната, сопряженного с метаболизмом ФИ.

Следовательно, в системе «вторых мессенджеров» существует определенная функциональная взаимосвязь, обеспечивающая полноту транссинаптической регуляции биохимических процессов в клетке.

Не в полной мере является изученным вопрос о взаимном влиянии рецепторов различных классов на стимулируемый их агонистами распад ФИ. В частности, в опытах на сегментах экзоринового отдела поджелудочной железы мыши [41] было показано, что при совместном воздействии карбамилхолина и холецистокинин-октапептида, для возбуждения рецепторов которых характерен «фосфоинозитидный ответ», распад ФИ стимулировался в меньшей степени, чем при изолированном добавлении их к инкубационной среде. Очевидно, что активация рецепторов одного класса существенно влияет на интенсивность распада ФИ при возбуждении рецепторов другого класса. По-видимому, метаболизм мембранных ФИ можно рассматривать как один из этапов в транссинаптической регуляции функций, на котором реализуются рецепторные взаимоотношения.

Несмотря на логичность и экспериментальную обоснованность современных представлений о вкладе структурных компонентов фосфоинозитидов, накапливающихся в клетке в ответ на нейромедиаторный стимул, в регуляцию принципиально важных биохимических систем, многое в этом аспекте все еще остается не вполне ясным. В частности, совершенно не разработан вопрос о состоянии обмена фосфоинозитидов в условиях прекращения нервной импульсации в ре-

зультате хирургической денервации или при блокаде постсинаптических рецепторов фармакологическими препаратами. Вместе с тем, накапливаются экспериментальные материалы, свидетельствующие о том, что процесс взаимодействия блокатора с рецептором не есть акт простого экранирования его активной поверхности с последующим предотвращением взаимодействия с соответствующим нейромедиатором или фармакологическим агонистом. Нам, в частности, удалось показать [42—47], что введение крысам холинблокаторов в специально подобранных дозах стимулировало транскрипцию в гепатоцитах аналогично тому, как это происходило при введении холиномиметиков АХ или карбамилхолина. При этом оказалось, что по некоторым параметрам спектр продуктов стимуляции генома холинолитиками и холиномиметиками не идентичен. Состояние системы циклических нуклеотидов под влиянием холинолитиков и холиномиметиков также менялось неоднозначно. Следовательно, блокада рецепторов (по крайней мере, мускариночувствительных рецепторов гепатоцитов) является функционально значимым процессом, реализующимся в активации определенных локусов генома. Совершенно очевидно, что анализ состояния метаболизма фосфоинозитидов в условиях блокады рецепторов и его связи в этой ситуации с другими компонентами трансдуцирующих систем (циклические нуклеотиды, Ca^{2+}) представил бы значительный интерес для понимания вклада нервной импульсации в регуляцию обмена веществ.

Сегодня уже стало привычным считать реальной возможностью фармакологического воздействия на состояние трансинаптической регуляции биохимических систем клетки введением агонистов или антагонистов ряда хеморецептивных структур. Адрено- и холиномиметики и соответствующие им блокаторы, агонисты и антагонисты рецепторов гистамина и другие препараты, механизм действия которых заключается во взаимодействии с активной поверхностью рецепторов, прочно вошли в арсенал клинической фармакологии. Накоплен достаточный опыт изменения с помощью лекарств содержания циклических нуклеотидов, главным образом сАМР, как молекул, участвующих в сопряжении рецепторов нейромедиаторов и исполнительных биохимических механизмов. Однако до сих пор не предпринимались попытки использовать возможность воздействия на содержание в иннервируемых тканях структурных компонентов фосфоинозитидов— ИТ и ДГ, по праву считающихся, наряду с сАМР и сGMP, «вторыми мессенджерами». Между тем этот подход вполне заслуживает того, чтобы стать объектом самого пристального рассмотрения в рамках проблемы, касающейся влияния нервной импульсации на биохимические механизмы. Это явилось бы не только существенным вкладом в понимание путей влияния ИС на регуляцию функциональной активности иннервируемых клеток, но и позволило бы с новых позиций подойти к лекарственной терапии нейротрофических расстройств.

METABOLISM OF PHOSPHOINOSITIDES AND NEUROHUMORAL REGULATION

DOLGO-SABUROV V. B.

Institute of Toxicology, USSR Ministry of Health, Leningrad

The review covers literature data about the role of phosphoinositides in the functioning of chemoreceptors. Involvement of diacylglycerine and inositol-1,4,5-triphosphate in the transsynaptic regulation of target cells is discussed. Interaction of these compounds that are the products of phosphoinositides catabolism with other substances belonging to the group of "second messengers" is considered.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. White D. A.—In: Form and function of phospholipides (eds. G. B. Ansell, J. N. Hawthorne, R. M. C. Dawson) Amsterdam, p. 441—482, 1973.
2. Holub B. J. Adv. Nutr. Res., v. 4, p. 107—141, 1982.
3. Hawthorne J. N. Vitam. Hormon., v. 22, p. 57—79, 1964.
4. Hawthorne J. N., White D. A. Vitam. Hormon., v. 33, p. 529—573, 1975.
5. Michell R. H. Biochim. et biophys. acta, v. 415, p. 81—147, 1975.
6. Berridge M. J. Trends Pharmacol. Sci., v. 1, p. 419—424, 1980.
7. Berridge M. J. Mol. Cell Endocrinol., v. 24, p. 115—140, 1981.
8. Abdel-Latif A.—In: Handbook of Neurochemistry, v. 3, p. 91—131, N.-Y., 1983.
9. Berridge M. J. Biochem. J., v. 220, № 2, p. 345—360, 1984.
10. Farese R. V. Metabolism, v. 32, № 6, p. 628—641, 1983.
11. Hawthorne J. N., Pickard M. R. J. Neurochem., v. 32, p. 5—14, 1979.
12. Kikkawa U., Takai Y., Mtnakuchi R. J. Biol. Chem., v. 257, p. 13341—13348, 1982.
13. Hokin M., Hokin L. J. Biol. Chem., v. 203, p. 967—977, 1953.
14. Hokin L. E., Hokin M. R. J. Physiol., v. 132, p. 442—453, 1956.
15. Hokin L., Hokin M. J. Biol. Chem., v. 233, p. 805—810, 1958.
16. Hokin M. R., Hokin L. R. J. Biol. Chem., v. 233, p. 967—977, 1958.
17. Weiss S. J., Putney J. W. Biochem. J., v. 194, p. 463—468, 1981.
18. Brown S. L., Brown J. H. Mol. Pharmacol., v. 24, p. 351—356, 1983.
19. Uchida T., Ito H., Baum B. J., Roth G. S., Filburn C. R., Sacktor B. Mol. Pharmacol., v. 21, p. 128—138, 1982.
20. Jones L. M., Cockcroft S., Michell R. H. Biochem. J., v. 182, p. 669—676, 1979.
21. Fain J. N., Berridge M. J. Biochem. J., v. 180, p. 655—661, 1979.
22. Aub Debra L., Putney J. W. Biochem. J., v. 225, № 1, p. 263—266, 1985.
23. Yano K., Higashida H., Nozawa Y. FEBS Lett., v. 183, № 2, p. 235—239, 1985.
24. Jones L. M., Kirk Ch., Michell R. H. Scand. J. Gastroenterol., v. 17, Suppl. 72, p. 33, 1982.
25. Michell R. H., Kirk C. Y. Trends Pharmacol. Sci., v. 2, № 4, p. 86—89, 1981.
26. Streib H., Schultz I. Am. J. Physiol., v. 245, p. 347—357, 1983.
27. Joseph S. K., Thomas A. F., Williams R. J., Irwin R., Williamson J. R. J. Biol. Chem., v. 259, p. 3077—3081, 1984.
28. Michell R. H., Jafferji S. S., Jones L. M. Adv. Exp. Med., v. 83, p. 447—465, 1977.
29. Lapetina E. G. Trends Pharmacol. Sci., v. 3, p. 115—118, 1982.
30. Lapetina E. G. Life Sci., v. 32, p. 2069—2082, 1983.
31. Holmes R. P., Yoss N. L. Nature, v. 305, p. 637—638, 1983.

32. Ichida S., Moriyama M., Hirooka Y., Otazaki Y., Yoshitaka K. *Europ. J. Pharmacol.*, v. 106, p. 657—660, 1985.
33. Kishimoto A., Takai Y., Mori T., Kikkawa U., Nishizuka Y. *J. Biol. Chem.*, v. 255, p. 2273—2276, 1980.
34. Takai Y., Minakuchi R., Kikkawa U., Sano K., Kaibuchi K., Yu B., Matsubara T., Nishizuka Y. *Progr. Brain Res.*, v. 56, p. 283—301, 1982.
35. Nishizuka Y. *Trends Biochem. Sci.*, v. 8, p. 13—16, 1983.
36. Schulman H. *TIPS Rev.*, v. 5, p. 188—192, 1984.
37. Cheung W. Y. *J. Cycl. Nucl. Res.*, v. 7, p. 71—84, 1981.
38. Эттингер Р. Н., Нейрохимия, № 3, с. 405—418, 1984.
39. Dawson R. M. C., Hemington N. L., Irvine R. F. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, v. 117, p. 196—201, 1984.
40. Snider R. M., McKinney M., Forray C., Richelson E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Biol. Sci.*, v. 81, p. 3905—3909, 1984.
41. Roberts M. L., Tennes K. A. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 109, № 2, p. 293—296, 1985.
42. Долго-Сабуров В. Б., Подосиновикова Н. П., Матвеев В. И., *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, № 9, с. 294—297, 1979.
43. Долго-Сабуров В. Б., Матвеев В. И., Подосиновикова Н. П. *Докл. АН СССР*, т. 264, № 4, с. 994—996, 1982.
44. Долго-Сабуров В. Б., Матвеев В. И., Подосиновикова Н. П., *Вопр. мед. химии*, № 5, с. 83—87, 1984.
45. Долго-Сабуров В. Б., Подосиновикова Н. П., Матвеев В. И., *Тез. докл. XVI конф. ФЕБО*, Москва, с. 313, 1984.
46. Голиков С. Н., Долго-Сабуров В. Б., Елаев Н. Р., Кулешов В. И., —В кн.: *Холинэргическая регуляция биохимических систем клетки*, с. 124—140, Медицина, М., 1985.

Поступила 7. I 1986

УДК 577.112.083.42.398—088.1/543.545

УЛЬТРАМИКРОЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЕ ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ПОЛИПЕПТИДОВ НЕЙРОННЫХ СТРУКТУР

ШТАРК М. Б., МИКИЧУР Н. И., БЕРЕТЕННИКОВ Н. А.

Институт автоматики и электрометрии СО АН СССР
Институт клинической и экспериментальной медицины СО АМН СССР, Новосибирск

В обзоре анализируются различные варианты ультрамикроелектрофоретических исследований применительно к изучению белков и пептидов различных структур мозга, нервных клеток и их органелл. Рассматриваются последовательные процедуры выделения структур и их обработка; обсуждаются особенности фракционирования материала в гелях с однородным диаметром пор и градиентных гелях, бескапиллярные варианты ультрамикроелектрофореза, комбинированные методы анализа, встречная иммунодиффузия, импергнационные методы, их возможности и перспективы использования.

Получившие широкое распространение методы электрофоретического фракционирования биологического материала на ПААГ легко адаптируются к исследованиям белка в микромасштабе путем применения их микро- и ультрамикроэлектрофоретических модификаций. Неоспоримым преимуществом микроэлектрофореза (МЭФ) перед соответствующими макровариантами является возможность анализа минимального количества материала и резкое сокращение времени фракционирования и окрашивания образцов, что составляет примерно одну десятую времени, необходимого для выполнения этих процедур при макроисследованиях. Сравнительный анализ микро- и макровариантов показал, что увеличение чувствительности измерений, достигаемое в микромасштабе благодаря значительному уменьшению сечения геля, не приводит к изменению белковых спектров, получаемых в макроэлектрофорезе как при окрашивании специфическими красителями, так и в условиях изотопного анализа [1, 2].

В обзоре рассмотрены появившиеся позднее различные варианты МЭФ и существенно необходимые детали, улучшающие описанные ранее методы.

1. *Подготовка капилляров и полиакриламидных микрогелей.* Важнейшим этапом МЭФ является подготовка капилляров для фракционирования. Их следует предварительно откалибровать под контролем стереомикроскопа [3]. Существует несколько способов мытья капилляров: с применением водоструйного насоса [4], с использованием шприца [3], центрифугированием [5] и др. Считается необходимым покрывать внутренние стенки капилляров слоем гидрофобизирующей жидкости, чтобы сделать их несмачиваемым водой и, таким образом, облегчить процесс извлечения геля из капилляров. Для этого чистые и сухие внутренние поверхности капилляров обрабатывают, например, 0,3%-ным раствором диметилдихлорсилана в бензоле и сушат при 120° в течение часа [3, 6].

Существуют разные варианты приемов, разделяющих и концентрирующих ПААГ. Наибольшее распространение получили системы Neuhoﬀ [7], Davis [8]. Для капиллярного МЭФ более предпочтительными являются разделяющие гели, приготовленные по Neuhoﬀ [7]. Сравнительный анализ, проведенный с использованием маркерных белков (человеческого сывороточного альбумина), а также водорастворимых и тритон-X-100-экстрагируемых белков ганглия улитки *H. pomatia*, показал, что этот метод дает максимальное разрешение с большим числом полос, чем метод Davis [8]. По мнению Neuhoﬀ [4], чем меньше диаметр капилляра, тем выше концентрация ПААГ. Кроме того, разделяющий гель, применяемый для анализа в микрошкале, должен иметь высокое отношение концентрации акриламида к N, N'-метилденбисакриламиду (около 100:1). Добавление гидантона (гликолил-мочевины) к разделяющему гелю в концентрации 0,5% увеличивает разрешающую способность геля, так как гидантон уменьшает длину цепей и, возможно, количество сшивок между ними,

а также увеличивает время полимеризации [7]. Однако применение гидантона не приводит к контролируемому течению реакции полимеризации [13], поэтому воспроизводимость по подвижности отдельных фракций в этом методе невысока. Сравнение концентрирующих гелей в обеих системах [7, 8] показало обратную картину: разрешение улучшается при использовании 3,75%-ного концентрирующего геля по методу Davis [8], ибо рибофлавин, применяемый в качестве катализатора реакции сополимеризации, делает гель однородно крупнопористым.

2. *Фракционирование материала.* МЭФ на ПААГ можно выполнять как в непрерывных, так и в прерывистых (диск) системах. При этом используются разные буферы с отличающимися значениями pH, что позволяет получать узкую стартовую зону, создаваемую благодаря эффекту концентрирования [9, 10]. Фракционирование осуществляется либо на гелях с однородным диаметром пор, либо с применением градиента концентрации ПААГ.

Высокой степени концентрирования, которую можно получить при диск-электрофорезе, с помощью других методов пока достичь не удастся [11, 3], что делает целесообразным фракционирование белков в данных системах по сравнению с непрерывным электрофорезом.

2. 1. *Применение гелей с однородным диаметром пор.* Модификации капиллярного МЭФ, в котором для фракционирования макромолекул используются разделяющие гели с однородным диаметром пор, освещены в литературе [4, 12]. Следует отметить особо важные детали. После приготовления полимеризующей смеси и дегазации ее для устранения кислорода, который является ингибитором реакции полимеризации, капилляры значительно надежнее можно заполнить раствором ПААГ на 2/3 их длины, но не за счет капиллярных сил, как это рекомендует Neuhoﬀ [4]. Мы предлагаем каждый из них вставлять поочередно в полиэтиленовый шланг, соединенный с тормозным шприцем, имеющим винтовую подачу, и заполнять на необходимую высоту. Способ следует использовать при работе с силиконизированными капиллярами, в которых капиллярные силы отсутствуют [5].

Морозов [13] проводил капиллярный МЭФ по Neuhoﬀ [7], используя капилляры диаметром 0,4; 0,32; 0,2; 0,1 мм, и определил, что оптимальное разделение наблюдается в том случае, когда выполняется эмпирически найденная формула, в которой произведение высоты слоя образца (в мм) на концентрацию белка (мг/мл) есть величина постоянная, равная 12 для капилляров любого диаметра. Пользуясь этой формулой, легко определить оптимальную высоту слоя образца для раствора любой концентрации независимо от диаметра капилляра.

Расстояние в геле, на котором производят разделение, определяется количеством фракций в исследуемом материале и различиями в их подвижностях. Следует учитывать два противоположно действующих фактора: 1) с увеличением длины пути (или, что то же, при заданной напряженности поля—с увеличением времени разделения)

возрастает расстояние между отдельными фракциями, обладающими различной подвижностью, то есть улучшается разрешение; 2) пропорционально корню квадратному из времени растет диффузное уширение зон, так как в соответствии с уравнением Эйнштейна $X=2\sqrt{2Dt}$, где X —диффузное уширение зоны, D —коэффициент диффузии, t —время разделения [3].

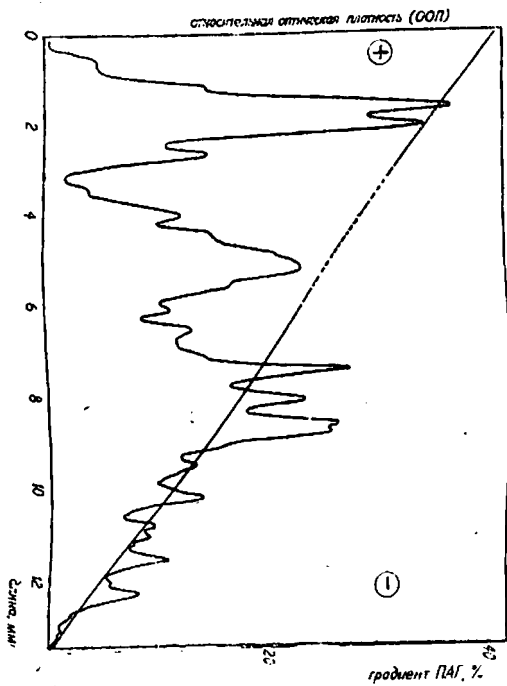
Основная трудность, встречающаяся при миниатюризации метода гель-электрофореза, заключается в том, что уменьшение линейных размеров участка геля ведет к возрастанию роли диффузного уширения зон. Это следует учитывать при выборе оптимального расстояния, на котором происходит разделение образца.

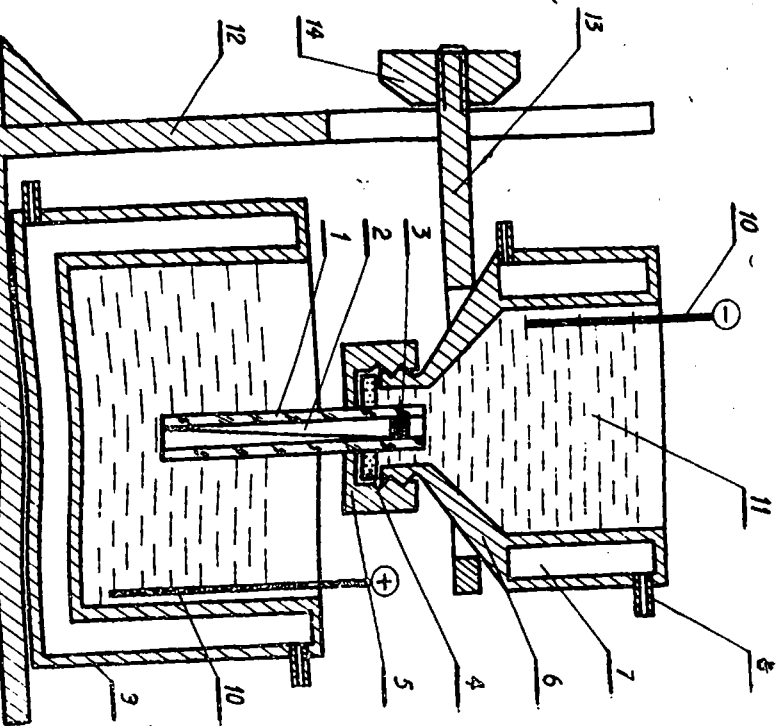
МЭФ предпочтительнее проводить в условиях стабилизации силы тока, так как в ходе электрофореза в прерывных буферных системах при стабилизации по напряжению происходит увеличение сопротивления, поэтому скорость миграции молекул уменьшается и зоны уширяются вследствие диффузии [14].

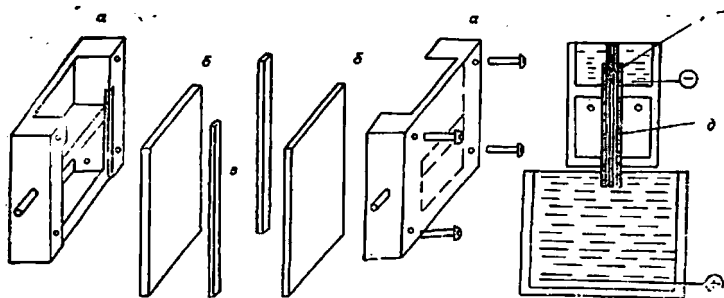
На рис. 1 представлена камера для МЭФ, разработанная и используемая нами в работе [5]. Она изготовлена из органического стекла, отполированного до прозрачности, что позволяет наблюдать с помощью стереомикроскопа МБС-1 течение электрофореза. Капилляр (1) вставляют в резиновую прокладку (4) и гайкой (5) поджимают к верхнему электродному резервуару (6). После этого резервуар располагают на кронштейне (13) и регулируют глубину погружения капилляра в нижний электродный буфер. Сосуд для нижнего электродного буфера (9) фиксирован на штативе (12). Верхний и нижний электродные буферы охлаждают проточной водой (7).

Таким образом, применяя для фракционирования гели с однородным диаметром пор и диск-буферные системы, можно без затруднений анализировать белки, экстрагируемые неионными детергентами типа тритон X-100 и твин, то есть исследовать примерно 40% общего белка мозга позвоночных и до 55% белков НС беспозвоночных животных [15, 16]. Однако такой метод трудно приспособить для разделения белков, экстрагируемых ДДС-Na, что позволило бы анализировать до 97% общего белка [15], ибо для выдавливания геля из капилляра надо добавлять тритон X-100, который преципитирует с ДДС-Na, делая невозможным использование этих двух детергентов одновременно.

2. 2. *Анализ белков на градиентных гелях.* В случае использования гелей с линейным градиентом концентрации акриламида облегчается процедура выталкивания геля из капилляра, так как высококонцентрированная нижняя его часть, с которой обычно начинается выдавливание, играет роль «пробки» и не приводит к повреждению геля. Такое преимущество обеспечивает проведение фракционирования белков, выделяемых уже описанными тремя способами экстракции. Кроме того, метод позволяет определять величину M_r и увеличивать количество фракционируемых белков. При использовании градиентных гелей происходит значительное увеличение расстояния меж-







ба

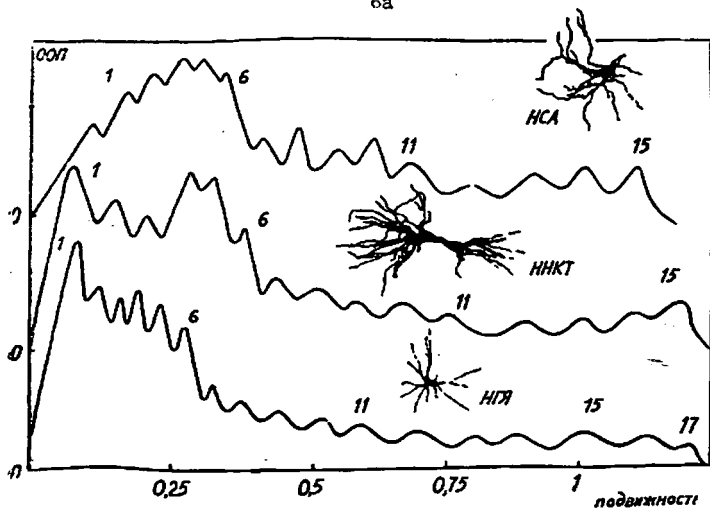


Рис. 1. Камера для выполнения капиллярного микроэлектрофореза. 1—капилляр, 2—гель, 3—проба, 4—уплотнитель, 5—гайка, 6—корпус, 7—рубашка охлаждения, 8—оливы, 9—нижняя электродная камера, 10—электроды, 11—электродный буфер, 12—штатив, 13—кронштейн, 14—зажим Н. ротаia. Направление движения полипептидов справа налево (от—к+)

Рис. 2. Денситограмма белкового спектра отдельного нейрона улитки Н. ротаia. Направление движения полипептидов справа налево (от—к+)

Рис. 3. Схема камеры для проведения микроэлектрофореза из плоских гелях; а—матрицы из оргстекла, б—предметные стекла, в—прокладки из пластической ленты, г—капилляр с образцом (всего их 10), д—ПААГ.

Рис. 4. Типичные денситограммы трех исследованных видов нейронов. НГЯ—гигантские мультиполярные нейроны гигантоклеточного ретикулярного ядра продолговатого мозга, НСА—пирамидные клетки CA_3 — CA_4 полей гиппокампа, ННКТ—релейные нейроны наружного коленчатого тела. По оси абсцисс—подвижность, по оси ординат: ООП—относительная оптическая плотность

ду отдельными фракциями по сравнению с однородными гелями, что позволяет не предъявлять строгих требований к разрешающей способности микроденситометров.

В литературе описан простой способ формирования градиентных гелей, который требует для получения линейной концентрации ПААГ всего лишь трех растворов: раствора мономеров, буферного раствора и раствора катализаторов реакции сополимеризации [17]. Наиболее уязвимым моментом методики формирования градиентных гелей является «торможение» подъема жидкости пальцем при заполнении капилляра раствором катализатора, что не позволяет добиться максимальной стандартизации процедуры. Модификация способа формирования градиента, предложенная нами, основана на принципе «тормозной» пипетки и обеспечивает более воспроизводимые результаты [16].

3. *Анализ полипептидов на гелях с линейным градиентом ПААГ в присутствии ДДС-Na.* Эта методика наиболее подробно освещена Rüchel и соавт. [17], которые использовали те же растворы, что и при фракционировании в отсутствие детергента. Наличие ДДС-Na в геле не требуется, так как молекулы детергента мигрируют в электрическом поле быстрее любого из полипептидов, что можно наблюдать в течение 5 мин в 0,5%-ном толуидиновом голубом. Так как ДДС-Na в высоких концентрациях нарушает анионную границу, его следует добавлять в электродный буфер в концентрациях, не больших 0,2% (обычно 0,1%).

Особое внимание следует обратить на приготовление образцов: концентрация детергента не должна превышать 2,5%, при большей концентрации фракционирование идет хуже. Ионная сила не оказывает прямого влияния на связывание ДДС-Na с белком так же, как и рН раствора в интервале 7,2—9,3 [18]. На рис. 2 представлена денситограмма фракционирования полипептидов отдельного нейрона улитки *H. pomatia*, полученная нами этим методом. Rüchel и соавт. [18] нашли, что фракционирование с ДДС-Na лучше осуществлять на непрерывных буферных системах, чем в диск-электрофореze, так как в последних могут появляться дополнительные фракции, отражающие разную загрузенность белка детергентом (это может наблюдаться в случае фракционирования белков, не имеющих специальной аффинности к ДДС-Na). Например, это имеет место при разделении бычьего сывороточного альбумина, в ходе электрофореza которого ДДС-Na отделяется от полипептидов, приводя к разной загрузке его детергентом. Изменяющаяся сила электрического поля, возникающая в диск-системах, способствует разложению комплексов «ДДС-Na-полипептид». Поэтому, несмотря на такие очевидные недостатки непрерывного МЭФ, как его продолжительность (до 1 ч) и меньшая четкость полюс, его следует в данном случае предпочесть.

4. *«Бескапиллярные» варианты ультрамикроэлектрофореza.* Применяя методы капиллярного МЭФ, можно легко определить 10^{-9} г

белка в отдельной полосе. Однако задачи по анализу существенно меньших количеств материала (пикограммы) трудно решить, используя описанные методы. Повышения чувствительности МЭФ добиваются сокращением диаметра геля, но затруднительно применять в работе гели диаметром меньше 300 мкм и объемом меньше 2 мкл из-за сложности механического удаления геля из капилляра (для фиксации, окрашивания и дальнейшего сканирования белков).

Эту проблему можно решить, проводя МЭФ на ПААГ, сформированных в капиллярах, которые затем растворяют. Электрофорез проводят на ПААГ, лишенных капиллярных оболочек, что позволяет работать с гелями диаметром до 40 мкм. Впервые такой принцип был реализован Бердниковым, Слободняком [19] при анализе гистоновых белков и в дальнейшем успешно применен нами для фракционирования щелочных белков отдельных нейронов улитки *H. pomatia* [20]. Одно из преимуществ такой системы, кроме возможности работы с гелями до 40 мкм и фракционирования отдельных нейронов и их органелл, заключается в резком снижении диффузии белков в геле, что обусловлено присутствием уксусной кислоты, входящей в состав исходных растворов. Нами был описан подобный способ для фракционирования кислых белков, имеющий чувствительность до 10^{-11} г на отдельную полосу образца в геле [21].

5. *Комбинированные методы анализа.* Капиллярный МЭФ можно объединить с иммунодиффузионными и иммуноэлектрофоретическими методами, анализируя и разделяя различные антигены с помощью антисывороток, полученных к нервной ткани и индивидуальным белкам мозга. Примером такого рода может быть работа Felgenhauer [22], в которой микродиск-электрофорез проводили с использованием 6%-ных разделяющих гелей.

В литературе описан МЭФ в комбинации с перекрестным иммуноэлектрофорезом [23]; для проведения одного анализа требуется примерно 1 мкг антигена и около 20 мкл антисыворотки. Сочетание описанных методов позволяет расходовать небольшие количества антигенов и антигенов, добиться высокого разрешения антигенов благодаря эффекту «молекулярного сита», осуществлять анализ в течение очень короткого времени.

6. *Микроэлектрофорез на плоских гелях.* Применяя методы капиллярного МЭФ хорошей воспроизводимости можно добиться при наличии очень точно калиброванных капилляров и стандартизации всех этапов работы. Возникающие при несоблюдении этих условий ошибки, не имеющие, на первый взгляд, особого значения, могут оказаться решающими и изменить характер фракционирования.

Во избежание этих недостатков нами был разработан микрометод, с помощью которого можно анализировать полипептиды, экстрагируемые из нейронов при помощи ДДС-Na [24]. Метод сохраняет чувствительность и все преимущества, свойственные МЭФ. Фракционирование выполняют в простой и удобной камере (рис. 3), состоящей

из 2 матриц оргстекла (рис. 3, а), в которые вставляют стекла размером 25×30 мм (рис. 3, б). Между ними находятся прокладки из пластической ленты толщиной 0,3 мм (рис. 3, в). Для герметизации боковых поверхностей камеры прокладки покрывают тонким слоем Arieson—Fett M, затем матрицы осторожно стягивают болтами. При заполнении камеры полимеризующей смесью выступающие из нее нижние части стекол прижимают к кусочку резины при помощи зажимов. Растворы для приготовления 3%-ного концентрирующего геля, 15 и 12,5%-ных разделяющих гелей готовят по Laemmli [25] в собственной модификации (исходный мономер для концентрирующего геля: $T=54,8\%$; $C=2,5\%$). В качестве буфера концентрирующих гелей используется 0,125 М трис-HCl, pH 6,8, а для разделяющих гелей—0,75 М трис-HCl, pH 8,8. Концентрирующие гели полимеризуют 0,04%-ным персульфатом аммония и 0,025% TEMED (конечные концентрации). Электродным буфером является 50 mM трис-глицин (pH 8,4), содержащий 0,1 ДДС-Na и 0,02% бромфенолового красного.

С помощью капиллярной пипетки камеру заполняют на 2/3 раствором разделяющего геля под контролем стереомикроскопа. По завершении полимеризации разделяющего геля воду отсасывают пипеткой и до верха стекол заливают раствором концентрирующего геля. На этом этапе в концентрирующий гель погружают на глубину 4 мм специально вырезанную тефлоновую ленту, после чего камеру помещают на емкость с нижним электродным буфером. Одним из преимуществ предлагаемой камеры является то, что матрицы одновременно выполняют роль отсека для верхнего электродного буфера. На выступающие части стекол в этот отсек надевают перфорированный держатель для капилляров, отверстия которого совпадают с щелью между стеклами (10 отверстий). Капилляры объемом порядка 60 нл (длина 6 мм, диаметр 0,11 мм) заполняют образцами за счет капиллярных сил и вставляют вертикально в отверстия держателя (рис. 3, г). В образцы нельзя добавлять вещества, повышающие его плотность (сахароза, глицерин), так как это ведет к их вытеканию во время внесения капилляра в электродный буфер и искажает картину фракционирования. Применение капилляров столь малого диаметра позволяет не уменьшать для увеличения чувствительности метода толщину геля. Электрофорез проводят в течение 20 мин, стабилизируя напряжение: 30 В—для концентрирования и 50 В—для разделения геля. Фракционирование завершают, когда фронт бромфенолового красного пройдет в разделяющем геле 10 мм.

Для хранения плоских гелей их сначала вымачивают в смеси этанол-глицерин-вода (30:10:60) в течение 20 мин, затем оборачивают целлофаном, предварительно пропитанным тем же раствором, целлофан растягивают на рамке и сушат 4 ч. Приготовленные гели можно хранить при 4° долгое время.

Увеличения чувствительности в различных вариантах МЭФ можно добиться либо путем уменьшения диаметра геля (в случае капил-

лярного МЭФ), либо за счет применения более тонких гелей (в случае использования плоских ПААГ). Однако абсолютный предел детекции зависит от окрашиваемости белка, которая как для амидо-черного, так и для Кумасси голубого находится в интервале 10^{-9} — 10^{-10} г на отдельную белковую полосу в геле. Окрашивание гелей после завершения МЭФ, особенно для случаев, когда при фракционировании применяют ДДС-Na, надо проводить без предварительной префиксации в смеси спирта и уксусной кислоты, так как она приводит к потере 70—80% связывающей способности красителя [26]. Наш взгляд, наибольшая чувствительность достигается при окрашивании образцов фракционирования 0,33%-ным раствором Кумасси голубого, приготовленным на 45%-ном метаноле и 10%-ной уксусной кислоте в течение 10 мин, и отмывании избытка красителя в 7,5%-ной уксусной кислоте в течение 40 мин для всех модификаций МЭФ.

7. *Импрегнация белков серебрением.* Трудность определения белков в количествах, меньших 10^{-10} г, с использованием общепринятого красителя Кумасси голубого ограничивает применение МЭФ, в частности при изучении тонких изменений метаболизма. Более чувствительные методы идентификации протеинов в гелях—авторадиография и флуорография—требуют длительной экспозиции, применения дорогих и редких изотопов, имеют ограничения при получении высокоспецифической активности меченых белков в исследованиях *in vivo* и, наконец, мало применимы в клинике. Дальнейшее повышение чувствительности МЭФ может быть связано с совершенно иным способом окрашивания после фракционирования—методом импрегнации белков серебром, которое обеспечивает увеличение чувствительности по сравнению с Кумасси голубым на два порядка и делает его соизмеримым с авторадиографией. Кроме того, серебрение позволяет произвести экспресс-обзор белков ткани, что невозможно при авторадиографии из-за длительного времени проникновения изотопов в белки.

Серебрение белков после электрофореза на ПААГ впервые было предложено Switzer и соавт. [27], в дальнейшем эту методику упростили, сократив число операций с 10 до 6 и уменьшив количество нитрата серебра, необходимого для проведения реакции [28]. Модификация была использована Pochling, Neuhoﬀ [29] при выявлении полипептидов после завершения МЭФ. Ввиду того, что механизм серебрения неизвестен, был исследован ряд параметров, влияющих на импрегнацию белков и показывающих соотношение между загрузкой протеинов серебрением и уровнем их окрашивания [30].

При выполнении серебрения гелей, на которых не проводилось фракционирование, удалось показать, что фон при окрашивании зависит от степени отмывания веществ, которые могут появиться в ПААГ после МЭФ в связи с избытком глутаральдегида и ионов серебра, времени серебрения и восстановления серебра, концентрации формальдегида. Этот метод используется обычно в тех случаях, когда требуются качественные или полуколичественные оценки содержа-

ния белков, а также при сравнении содержания белков различных органов и тканей в масштабе 10^{-11} — 10^{-12} г.

Меггил и соавт. [31] объединили гистологический и фотохимический методы в новый способ серебрения полипептидов в макрогелях (серебрение 2), использующий три относительно стабильных раствора, выполняемый менее чем за час и требующий 2% серебра, что является обычным для гистологической методики. Сравнение чувствительности определения полипептидов новым способом (серебрение 1), выполненное на лизатах клеток *E. coli* и оцененное при помощи денситометра, показало, что чувствительность «серебрения 2» составляет 59% по отношению к «серебрению 1». Тщательный счет «пятен» полипептидов, полученный по методу O'Farrell [32], показал, что эффективность нового способа серебрения равна 90% от «серебрения 1». Кроме того, чувствительность метода строго зависела от уровня освещения гелей на стадиях их обработки нитратом серебра и его последующего восстановления.

Нами была разработана модификация «серебрения 2» для плоских гелей размером $25 \times 30 \times 0,3$ мм [33], позволяющая осуществлять импрегнацию ДДС-Na-экстрагируемых полипептидов, фракционируемых по разработанному нами методу [24]. Дальнейшее увеличение чувствительности метода предполагает специальные исследования механизмов серебрения, знание которых позволит выбрать оптимальные инградненты и экспозиции.

8. Микроэлектрофорез белков различных образований мозга. Какие же возможности для анализа белковых экстрактов предлагают различные модификации микроэлектрофоретических методов? Основываясь на том, что они позволяют фракционировать нативные белки и полипептиды в количествах 10^{-9} — 10^{-10} г, их логичнее всего применять не только при анализе белков отдельных нейронов, но и для замены исследований в макрошкале. Оба эти варианта применения МЭФ были использованы в ряде исследований.

Особый интерес представляют работы, в которых идентифицируются уникальные (маркерные) белки для различных в функциональном отношении образований мозга и изучаются особенности функционирования различных органов и тканей в связи с уникальным набором свойственных им белков.

Такова работа пионеров исследования белков мозга в микрошкале Pun, Lombroso [11]. Авторы описали оригинальный прибор для МЭФ (ячейки $1,8 \times 1,0 \times 70$ мм). За основу была взята система Davis [8]. Прибор обеспечивает проведение окраски и отмывки избытка красителя в той же микроячейке, относительно большая площадь которой позволяла использовать высокие значения тока без заметного разогревания геля. На гель наносили по 100 мкл супернатанта водорастворимых белков, содержащего от 0,8 до 2 мг ткани. Метод позволил получить в среднем 19 фракций различных белков. Сравнение белковых экстрактов эпифиза, переднего гипоталамуса, скорлупы, сз-

рого и белого вещества коры мозга крысы показало значительные количественные и умеренные качественные различия в области спектров белков с высокой электрофоретической подвижностью.

Даниловский [1] провел сравнительное изучение тритон X-100-экстрагируемых белковых образцов премоторной зоны коры, СА₃ поля гиппокампа, хвостатого ядра, мозжечка крыс. Использовались МЭФ по методу Наумовой [3] на 7%-ных разделяющих гелях диаметром 0,36—0,40 мм, позволяющий определить пикогаммы материала, а также макроэлектрофорез по Маггер [9]. Белковые зоны идентифицировали по их относительной электрофоретической подвижности, рассчитанной к подвижности маркерного белка—ингибитора трипсина из бобов сои (М 21,5 кД). Во всех опытах анализировали частоты появления отдельных белковых зон. Результаты работы указывают на большую разрешающую способность микрометода в сравнении с макроэлектрофорезом. Ansorg и соавт. [34] исследовали экстрагируемость различных групп белков мозга. Фракционирование проводили по методу Neuhoft [7] на 20%-ных разделяющих и 5%-ных концентрирующих гелях. Метод позволил максимально анализировать 18 фракций различных белков.

Сравнительный анализ водорастворимых белков (экстракция 0,01 М трис-НСl, рН 7,4) из различных органов показал наличие относительно малого количества их в сердце, легких и еще меньшего—в мышцах и жире. Быстродвижущиеся фракции преобладали в мозгу, надпочечниках, причем в экстракте мозга обнаруживается компонент, движущийся вместе с фронтом буфера, которого нет в других органах. Было проведено сравнительное исследование белковых паттернов, экстрагированных 0,01 М трис-НСl, рН 7,4 из серого и белого вещества коры мозга, верхнего и нижнего четверохолмия, гиппокампа, продолговатого мозга, моста, мозжечка, гипофиза и зрительного нерва. Общая картина оставалась примерно одинаковой в разных образованиях, но наблюдались различия как в области высокомолекулярных белков (которые, правда, трудно сравнивать, так как картина сглаживается высоким фоном липопротеинов), так и низкомолекулярных. Фракция белка S-100, мигрирующая с фронтом буфера, присутствует во всех образованиях мозга в различных количествах так же, как и фракция, следующая сразу за ней и экстрагируемая изопенталоном (Р-фракция).

Корочкин [35] описал микрометод, выполняемый в плоских стеклянных «капиллярах» (0,5×1 мм или 0,5×0,2 мм) на ПААГ, в которые перед нанесением раствора персульфата аммония вносят суспензию исследуемых клеток. Оказалось, что в глиальных клетках интенсивнее окрашивались медленные фракции лактатдегидрогеназы, в нейронах—быстрые.

9. *Анализ нейрональных белков и полипептидов.* Использование методов микроэлектрофоретического фракционирования дает исследователям уникальную возможность анализа белковых спектров отдель-

ных идентифицируемых клеточных типов и, в первую очередь, белков индивидуальных клеток. Несмотря на обостренный интерес в последние два десятилетия к нейроспецифическим белкам, большинство исследований их проводилось на уровне экстрактов целого мозга или его отдельных образований с помощью традиционных биохимических или иммунологических методов.

9. 1. Белки-маркеры идентифицированных нейронов моллюсков. Удобным объектом для микроэлектрофоретического изучения нейроспецифических белков и пептидов являются крупные нейроны моллюсков.

В 1971 г. Wilson анализировал белки отдельных нейронов (R_2 и R_{15}) *Aplisia californica* [36], впервые применив радиоизотопный анализ для исследования вновь синтезируемых полипептидов, меченных по ^3H -лейцину и фракционированных МЭФ по Shapiro и соавт. [37], Davis [8] в присутствии ДДС-Na с использованием непрерывной буферной системы на 5%-ных разделяющих гелях.

Распределение метки в нейронах R_{15} и R_2 существенно различалось, что наглядно можно показать, рассмотрев отношение счета радиоактивности в гелях для полипептидов с M_r 60 кД к счету для полипептидов с M_r 12 кД 2,3:2,0 для R_2 и 0,4:0,45 для R_{15} . Это подтверждает наличие специфических для определенного типа нейронов белков.

Более совершенную технику микроэлектрофоретического фракционирования для исследования синтеза полипептидов нейронов моллюсков *Aplisia* и *Otala lactea* применил Gainer [2], который использовал эффект концентрирования диск-буферных систем, позволяющих значительно повысить разрешение системы и определять полипептиды в количестве $5 \cdot 10^{10}$ г.

Микроэлектрофорез был выполнен в капиллярах, имеющих внутренний диаметр 0,58 мм. Фракционирование проводили по Davis [8] и Neville [38] на 5, 10, 15%-ных разделяющих и 3%-ных концентрирующих гелях в присутствии ДДС-Na. Введение метки проводили при инкубации ганглия в физиологическом растворе в присутствии 1—4, 5- ^{14}C -лейцина, либо 1—4, 5- ^3H -лейцина. Эти эксперименты показали существование нейроспецифичности в образцах полипептидов (у нейронов 11, 12 *Otala* и у нейронов R_2 и R_{15} *Aplisia*). Wilson [36] отмечал различия в образцах синтеза между нейронами R_2 и R_{15} *Aplisia*, однако с помощью его метода нельзя было разделить полипептиды с M_r меньше 12 кД, поэтому, хотя Wilson и указал на способность нейрона R_{15} синтезировать в большем количестве низкомолекулярные белки (12 кД) по отношению к высокомолекулярным (60 кД), чем R_2 , тем не менее он не мог показать, что это различие обусловлено синтезом уникального для R_{15} полипептида (5 кД по Gainer). Белок с такой же величиной M_r был найден Gainer и у нейрона 11 *Otala*; автор указывает на возможную гормональную природу полипептида.

Loh, Peterson [39] исследовали нейроны улитки *Aplisia californica*.

причем измеряли как относительные концентрации полипептидов (при окрашивании Кумасси), так и скорость синтеза белков не только различных нейронов, но и их субклеточных фракций для локализации специфических, вновь синтезированных полипептидов внутри клеток. Фракционирование проводили по методам Gainer [2], Davis [8]. Система позволяла разрешать маркерные белки в диапазоне от 15 до 60 кД (использовали 2,5%-ные концентрирующие и 15%-ные разделяющие гели). Сравнение электрофореграмм после окрашивания их Кумасси показало различия концентраций полипептидов в разных нейронах [39].

Таким образом, приведенные результаты показали, что для моллюсков *Aplisia* и *Otala* существует высокий уровень специфической транскрипции в различных типах нейронов. Такое же заключение делается на основании экспериментальных результатов Любославского, Микичура [20], полученных при анализе нейронов улитки *H. pomatia* в бескапиллярном варианте МЭФ, и исследования Гринкевич [6]. В этих работах было показано, что фенотипически различные нейроны виноградной улитки характеризуются присутствием индивидуальных белковых спектров. При выработке у моллюсков условного рефлекса в командных нейронах оборонительного поведения (ППаз) значительно увеличивается содержание кислого нейроспецифического белка, дающего перекрестную реакцию с анти-S-100 сывороткой. На поздних этапах формирования рефлекса для командных нейронов оборонительного поведения характерна корреляция увеличения процентного содержания кислого нейроспецифического белка со степенью вовлечения их рецептивных полей в процедуру обучения.

Говоря о возможности фракционирования белков отдельных нейронов моллюсков, нельзя не отметить прекрасный метод, предложенный Osborn, Ruchel [40], в котором фракционирование материала осуществляли на градиентных гелях в присутствии ДДС-Na с использованием следующих буферов: 350 мМ трис-сульфат, pH 8,4; электродный буфер—50 мМ трис-глицин, pH 8,4, с 0,1% ДДС-Na; раствор для экстракции полипептидов из нейронов: 20 мМ трис-сульфата, pH 8,4, содержащий 1% ДДС-Na и 1% меркаптоэтанола. После формирования градиентного геля незаполимеризовавшийся раствор отсасывали с верхней поверхности геля и эту часть капилляра заполняли раствором для экстракции полипептидов, в котором и производили извлечение нейронов. Капилляры с клетками помещали вертикально в маленьком объеме гелевого буфера, накрывали мензуркой для создания влажной атмосферы и оставляли в термостате на 2 ч при 55°. После завершения этой процедуры испарившуюся часть раствора для экстракции полипептидов восполняли раствором концентрированной сахарозы, содержащим небольшое количество бромфенолового синего, и образец подвергали электрофорезу. Авторы указывают на возможность фракционировать подобным образом водорастворимые и три-тон X-100 экстрагированные белки отдельных нейронов.

9. 2. Белки, специфичные для нейронов позвоночных животных. Нуден [41] анализировал белки нервных клеток животных, подвергнутых «обучению». Крыс обучали менять лапу при доставании пищи, затем декапитировали, извлекали область CA_3 гиппокампа, экстрагировали белок и анализировали его методом капиллярного МЭФ. Анализ денситограмм показал, что у обученных животных имеются два пика для белка S-100, а у контрольных—один. Микроэлектрофоретический метод также позволяет наблюдать изменения, происходящие после специфической электростимуляции. Althaus и соавт. [42], исследуя гетеросинаптическое облегчение моносинаптического рефлекса, наблюдали изменения в спектрах водорастворимых белков α -мотонейронов спинного мозга—увеличение интенсивности включения в белок S-100.

Было проведено исследование по выявлению белковой специфики гигантских мультиполярных нейронов гигантоклеточного ядра (НГЯ) ретикулярной формации продолговатого мозга, являющихся интегративно-пусковыми элементами стволовых образований, организующих двигательные автоматические реакции. Для выявления этой специфики сравнивали белковые спектры нейронов, имеющих другой морфофункциональный «статус»—пирамидных клеток CA_3 — CA_4 (НСА) полей гиппокампа и релейных нейронов наружного коленчатого тела (ННКТ). Выделение нейронов из исследованных областей осуществляли при помощи метода микроманипуляций [43]. Из 20—30 нейронов каждого вида экстрагировали полипептиды при помощи ДДС-Na. Для фракционирования образцов был использован метод микроэлектрофореза на плоских ПААГ в присутствии ДДС-Na [24].

Сопоставление полипептидов трех исследованных видов нейронов позволило выявить специфичность для НГЯ полипептидной фракции с M_r 8,8 кД а для ННКТ—фракции с M_r 9,5 кД (рис. 4, фракции № 17 и 15 соответственно).

Таким образом, ультрамикроэлектрофорез представляет исследователям возможность сравнивать белки и полипептиды отдельных идентифицированных нейронов (тест на специфичность) и их изменения в различных экспериментальных условиях (тест на пластичность). Метод применим для анализа белков и полипептидов отдельных клеток мозга позвоночных животных, несмотря на их малые размеры, чрезвычайно низкие концентрации веществ, а также множественность и сложность синаптических связей.

Главный интерес и перспективу представляют «гибридные» методы, сочетающие чувствительность иммунохимических тестов с решением микрохимических способов оценки индивидуальных антигенов нервной системы.

ULTRAMICROELECTROPHORETIC SEPARATION OF POLYPEPTIDES FROM NEURONAL STRUCTURES

SHTARK M. B., MIKICHUR N. I., VERETENNIKOV N. A.

Institute of Automatics and Electrometry, Acad. Sci. of the USSR, Siberian Division; Institute of Clinical and Experimental Medicine, Acad. Med. Sci of the USSR, Siberian Division, Novosibirsk

Different variants of ultramicroelectrophoretic techniques used when studying proteins and peptides from different brain structures, neurons and their organelles are analysed. Consecutive procedures of isolation of these structures and their treatment are examined; peculiarities of fractionation in gels with uniform pore diameter and in gradient gels, noncapillary variants of ultramicroelectrophoresis, combined methods of analysis, counter-immunodiffusion, impregnation methods are presented. The advantages and perspectives of further use of these methods are discussed.

ЛИТЕРАТУРА

1. Даниловский М. А. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 84, № 11, с. 556—559, 1977.
2. Gainer H. Anal. Biochem., v. 41, p. 539—605, 1971.
3. Наулюва Л. П. Исследование природы цитоплазматического градиента распределения РНК у *Acellularia mediterranea* методами ультрамикрoанализа, канд. дис., Новосибирск, ННХ СО АН СССР, 1976.
4. Neuhoﬀ V.—In: *Micromethods in Molecular Biology*. Berlin—Heidelberg—New York, Springer-Verlag, p. 1—85, 1973.
5. Крылова И. Н., Микичур Н. И.—В кн.: Новые методы для медицинской практики и медико-биологических исследований, с. 71—75, Новосибирск, 1983.
6. Гринкевич Л. Н. Исследование белковых спектров командных нейронов оборонительного поведения виноградной улитки при обучении, канд. дисс., Новосибирск, Институт автоматизации и электрометрии СО АН СССР, 1980.
7. Neuhoﬀ V. *Arzneimittel Forsch.*, Bd. 8, p. 35—38, 1968.
8. Davis B. J. *Disc-electrophoresis*. Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 121, № 2, p. 404—427, 1964.
9. Maurer K. *Disk-electrophoresis*. Walter de Gruyter, Berlin, 1968.
10. Остерман Л. А. Электрофорез и ультрацентрифугирование, М., Наука, 1981.
11. Pun J. V., Lombroso L. Anal. Biochem., v. 9, p. 9—20, 1964.
12. Osborne N. N. Oxford, New-York, Toronto, Sydney; Pergamon Press, 1974.
13. Морозов В. В. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 80, № 9, с. 120—121, 1975.
14. Grossbach U. *Techniques of biochem. and biophys. morphology*, v. 3, p. 81—101, 1977.
15. Заалишвили Э. А. Изв. АН ГССР. Сер. биол. н., т. 2, № 4, с. 329—332, 1976.
16. Штark М. Б. Иммунонейрофизиология, Л., Медицина, 1978.
17. Ruchel R., Mesecke S., Wolfrum D., Neuhoﬀ V. *Hoppe-Seyler's. Z. physiol. Chem.*, Bd 354, p. 1351—1368, 1973.
18. Ruchel R., Mesecke S., Wolfrum D., Neuhoﬀ V., Hoppe-Seyler's, Z. physiol. Chem., Bd 355, p. 997—1020, 1974.
19. Бердников В. А., Слободянюк С. Я. Биохимия, т. 43, с. 1001—1005, 1978.
20. Любославский В. А., Микичур Н. И.—В кн.: Новые методы научных исследований

- в клинической и экспериментальной медицине, с. 59—62. Новосибирск, СО АМН СССР, 1980.
21. Веретенников Н. А., Микучур Н. И. Бюл. экперим. биол. и мед., т. 95, № 4, с. 124—126, 1983.
 22. Feldenhauer K. Biochim. et biophys. acta, v. 160, № 2, p. 267—269, 1968.
 23. Dames W., Maurer U. R., Neuhoﬀ V. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., v. 35, p. 554—558, 1972.
 24. Веретенников Н. А., Микучур Н. И.—В кн.: Новые методы для медицинской практики и медико-биологических исследований, с. 75—79, Новосибирск, СО АМН СССР, 1983.
 25. Laemmli U. K. Nature, v. 227, № 5259, p. 670—685, 1970.
 26. Neuhoﬀ V., Philipp K., Zimmer H. G., Mesecke S. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., v. 360, p. 1657—1670, 1979.
 27. Switzer R. C., Merril C. R., Shifrin S. Anal. Biochem., v. 98, p. 231—237, 1979.
 28. Oakley B. R., Kirsh D. R., Morris N. R. Anal. Biochem., v. 105, p. 361—363, 1980.
 29. Poehling H.—M., Neuhoﬀ V. Electrophoresis, v. 2, p. 141—147, 1981.
 30. Poehling H.—M., Neuhoﬀ V. Electrophoresis, v. 1, p. 90—102, 1980.
 31. Merril C. R., Dunau M. L., Goldman D. Anal. Biochem., v. 110, № 1, p. 201—202, 1981.
 32. O'Farrell P. H. J. Biol. Chem., v. 250, p. 4007—4021, 1975.
 33. Веретенников Н. А., Леонтович Т. А., Микучур Н. И., Штарк М. Б. Ультрамикρο-электрофоретические исследования нейронных структур. Препринт № 207 ИАН СО АН СССР, Новосибирск, 1983.
 34. Ansorg R., Dames W., Neuhoﬀ V., *Arzneim.-Forsch (Drug Res.)*, Bd. 21, № 5, p. 699—710, 1971.
 35. Корочкин Л. И. Цитология, т. 14, 670—673, 1972.
 36. Wilson D. L. J. Gen. Physiol., v. 57, p. 26—40, 1971.
 37. Shapiro A. L., Vinuela E., Maizel J. M. Biochem. and Biophys., Res. Commun., v. 28, p. 815—822, 1967.
 38. Neville D. M. Biochim. et biophys. acta, v. 133, p. 168—170, 1967.
 39. Loh Y. P., Peterson R. P. Brain Res., v. 78, p. 83—98, 1974.
 40. Osborne N. N., Ruchel R. J. Chromatogr., v. 105, p. 197—200, 1975.
 41. Hyden H., Lange P. W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci. v. 64, № 4, p. 898—904, 1970.
 42. Althaus H. H., Eriel G., Dames W., Neuhoﬀ V.—In: Sonderforschungsbereich 33, p. 107—121, Nervensystem und biologische Information, Göttingen, 1969—1972.
 43. Микучур Н. И., Веретенников Н. А.—В кн.: Новые методы для медицинской практики и медико-биологических исследований (под ред. Ю. П. Никитина), с. 50—52, Новосибирск, СО АМН СССР, 1983.

Поступила 12. II 1986



ХРОНИКА

МЕЖДУНАРОДНЫЙ СИМПОЗИУМ ПО
НЕЙРОЭНДОКРИНОЛОГИИ
(Ленинград, август, 1985 г.)

19—23 августа 1985 г. в Ленинграде проходил Международный симпозиум «Взаимодействие пептидных и моноаминовых нейрогормонов в нейроэндокринной регуляции», организованный Международным и Советским национальным комитетами Международной организации по изучению мозга (ИБРО), Академией наук СССР и Институтом эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова АН СССР.

Был избран Международный оргкомитет симпозиума в следующем составе: *Б. Шарер* (США), *Л. Мартини* (Италия), *Б. Флерко* (Венгрия), *Г. Стерба* (ГДР), *В. Пантич* (Югославия), *А. Л. Поленов* (СССР).

В состав Советского национального комитета вошли: проф. *А. Л. Поленов* (председатель), академик АН СССР *П. Г. Костюк*, член-кор. АН АрмССР *А. А. Галоян* — члены ИБРО, член-кор. АН СССР *В. Л. Сви́дeрский*.

В работе симпозиума приняли участие 189 человек, из них 149 из 22 городов Советского Союза и 40 иностранных ученых из 11 стран: Болгарии, Венгрии, ГДР, Чехословакии, Югославии, Англии, Бельгии, Италии, Канады, Франции и ФРГ. Участники симпозиума заслушали 51 доклад, из них 9 докладов-лекций и ознакомились с 59 стендовыми сообщениями.

Представленные на симпозиуме доклады были посвящены следующим проблемам: 1. Химия пептидных и моноаминовых нейрогормонов; 2. Взаимодействие пептидных и моноаминовых нейрогормонов в нейроэндокринной регуляции; 3. Структура и развитие пептидергических и моноаминергических нейросекреторных клеток; 4. Нейропептиды мозга и нейроэндокринные процессы; 5. Взаимодействие нейрогормонов с рецепторами органов-мишеней.

Химическое строение пептидных нейрогормонов у позвоночных было главной темой доклада *Р. Аше* (Франция), который изложил оригинальную концепцию об эволюции генов, контролирующих синтез нейрогипофизарных гормонов. Доклад *А. А. Галояна* и соавт. (Ереван) был посвящен действию нейрогормона «С» на синтез, обратный захват и выделение катехоламинов в гипоталамической области у крыс. В сообщении *Б. Букуя* и соавт. (Венгрия) была подчеркнута роль неспецифической эстеразы гипоталамуса в дифференцировке и развитии гормональной функции в перинатальном онтогенезе у крысы и плодов человека. В докладе *Б. Я. Гурвиц* и соавт. (Ереван) приведены данные о новых факторах, модулирующих фосфоэстеразную активность циклических нуклеотидов гипоталамуса быка. *В. Я. Кононенко* и соавт. (Киев) представили данные об участии ГАМК и нейропептидов в механизмах центральной регуляции гипоталамо-гипофизарной-адренкортикальной системы. В сообщении *Г. А. Сарибекян* и соавт. (Ереван) изложены данные о влиянии гипоталамического гексапептида на активность двух форм сАМР ФДЕ. *Ф. Ласло* и соавт. (Венгрия) представили доказательства благоприятного действия вазопрессина на процессы памяти у человека, а *Г. Шварцберг* (ДГР) показал действие окситоцина на серотониновые системы мозга и функцию опятных рецепторов.

Е. Бауманом и соавт. (ГДР) из церебральных ганглиев таракана изолирован пептидный нейрогормон Д, который ускоряет сердечную пульсацию и является членом семейства пептидов беспозвоночных.

На симпозиуме преобладали доклады морфологического и физиологического профиля, однако все данные этих докладов были получены с помощью химических методов на уровне световой и электронной микроскопии. С помощью иммуноцитохимического, радиоиммунологического и автордиографического методов, световой и электронной микроскопии изучено строение и развитие пептид- и моноаминергических клеток.

Б. Флерко и соавт. (Венгрия) продемонстрировали в гипоталамусе крысы локализацию специализированных нервных клеток, синтезирующих пептидные нейрогормоны люлиберин (регулирующий функции половых желез) и кортиколиберин (регулирующий функцию надпочечников). *М. В. Угрюмов* и соавт. (Москва) представили данные о созревании люлиберинной и серотонинергической систем гипоталамуса в перинатальном онтогенезе у крыс. Авторы предполагают, что люлиберин и серотонин модулируют рост и дифференцировку развивающегося мозга.

В гипоталамусе обнаружены многочисленные нейрогормоны и нейротрансмиттеры. Однако наши знания о связях между нейронами, содержащими различные биологически активные вещества, весьма ограничены. Комбинируя электронномикроскопическую автордиографию и иммуноцитохимический метод, *Б. Халас* и соавт. (Венгрия) обнаружили в гипоталамусе крысы следующие синаптические контакты серотонинергических терминалей с перикарионами и дендритами клеток пептидной и моноаминовой природы: 1—в супрахиазматическом ядре с клетками, содержащими вазоактивный интестинальный пептид; 2—в аркуатном ядре с АКТГ и дофаминергическими клетками; 3—с люлибериновыми клетками гипоталамуса. Полученные данные позволяют сделать вывод о прямом влиянии серотонинергических элементов на указанные выше клетки пептидной и дофаминовой природы.

Данные о взаимодействии пептид- и моноаминергических нейрогормонов в нейроэндокринной регуляции у млекопитающих в норме были представлены в докладах *В. Н. Бабичева* (Москва) и *О. Н. Савченко* (Ленинград), при стрессе—в сообщениях *В. Пантича* (Югославия) и *А. Л. Поленова* и соавт. (Ленинград), после хронического введения алкоголя—в докладах *И. А. Држевецкой* (Ставрополь) и *М. С. Константиновой* и соавт. (Ленинград).

Таким образом, стремительное развитие нейроэндокринологии позволило получить данные о локализации и строении пептидных и моноаминовых нейрогормонов мозга, их влиянии на ЦНС и участии в нейроэндокринном контроле. Появилась возможность использовать в медицине синтезированные аналоги пептидных и моноаминовых нейрогормонов для лечения ряда заболеваний нервной и эндокринной систем. В связи с этим очевидна своевременность Международного форума нейроэндокринологов для обсуждения накопленных фактов и предложенных концепций и перспектив развития науки.

В заключительном слове проф. *А. Л. Поленов* отметил, что главное значение проведенного симпозиума в том, что он способствовал дальнейшей разработке общих принципов нейроэндокринной регуляции вегетативных функций организма. Целый ряд представленных на симпозиуме работ имеет практическую значимость, и их результаты могут быть использованы в практическом здравоохранении, а также в сельском хозяйстве и рыбоводстве. Симпозиум способствовал ознакомлению с новейшими достижениями мировой науки, предоставил возможность широко обсудить наиболее сложные и спорные вопросы с ведущими специалистами, а также наглядно показал, что отечественная нейроэндокринология успешно развивается и привлекает к себе все большее внимание.

КОНСТАНТИНОВА М. С.

1 ВСЕСОЮЗНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ «НЕЙРОПЕПТИДЫ: ИХ РОЛЬ В ФИЗИОЛОГИИ И ПАТОЛОГИИ» (Томск, ноябрь, 1985 г.)

19—20 ноября в Томске состоялась I Всесоюзная конференция по проблеме «Нейропептиды: их роль в физиологии и патологии», организованная Всесоюзным кардиологическим центром и его Сибирским филиалом. Участниками конференции были представители многих городов страны, что свидетельствует о широком размахе исследований по проблеме нейропептидов. Работа конференции проходила в 3-х основных направлениях: синтез и биохимические механизмы образования и деградации нейропептидов (НП), роль НП в физиологии и патологии и клиническое применение НП.

В докладах, посвященных экспериментальному исследованию биологического действия НП, были приведены дополнительные подтверждения положения о многообразии эффектов (полифункциональности) НП, их участии в регуляции разнообразных функций организма, развитии отставленных во времени эффектов, а также новые материалы о механизмах действия НП в условиях нормы и патологии.

Показано участие НП в развитии аллергических реакций, в частности, обнаружено повышение содержания эндорфинов в крови у больных бронхиальной астмой, пропорциональное тяжести клинических проявлений инфекционно-аллергической и атопической форм астмы. При лечении астмы кортикостероидами содержание эндорфинов в крови снижалось (А. А. Адо и соавт., Москва).

В ряде докладов были приведены данные об участии НП в формировании алкогольной мотивации (А. В. Азаров, Л. Ф. Келесова, Н. Л. Куликова, Москва). При этом внутрижелудочковое введение Leu-энкефалина и энкефалиноподобного тетрапептида уменьшало, а введение β -эндорфина увеличивало потребление алкоголя крысами с выработанной алкогольной мотивацией в условиях свободного выбора воды и этанола. Ю. В. Буров, А. И. Майский (Москва) обнаружили зависимость содержания пептида дельта-сна в мозгу от предрасположенности крыс к потреблению этанола.

А. В. Вальдман, М. М. Козловская и В. А. Арсенов (Москва) представили доказательства связи иммуно- и нейромодулирующих свойств НП. По их данным, НП, обладающие иммуностимулирующими свойствами, обнаруживают также психотропную активность, и наоборот. Авторы особо подчеркивают, что модулирующие эффекты НП в большей мере выражены при состояниях дезадаптации, чем в условиях физиологической нормы.

В ряде сообщений были представлены материалы о роли НП в формировании стресса. Так, Л. А. Алекминская (Томск) показала, что в ранние сроки стресса (экспериментальный инфаркт миокарда) энкефалины интенсифицируют выброс катехоламинов из надпочечников с дальнейшей их деградацией за счет активации моноаминоксидазы; стрессиндуцированное усиление метастазирования лимфосаркомы, по данным Е. Н. Амосовой и соавт. (Томск), снижается аналогом Leu-энкефалина. Под влиянием стресса в плазме крови повышается содержание Leu- и Met-энкефалина (Е. С. Аргинтаев, Томск), введение Leu- и Met-энкефалина, морфина и налоксона полностью подавляет стрессиндуцированный выброс в кровь кортикостерона. Ю. Б. Лишманов и соавт. (Томск) привели экспериментальные доказательства антистрессового действия опиоидных пептидов на стадии тревоги, что способствует повышенной резистентности к патогенному действию стресс-реакции на стадии истощения.

Целый ряд докладов был посвящен участию НП в регуляции деятельности ЦНС. Среди них привлекают внимание сообщение Г. Н. Легостаева (Москва), показавшего, что при микроионофоретическом подведении к нейронам виноградной улитки Leu- и Met-энкефалина изменяется чувствительность этих нейронов к «классическим» нейромедаторам и доклады А. Г. Камкина и соавт. (Рига) и И. С. Киселевой и соавт. (Москва), в которых рассмотрено участие НП в регуляции эффективности синаптической передачи. С. К. Судаков (Москва) показал значение вазопрессина и окситоцина в механизмах доминирования пищевой и оборонительной мотиваций, что способствует пониманию роли этих НП в процессах обучения и памяти. Р. И. Круг-

ликов (Москва) рассмотрел некоторые принципы исследования действия НП на интегративную деятельность мозга, в частности особенности используемых в таких исследованиях методических приемов.

О роли НП в регуляции сна сообщил *В. М. Ковальзон* (Москва), обративший внимание на отсутствие убедительных доказательств гипногенного действия пептида дельта-сна, хотя ряд синтетических аналогов этого пептида проявляет выраженную гипногенную активность. В докладе были также представлены данные о гипногенном влиянии мурамыл-пептидов. Об отставленных биохимических и электрофизиологических эффектах НП сообщили *Л. М. Герштейн* и соавт. (Москва).

В связи с одной из актуальнейших проблем современной нейробиологии—«транспортом памяти», в том числе патологических состояний и функциональной асимметрии мозга большой интерес представил доклад *Г. Н. Крыжановского, В. К. Луценко, М. Ю. Карсанова* (Москва), посвященный роли НП в формировании патологической системы в ЦНС. Авторы сообщили о возможности транспорта с помощью экстрактов спинного мозга патологически усиленного одностороннего тонуса мышц задних конечностей. Транспортирующий фактор имеет пептидную природу, что подтверждает важную роль НП в формировании определенных патологических систем в ЦНС. Обнаружено также выраженное влияние опиоидных пептидов, даларгина и вещества «Р» на процессы роста в культуре нервной ткани (*М. В. Козлова* и соавт., Москва). Были с интересом выслушаны доклады, посвященные и другим аспектам биологического действия НП, в частности, связи НП с перекисным окислением липидов (*А. Е. Губарева* и соавт., Ростов-на-Дону; *И. Ю. Иноземцев* и *В. С. Павленко*, Томск), участию НП в патогенезе некоторых эндокринных расстройств (*Г. В. Валуева, В. Н. Славнов* и соавт., Киев; *В. И. Чможданов* и соавт., Москва и др.).

В докладе *О. Б. Ильинского* и соавт. (Москва) были представлены данные о благотворном влиянии ряда синтетических НП, в особенности даларгина, на заживление полнослойных кожных ран спины у экспериментальных животных. Этот эффект наблюдается как при внутрибрюшинном и внутримышечном введении, так и при местном применении.

На конференции были широко представлены доклады, посвященные применению НП в клинике. В известном смысле конференция явилась своеобразным смотром результатов внедрения НП в клиническую практику. Из успешно примененных в клинике НП наибольшее внимание было уделено аналогу Лей-энкефалина—даларгину. В докладах *А. А. Виноградова* и *В. М. Полонского* (Москва) были приведены в целом весьма обнадеживающие материалы о лечении даларгинном язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки: даларгин в 6—7 раз снижает частоту и тяжесть язвообразования при экспериментальном воспроизведении дуоденальной язвы введением крысам цистеаминна. Подчеркивалось, что лечебное действие даларгина связано с прямым протективным действием на слизистую двенадцатиперстной кишки. Весьма существенно, что в отличие от широко применяемых в настоящее время противоязвенных препаратов он не оказывает выраженного действия на эндокринную систему.

Выраженный лечебный эффект даларгина наблюдался также при разных формах острого панкреатита (*А. К. Георгадзе* и соавт. Москва), язвенного колита (*А. З. Златкина* и соавт., Москва).

В ряде докладов, представленных, в основном, сотрудниками Сибирского филиала Всесоюзного кардиологического научного центра АМН СССР (Томск), были показаны результаты лечебного применения даларгина при различных формах сердечно-сосудистой патологии. По данным *А. И. Потапова* и соавт. (Томск), даларгин оказывает выраженный лечебный эффект при остром инфаркте миокарда. *Г. К. Золотов* и *В. Д. Поярков* (Томск) сообщили об успешном применении даларгина при облитерирующем атеросклерозе нижних конечностей. В ходе лечения снижалось содержание иммуноглобулинов, холестерина и общих липидов в крови, нормализовался гемостаз. *Л. А. Алекшинская* и соавт. (Томск) обнаружили, что под влиянием внут-

ривенного введения далагрина у больных с острым инфарктом миокарда и различными нарушениями ритма сердца снижается содержание в плазме крови адреналина и норадреналина, повышающихся вследствие заболевания. Эти данные, как указывают авторы, обуславливают антистрессорное действие далагрина за счет его симпатолитического действия.

Обобщая результаты применения НП в психиатрической клинике, А. И. Белкин (Москва) обратил внимание на бинарные эффекты НП—нейросоматотропные и психотропные. Как показывает клиническая практика, психотропные эффекты НП зависят, от установки личности и конкретных условий лечения. В докладе были также представлены данные о способности некоторых НП дезактуализировать эмоционально значимые для больного переживания и усиливать суггестивные эффекты.

На конференции были широко представлены материалы, касающиеся изучения биохимических механизмов образования и распада биологически активных пептидов Р. У. Островская и соавт. (Москва) представили данные о связи структуры и антидепрессантной активности тиролиберина. Ни один из синтезированных ими дипептидов на основе пироглутаминовой кислоты не проявлял антидепрессантного действия, что является новым доказательством важной роли С-концевого фрагмента тиролиберина в проявлении его антидепрессантной активности. Авторы полагают, что в основе обнаруженного ими антидепрессантного эффекта амида пироглутаминовой кислоты, являющейся ингибитором пироглутамиламинопептидазы, лежит замедление деградации тиролиберина, что подтверждено в опытах с другими ингибиторами этого фермента.

В сообщении Н. В. Породенко и соавт. (Москва), изучавших регуляцию рецепторов энкефалинов ионами металлов, идентифицирована природа функциональных групп регуляторных катионсвязывающих участков рецептора мембран головного мозга крыс. С помощью метода химической модификации рецепторов диэтилпирукарбонатом и молибдатом аммония, а также изучения корреляционной зависимости K_d комплексов ионов металлов с катионсвязывающим участком рецепторов от значений констант нестойкости комплексов соответствующих катионов с модельными соединениями доказано, что регуляция высокоаффинной рецепции 3H -Tyr¹, D-Ala², D-Leu⁵-энкефалина опосредуется взаимодействием катионов металла с остатком кислого фосфата, а низкоаффинной—с имидазольной группой остатка гистидина регуляторного участка рецептора.

В докладах О. Л. Исаковой и Н. Ф. Сенетова приведены данные об устойчивости аналогов далагрина к действию протеиназ сыворотки крови, изученной с помощью метода Н¹-ЯМР спектроскопии. Авторами показано, что в отличие от Leu-энкефалина-Arg⁶, деградация которого происходит как с N-, так и с С-конца, расщепление далагрина происходит в С-концевой части молекулы с помощью дипептидил-карбоксипептидазы, отщепляющей Leu-Arg и карбоксипептидазы, удаляющей С-концевой остаток Arg. Таким образом, введение D-Ala² удлиняет время полужизни пептида, защищая его от действия аминопептидаз крови. Замена L-Leu и L-Arg на правоповращающие изомеры также удлиняет время полужизни далагрина, рассчитанное методом Н¹-ЯМР-спектроскопии и равное 2 мин при концентрации пептида меньше 10^{-6} М. Эта величина коррелирует с таковой, рассчитанной методом радиоиммуннохимического анализа и ВЭЖХ.

В. И. Леонов и соавт. (Минск) на основе компьютерного анализа высказали гипотезу о возможном образовании в плазме крови пептапептида, фрагмента β-цепи фибриногена Tyr³²⁶-Gly-Gly-Phe-Trp³³⁰, отличающегося от энкефалинов С-концевым остатком. Теоретический конформационный анализ молекулы Trp³³⁰-энкефалина указывает на сходство его конформации с таковой Met-энкефалина.

А. Г. Камкин и соавт. (Рига) на примере участия линейных и циклических аналогов АКГГ—¹⁰ в регуляции эффективности синаптической передачи в нервных ганглиях улитки прудовика подтвердили концепцию о том, что квазициклизация приводит к повышению биологической активности (за счет увеличения эффективности лиганд-рецепторного взаимодействия) и продлонгированию эффекта линейных пептидов (путем увеличения резистентности к действию протеиназ).

О. Г. Кривошеев и соавт. (Москва) представили данные, свидетельствующие о том, что пептид-морфоген гидры, обнаруженный в гипоталамусе и крови ряда животных и человека, ускоряет половое созревание крыс, стимулируя продукцию фолликулостимулирующего гормона и изменяя стероидогенез в яичниках.

М. А. Пономарева-Степная и соавт. (Москва) обнаружили седативный эффект синтетического декапептида—аналога АКГГ₄₋₇: Pro-Gly-Pro-Met-Glu-Gis-Phe-Pro-Gly-Pro. Этот пептид при введении его п/б крысам в дозе 0,005—0,015 мг/кг веса наряду с седативным действием стимулирует обучение животных. Увеличение дозы до 2 мг/кг не изменяет физиологического состояния организма животных.

В докладе А. В. Азарян и соавт. (Ереван) представлены данные, свидетельствующие о том, что в условиях *in vitro* катепсин В головного мозга человека способен генерировать вазопрессорный октапептид ангиотензин II из ангиотензина I. Учитывая существующую точку зрения о том, что в ткани головного мозга существует более чем один фермент, образующий ангиотензин II, авторы высказали предположение о возможном участии катепсина В в образовании ангиотензина II в физиологических условиях.

Свидетельствуя о неуклонном возрастании интереса к проблемам изучения биологического действия НП, материалы конференции убедительно показали, что имеется все больше оснований видеть в НП лечебные факторы, которым, по-видимому, предстоит сыграть большую роль в становлении фармакологии будущего. Это в полной мере обосновывает интерес к проблеме НП и стимулирует работу по дальнейшему изучению механизмов их биологического действия как основы эффективного клинического использования.

КРУГЛИКОВ Р. И.
АЗАРЯН А. В.

ЗАМЕЧЕННЫЕ ОПЕЧАТКИ

Страница	Строка	Напечатано
279	4 сверху	субстрат динаминооксидазы
285	11 сверху	С I-квартала 1978 года
288	12 снизу	ингибиторный эффект опиодов
291	4 снизу	$129,6 \pm 8,7$
291	3 снизу	$96,7 \pm 7,7$
293	8 снизу	ИЗУЧЕНИЕ СИНТЕЗА
294	4 снизу	спектрометре ченный осадок растворяли в 0,5мл 1% ном ДДС—Na при 60° и вносили в диок—„Intertechnique SL— 400“, Франция
311	5 сверху	подробно изложенный в ряде обзоров
333	3 сверху	Томск, ноябрь, 1985 г.
335	5 снизу	АКТГ—1

Следует читать

субстрат диаминооксидазы
С I квартала 1987 года
ингибиторный эффект
опиондов

129,6 $\pm$ 18,7

96,7 $\pm$ 1,7

ИЗУЧЕНИЕ СИНТЕЗА
спектрометре „Intertech-
nique SL-400“, Франция

подробно изложены в ряде
обзоров

Томск, ноябрь, 1985 г.

АКТГ₄-10

СОДЕРЖАНИЕ

Базян А. С., Кругликов Р. И. Регуляция высвобождения ³ H-норадреналина прессинаптическими α- и β-адренорецепторами в срезах коры мозга крыс	231
Захарян Р. А., Рычков Г. Е., Дадалян С. С., Бакунц И. С., Агабалян А. С., Рухкян Л. А., Айрапетян С. Н. Действие двухпочечной РНК на мембранные процессы пейсмейкерного нейрона	239
Хачатрян Г. С., Вартанян Г. Г. Распределение гистамина в различных отделах головного мозга и активность диаминооксидазы при терминальных состояниях, восстановлении жизненных функций организма и действии физиологически активных веществ	247
Товмасын А. Х., Минеева М. Ф., Казарян Б. А. Участие ГАМК в регуляции активности тирозингидроксилазы гипоталамуса крысы	257
Бресткин А. П., Ковалев Н. Н., Розенгарт Е. В., Хованских А. Е., Федорец Ю. А., Эпштейн Л. М. Субстратно-ингибиторная специфичность холинэстеразы нервной ткани командорского кальмара	264
Хватова Е. М., Гарсия А. Кинетические характеристики очищенной и мембрано-связанной митохондриальной малатдегидрогеназы мозга	270
Хужамбердиев М., Сайдудлаев Т., Мамадиев М., Горкин В. З. Нарушения катаболизма биогенных аминов и других азотистых соединений в головном мозгу при экспериментальном атеросклерозе	277

Краткие сообщения

Калман М., Чифликян М. Д., Армениян А. Р., Галоян А. А. Стимулирующее действие морфина на высвобождение норадреналина из синапсом	286
Окон Е. Б., Семенова Т. П., Грищенко Е. И. Снижение активности сукцинатдегидрогеназы в коре головного мозга крыс при хронической химической депривации катехоламинергических систем	290
Соломония Р. О., Микеладзе Д. Г. Изучение синтеза синапсомных гликопротеинов вентромедиального гиперстриатума цыплят в процессе импринтинга	293
Галоян К. А., Давтян М. А., Срапионян Р. М. Влияние нейрогормонов «К» и «С» на активность аргиназы мозга и печени крыс	297

Методы исследования

Волощук С. Г., Акулов И. Н., Лаптев А. В., Демушкин В. П. Двумерный электрофорез водорастворимых белков головного мозга собаки	302
--	-----

Обзоры

Долго-Сабуров В. Б. Метаболизм фосфоинозитидов и нейрогуморальная регуляция	306
Штарк М. Б., Микичур Н. И., Веретенников Н. А. Ультрамикроэлектрофоретическое фракционирование полипептидов нейронных структур	314

Хроника

Константинова М. С. Международный симпозиум по нейроэндокринологии (Ленинград, август, 1985 г.)	331
Кругликов Р. И., Азарян А. В. I Всесоюзная конференция «Нейропептиды: их роль в физиологии и патологии» (Томск, ноябрь, 1985 г.)	333

CONTENTS

<i>Bazyan A. S., Kruglikov R. I.</i> Involvement of presynaptic α - and β -adrenoreceptors in the release of ^3H -noradrenaline in rat brain cortex slices	231
<i>Zakharian R. A., Richkov G. E., Agabalian A. S., Dadalian S. S., Bakunts I. S., Rukhkian L. A., Ayraperyan S. N.</i> Effect of double-strand RNA on the membrane of pace-maker neuron	239
<i>Khachatryan G. S., Vartanyan G. G.</i> Distribution of histamine and diaminoxidase in different brain regions, in terminal condition, during rehabilitation and effect of physiologically active compounds	247
<i>Tovmasyan H. Kh., Mineeva M. F., Kazaryan B. A.</i> Involvement of GABA in the regulation of tyrosine hydroxylase activity in rat hypothalamus . . .	257
<i>Brestkin A. P., Kovaljev N. N., Rozengart E. V., Khovanskikh A. E., Fedoretz U. A., Epstein L. M.</i> Substrate specificity and susceptibility to inhibitors of Komandor's squid nervous tissue cholinesterase	264
<i>Khvatova E. M., Garcia A.</i> The kinetic characteristics of membrane-bound and purified brain mitochondrial malate dehydrogenase	270
<i>Khuzhamberdiev M., Saidullayev T., Mamadiev M., Gorkin V. Z.</i> Changes in the catabolism of biogenic amines and other amino compounds in brain under experimental atherosclerosis	277

Short communications

<i>Kalman M., Chiflikian M. D., Armenian A. R., Galoyan A. A.</i> Morphine stimulated release of noradrenaline and GABA from rat brain stem synaptosomes	286
<i>Okon E. B., Semenova T. P., Grishchenko N. I.</i> Decrease in rat neocortex succinate dehydrogenase activity after chronic chemical deprivation of catecholaminergic system	290
<i>Solomonina R. O., Mikeladze D. G.</i> Synaptosomal glycoprotein synthesis in chicken medial ventral hyperstriatum during imprinting	293
<i>Galoyan K. A., Davtyan M. A., Srapiyan R. M.</i> Effect of neurohormones "K" and "C" on arginase activity in rat brain and liver	297

Methods

<i>Voloshchuk S. C., Akulov I. N., Laptev A. V., Demushkin V. P.</i> Two-dimensional electrophoresis of water-soluble dog brain proteins	302
--	-----

Reviews

<i>Dolgo-Saburov V. B.</i> Metabolism of phosphoinositides and neurohumoral regulation	306
<i>Shtark M. B., Mikichur N. I., Veretennikov N. A.</i> Ultramicroelectrophoretic separation of polypeptides from neuronal structures	314

Chronicles

<i>Konstantinova M.</i> International symposium on Neuroendocrinology (Leningrad, August, 1985)	331
<i>Kruglikov R. I., Azaryan A. V.</i> I-st All-Union Conference "Neuropeptides and their role in physiological and pathological conditions" (Tomsk, November, 1985)	333

21. *Гаришвили Т. Г., Кривченко Р. С., Горкин В. З.* *Вопр. мед. химии*, т. 21, с. 511—518, 1975.
22. *Горкин В. З., Аюлян Ж. И., Верекина И. В., Гриднева Л. И., Стасина Л. Н.* *Биохимия*, т. 35, с. 140—151, 1970.
23. *Гаришвили Т. Г., Горкин В. З.* *Сообщ. АН СССР*, т. 89, с. 185—188, 1978.
24. *Горкин В. З.* *Нейрохимия*, т. 4, № 1, с. 68—79, 1985.
25. *Горкин В. З., Хужамбердиев М., Мамадиев М.* *Успехи гепатологии*, т. 11, с. 40—51, 1985 г.

Поступила 7. II 1986

К СВЕДЕНИЮ ЧИТАТЕЛЕЙ!

С 1 квартала 1978 года в издательстве «Наука» будет выходить новый ежеквартальный журнал «Сенсорные системы».

В журнале будут освещаться различные аспекты физиологии органов чувств. В соответствии с комплексным, междисциплинарным характером исследований в области сенсорной физиологии в журнале будут публиковаться оригинальные работы по следующим основным направлениям:

- молекулярные, мембранные и клеточные механизмы сенсорной рецепции;
- нейрофизиологические механизмы передачи и переработки информации на всех уровнях сенсорных систем;
- нейро- и психофизиологические механизмы реализации сенсорной информации, опознания образов;
- моделирование сенсорных процессов и функций;
- широкий круг прикладных аспектов, в том числе медицинских, робототехнических, оптимизации операторской деятельности, восприятие сенсорной информации в процессах обучения и различного рода трудовой деятельности.

Кроме статей экспериментального характера, будут печататься обзоры по актуальным проблемам сенсорной физиологии, а также рецензии на книги и информация о конференциях по этой тематике.

Журнал рассчитан как на специалистов в области нормальной и патологической физиологии, биофизики, психологии сенсорного восприятия, так и на широкий круг биологов, медиков, инженеров, педагогов, интересующихся современным состоянием и перспективами развития физиологии органов чувств.

На журнал «Сенсорные системы» можно подписаться в отделениях «Союзпечати», на почте и у общественных распространителей. Индекс журнала 70810 в «Каталоге советских газет и журналов» на 1987 год. Подписная цена за 4 номера в год — 5 р. 20 коп., за каждый номер — 1 р. 30 коп.

Адрес редакции: 117312, Москва, В-312, ул. Вавилова, 39, ком. 20.