

том 6, № 1, 1987

ISSN 0203-493X

НЕЙРОХИМИЯ

ՆԵՅՂՈՔԻՄԻԱ



АКАДЕМИЯ НАУК СССР
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

НЕЙРОХИМИЯ

ՆԵՅՐՈՔԻՄԻԱ

ТОМ 6, ВЫП. 1
январь—март

Материалы докладов конференции «Функциональная нейрохимия белков, пептидов, трансммиттеров». Ереван, 10—12 сентября 1986 г.

Журнал основан в 1982 году
Выходит 4 раза в год

ИЗДАТЕЛЬСТВО АН АРМЯНСКОЙ ССР
ЕРЕВАН 1987

Ст. редактор Э. А. Хачатурова
Лит. сотрудник Г. Р. Григорян
Тех. редактор Л. А. Азизбекян

Сдано в набор 29.01. 1987 г. Подписано к печати 15.04.1987 г. ВФ 01633.
Бумага № 1, 70×108^{1/16}. Высокая печать. Печ. лист. 9,75+1 вкл. Усл.- печ. лист. 13,8.
Учет.-изд. 11,7. Тираж 590. Заказ 25. Издат. 6999.

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),
А. 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. ПРОМЫС-
ЛОВ, В. И. РОЗЕНГАРТ, Т. М. ТУРПАЕВ, А. Я. ТЯХЕПЫД,
Г. С. ХАЧАТРЯН

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, А. А. СИМОНЯН, А. М. УТЕВСКИЙ,
Е. М. ХВАТОВА, А. С. ЧЕРКАСОВА, Р. Н. ЭТИНГОВ



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

ГЛИКОПЕПТИДНЫЕ ГОРМОНЫ ГИПОТАЛАМУСА В РЕГУЛЯЦИИ МЕТАБОЛИЗМА Ca^{2+} , ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ И КАТЕХОЛАМИНОВ

ГАЛОЯН А. А.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Изолированы и идентифицированы из гипоталамуса животных множественные формы метаболически активных кардиотропных нейропептидов гликопептидной природы, являющихся внутриклеточными регуляторами активности ферментов обмена циклических нуклеотидов, содержания Ca^{2+} . Нейрогормон «С» и его структурные аналоги являются мощными стимуляторами биосинтеза допамина и норадреналина в гипоталамусе и в полосатом теле.

Из гипоталамуса выделяли новые пептиды, которые активируют фосфодиэстеразу циклических нуклеотидов и другие Ca^{2+} -кальмодулинзависимые ферменты без участия Ca^{2+} . Результаты этих исследований—новые доказательства пептидной теории регуляции метаболизма и функций висцеральных органов, развиваемой нами в последние 25 лет.

Уже четверть века коллектив руководимой мной лаборатории биохимии нейрогормонов систематически изучает нейроспецифические белки и органотропные нейрогормоны—полипептиды гипоталамо-нейрогипофизарной системы [1]. Особое внимание в наших исследованиях было обращено на белок-гормональные комплексы магноцеллюлярных ядер гипоталамуса, являющихся нейрохимическими системами регуляции метаболизма и функции не только головного мозга, но и висцеральных органов, главным образом, сердца. Развитое нами представление об органотропных нейрогормонах гипоталамуса оказалось уместным и в отношении рилизинг-гормонов гипоталамуса [2].

Выдвинутые нами на основе экспериментальных данных концепции и теоретические положения легли в основу понимания биохимических механизмов генеза и метаболического влияния, а также функций множества органотропных пептидов гипоталамо-нейрогипофизарной системы мозга. Основные принципы и направления изучения биологии нейропептидов сводятся к следующему.

1. *Прогормональная концепция генеза пептидных гормонов.* В 1963 г. нами было выдвинуто положение о том, что пептидные гормоны гипоталамуса берут начало из общего белкового предшественника, образующегося при

участии рибосомного механизма. Образование же биологически активных веществ происходит посттрансляционно — под влиянием протеолитических ферментов мозга. Экспериментальные доказательства этого положения мы получили еще в 1964 г. на примере выделенного нами специфического белка гипоталамуса [3]. За последние 15—20 лет в литературе накоплен большой фактический материал о том, что как рилизинг-гормоны, так и другие нейропептиды имеют своих белковых предшественников.

2. *Пептидная теория регуляции метаболизма и функций висцеральных органов.* С 1962 г. в нашей лаборатории накопился огромный экспериментальный материал, свидетельствующий о том, что образуемые в гипоталамических нейросекреторных ядрах кардиотропные полипептиды, условно названные нами «К», «С» и «Г», их множественные формы, а также рилизинг-гормоны включаются в регуляцию тонких метаболических процессов (превращения нейромедиаторов, окислительное фосфорилирование и др.) в различных органах, в частности в сердце. Эти полипептиды удается выделить из синапсом и нейросекреторных гранул в виде белок-гормональных комплексов, составляющих вместе с протеолитическими ферментами, АТР, ферментами метаболизма циклических нуклеотидов, Ca^{2+} нейрохимические системы регуляции обмена веществ и функций висцеральных органов *in vivo*.

Главный вывод, вытекающий из выдвинутой нами пептидной теории, заключается в том, что обмен специфических белков-предшественников гормонов гипоталамо-нейрогипофизарной системы теснейшим образом связан с метаболизмом и функцией висцеральных органов.

Исследования в этом направлении привели нас к открытию эндокринных элементов сердца [4], имеющих тесные нейрогуморальные взаимоотношения с эндокринным аппаратом гипоталамуса (с механизмами образования и высвобождения гипоталамических нейропептидов в общий кровоток) [1]. Так, например, из предсердий нами выделен ряд метаболически активных пептидных гормонов, органом-мишенью которых является гипоталамус. Сердечные факторы через хеморецепторы каротидного синуса и соответствующие афферентные пути способствуют выбросу из гипоталамуса в общую циркуляцию кардиотропных нейрогормонов.

Между «эндокринным сердцем» и гипоталамусом существует нейрогуморальная обратная связь (короткий *feed-back*). Аналогичная связь обнаружена нами между инкреторным аппаратом поджелудочной железы и гипоталамусом (длинный *feed-back*), направленная на регуляцию метаболизма и функции сердца [5].

3. *Принцип кооперативности нейромедиатор — нейропептид.* Под этим подразумевается наличие двусторонних метаболических взаимоотношений (*feed-back*) нейропептид — медиатор, направленных на регуляцию функции мозга и висцеральных органов. Существует функционально-биохимическое взаимоотношение между полипептидными гормонами, входящими в состав нейросекреторного вещества, и специфическими химическими агентами нервной активности (нейромедиаторами).

Существуют интимные функционально-биохимические взаимоотношения как между отдельными «классическими» медиаторами, так и между нейропептидами и медиаторами в микроструктурах нейронов мозга.

Множественные формы кардиоактивных гликопептидов

Как уже было сказано, ранее нами были выделены 3 коронарорасширяющих соединения, условно обозначенных «К», «С» и «Г». Были изучены их биологические и физико-химические свойства, а также установлен их полипептидный характер. Путем гель-фильтрации на глицин-намидированном сефадексе, высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в сочетании с ИОХ на ДЕАЕ-целлюлозе и т. д. каждую группу нейрогормонов «К», «С» и «Г» можно разделить на субфракции с биологическими и физико-химическими свойствами, весьма близкими друг с другом [6]. В итоге из каждой группы были изолированы по 4 пептида, условно названных HC_{7a} , HC_{7b} , HC_{10a} , HC_{10b} , HG_{3a} , HG_{3b} , HG_{5a} , HG_{5b} , HK_{3a} , HK_{3b} , HK_{5a} , HK_{5b} . При этом кардиоактивные гликопептиды были выделены как из состава низкомолекулярных соединений, так и из соответствующих белок-гормональных комплексов, так как гликопептиды оказались электростатически адсорбированными на белках, и эти комплексы удалось разъединить путем специального диализа разведенными растворами уксусной кислоты. С помощью ВЭЖХ все эти пептиды были получены в индивидуальном виде и был проведен их аминокислотный анализ. В состав этих пептидов в значительном количестве входят глицин, серин, глутаминовая и аспарагиновая кислоты, аланин, валин, изолейцин, гистидин. В аминокислотном составе HK_{3a} отсутствуют тирозин и пролин. Характерным для них является содержание аминокислот — глюкозамина и галактозамина, что позволяет считать их гликопептидами. Наличие углеводного компонента в изоформах нейрогормона «С» было подтверждено методами масс-спектрального и ЯМР-анализа. Так, например, при масс-спектрометрии двух коронарорасширяющих форм HC_{7a} и HC_{10a} были выявлены интенсивные пики с m/e 331, 211, 169, 109, свидетельствующие о наличии гликозидных соединений. ЯМР-анализ показал во всех формах нейрогормона «С» наличие углеводного компонента, одновременно выявив отличия между ними, которые сводятся к различному количественному соотношению сахарных остатков в углеводном компоненте. Интересно заметить, что их белковые предшественники, как и можно было ожидать, являются гликопротеинами с типичной олигосахаридной частью.

Характерной особенностью выделенных нами кардиоактивных полипептидов гипоталамуса является то, что они ингибируют активность Ca^{2+} -кальмодулинзависимых форм фосфодиэстеразы (ФДЭ) циклических нуклеотидов.

Нейрогормон «К» сам по себе не оказывает ингибирующего влияния на активность ФДЭ. Но после его частичного гидролиза (6 ч, 6 н. HCl) из состава HK_{3a} и HK_{3b} отщепляются 3 и 4 нейропептида соответствен-

но, которые после разделения путем ВЭЖХ проявляют характерное ингибирующее влияние на ФДЭ. Почти все изученные пептиды являются активаторами фосфоорилазы печени, почек и мышц а главным образом сердца и мозга.

Нейрогормональная регуляция содержания Ca^{2+} в клетке

Нейрогормон «С» является уникальным регулятором содержания Ca^{2+} в клетке. Было изучено распределение Ca^{2+} в саркоплазматическом ретикулуме, митохондриях сердца и мозга, изменения различных связывающих Ca^{2+} белков указанных органелл под влиянием нейрогормона «С» в норме и при изопротереноловом некрозе миокарда. Установлено, что внутрибрюшинное введение нейрогормона «С» крысам в дозе 80—100 мЕ ФДЭ [9] не вызывало особо заметных сдвигов в белковом спектре внутриклеточных органелл, однако изменяло сродство определенных белков к $^{45}\text{CaCl}_2$. Это свойство нейрогормона «С» особенно проявлялось при изопротереноловом некрозе. Показано, что нейрогормон «С» способствовал выводу избыточных количеств Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума как в норме, так и в патологических условиях [7]. Изменение сродства специфических белков к Ca^{2+} , вероятно, объясняется фосфорилированием одних и дефосфорилированием других белков под влиянием соответствующих АМР-зависимых протеникиназ и фосфопротеин-фосфатаз. Тем самым осуществляется взаимодействие двух систем мессенджеров—циклических нуклеотидов и Ca^{2+} .

Действие нейрогормона «С» на синтез катехоламинов в мозгу крыс

Установлено, что нейрогормон «С» оказывал дозозависимое (2—40 мЕ ФДЭ) разнонаправленное действие на синтез ^{14}C -дофамина и ^{14}C -норадреналина в срезах гипоталамуса мозга крыс [8]. Нейрогормон «С» (1,6 мЕ/мл) увеличивал скорость синтеза дофамина и норадреналина в 7,3 и 6,4 раза соответственно. С увеличением дозы нейрогормона «С» (16 мЕ/мл) наблюдали ингибирование синтеза как дофамина, так и норадреналина в 7,4 и 5,9 раза соответственно.

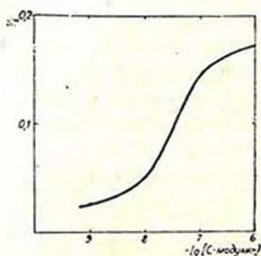
При изучении синтеза ^{14}C -дофамина и ^{14}C -норадреналина под действием нейрогормона «С» в срезах полосатого тела мозга крыс была выявлена однонаправленность влияния препарата в зависимости от дозы.

Было обнаружено, что нейрогормон «С» в зависимости от дозы (1,6 и 16 мЕ/мл) увеличивал синтез ^{14}C -дофамина в 1,7 и 16 раз соответственно. Синтез ^{14}C -норадреналина под влиянием этого гормона в тех же дозах увеличивался в 2,1 и 48 раз соответственно. При этом нейрогормон «С» не влиял на захват и высвобождение катехоламинов. Таким образом, получены убедительные доказательства роли нейрогормона «С» именно в биосинтезе катехоламинов.

Эти процессы мы связываем с изменением содержания Ca^{2+} и циклических нуклеотидов в органеллах клетки.

Ca²⁺-независимая пептидная система активации ФДЭ циклических нуклеотидов мозга

Наличие большого числа Ca²⁺-кальмодулинзависимых ферментов (Ca²⁺-КМ), компартментализация Ca²⁺-КМ ферментных систем, лимитирование концентраций кальмодулина или изменение содержания Ca²⁺-связывающих белков в мозгу и других органах предполагает существование кальмодулинподобных, но Ca²⁺-независимых регуляторов в клетке.



Активирование гидролиза (V_1)
сАМР С-модулином в
отсутствии кальмодулина

Стимуляция ФДЭ проявлялась в повышении величины V_1 без изменения K_m для сАМР. Кинетический анализ не выявил непосредственного взаимодействия активатора с субстратсвязывающими центрами ФДЭ. Связывание его с аллостерическими центрами ФДЭ характеризуется высоким сродством к ферменту и носит выраженный кооперативный характер (рисунок).

Действие активатора на ФДЭ не проявлялось после его инкубации с трипсином, что подтверждает пептидный характер этих соединений. Выделенные пептиды отличаются термостабильностью. Чувствительность ФДЭ к активатору изменялась в зависимости от степени очистки фермента, определяющей, вероятно, конформационное состояние его молекулы, доступность ее аллостерических центров, наличие в препаратах фермента соединений—антагонистов активатора и других эффекторов.

Результаты настоящих экспериментов свидетельствуют о том, что пептидные активаторы ФДЭ сопровождают нейrogормон «С» на всех этапах его очистки, включающих гель-фильтрацию, ионообменную и тонкослойную хроматографии. Лишь с помощью обратнoфазовой жидкостной хроматографии при высоком давлении удалось разделить активаторы и ингибиторы ФДЭ. На основании этих результатов в совокупности с данными, полученными ранее, можно предположить, что стимулирующий и ингибирующий ФДЭ факторы образуют высокоэффективный комплекс в составе препарата нейrogормона «С», регулирующий проявление его кардиотропного действия.

Обнаруженный Ca^{2+} -независимый активатор ФДЭ циклических нуклеотидов был нами назван С-модулином. По кинетическим данным, в ФДЭ имеются, по крайней мере, два центра для С-модулина ($p_n = 2$). Нейрогормон же «С», по нашим данным, является конкурентным ингибитором ФДЭ сАМР [9]. Нами накоплен значительный материал, свидетельствующий о наличии ряда пептидов (С-модулинподобных), которые, связываясь с W-7 и трифторпиразином (ингибиторами кальмодулина), теряют Ca^{2+} -независимый стимулирующий эффект на активность ФДЭ сАМР гипоталамуса (Гурвиц, Абрамян, 1986).

В настоящее время известен ряд факторов, вызывающих Ca^{2+} -независимую активацию не только ФДЭ, но и других кальмодулинзависимых систем. К их числу относятся жирные кислоты и фосфолипиды, бактериомодулин [10, 11]. Однако сродство этих соединений к ФДЭ на 4—5 порядков ниже по сравнению с кальмодулином. Можно предположить, что при лимитированной концентрации последнего или же Ca^{2+} взаимодействие с ним каждого из множества кальмодулинзависимых белков будет затруднено. В этом случае решающую роль играют компартиментализация того или иного фермента, изменения концентрации субстрата и Ca^{2+} , регулирующих чувствительность фермента к кальмодулину и другие факторы. Особый интерес в этой связи привлекают кальмодулинподобные, но Ca^{2+} -независимые регуляторы в клетке, которые, как С-модулин и его множественные формы, могут стимулировать ФДЭ сАМР в гораздо меньших концентрациях, чем кальмодулин. Видимо, этим можно объяснить исключительно высокую активность ФДЭ мозга, когда концентрация Ca^{2+} составляет всего $\sim 10^{-7}$ М (то есть тогда, когда Ca^{2+} еще не в состоянии связываться с кальмодулином). Можно полагать, что С-модулин является также регулятором других Ca^{2+} -КМ-зависимых ферментов.

Полученные данные свидетельствуют о том, что имеются функционально-биохимические интимные взаимоотношения между указанными выше мессенджерами в клетке (Ca^{2+} , катехоламины, циклические нуклеотиды). Эти процессы, как показывают наши данные, тонко регулируются гликопептидными соединениями гипоталамуса. Вместе с тем, удалось установить наличие Ca^{2+} -зависимых и Ca^{2+} -независимых пептидов—регуляторов активности ФДЭ сАМР в мозгу.

INVOLVEMENT OF GLYCOPEPTIDE HORMONES FROM HYPOTHALAMUS IN THE REGULATION OF METABOLISM OF Ca^{2+} , CYCLIC NUCLEOTIDES AND CATECHOLAMINES

GALOYAN A. A.

Institute of Biochemistry Arm. SSR Acad. Sci., Yerevan

Multiple forms of metabolically active cardiotropic neurohormones have been isolated from mammalian hypothalamus. These glycopeptides regulate the activity of enzymes involved in cyclic nucleotides metabolism

and the intracellular concentration of Ca^{2+} . Neurohormone "C" and its structural analogs essentially stimulate biosynthesis of dopamine and noradrenaline in hypothalamus and noradrenaline in hypothalamus and corpus striatum.

Novel peptides have been purified from hypothalamus that activate cyclic nucleotides PDE and other Ca^{2+} , calmodulin-dependent enzymes in the absence of Ca^{2+} . Data obtained support the peptide theory of regulation of metabolism and function of visceral organs that has been put forward 25 years ago.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Galoyan A. Neurochem. Res., v. 11, №6, p. 769—789, 1986.
2. Галоян А. А. Биол. журн. Армении, т. 28, № 12, с. 61—64, 1975.
3. Галоян А. А. Докл. АН Арм.ССР, т. 38, с. 305—308, 1964.
4. Галоян А. А., Ростомян М. А. Биол. журн. Армении, т. 20, № 9, с. 3—7, 1967.
5. Galoyan A., *Ergebn. d. experiment. Mediz.*, B. 29, S. 99—115, 1978.
6. Галоян А. А., Срапионян Р. М., Карапетян Р. О., Абелян Ж. Г., Саакян Ф. М., Саакян С. А., Абрамян С. С., Григорян Л. А., Олабян А. Б., Бочко Н. Ф. Нейрохимия, т. 5, № 4, с. 354—364, 1986.
7. Galoyan A. A., Kevorkian G. A., Voskanyan L. H., Alexanian S. S., Muradian M. Sh. Neurochem. Res., 1987.
8. Галоян А. А., Чифликян М. Д., Мурадян М. Ш., Елизарян А. К., Абрамян С. С. Нейрохимия, т. 5, № 1, с. 45—48, 1986.
9. Galoyan A. A., Gurvitz B. Ja., Saribekian G. A., Kirakosova A. S. Adv. Biosci. (eds. Cehovic G., Robison G. A.), v. 24, p. 165—181, 1979.
10. Wolff D. V., Brostrom C. O. Arch. Biochem. and Biophys., 173, p. 720—731, 1976.
11. Alakhov V. Yu., Emelyanenko E. L., Shakhparonov M. L., Dudkin S. M. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 132, p. 591—597, 1985.

Поступила 9. IX 1986

УДК 577.175.82+577.112.387+612.82

СЛЕДОВЫЕ АМИНЫ КАК НЕЙРОТРАНСМИТТЕРЫ И НЕЙРОМОДУЛЯТОРЫ

БОУЛТОН А. А.

Отдел психических исследований Саскачеванского университета, Саскатун, Канада

В настоящем сообщении представлены доказательства, подтверждающие представление, что так называемые следовые амины могут выступать в роли трансмисмиттеров и нейромодуляторов. Рассмотрены свойства фенилэтиламина (ФЭА), м-тирамина (мТА), п-тирамина (пТА) и триптамина (Т), которые на совещании, проведенном под эгидой Американ-

ского колледжа нейробиофармакологии в 1975 г., получили название «следовые амины». О том, что этот термин неудачен — вызывает путаницу, свидетельствует тот факт, что эти амины обнаружены у некоторых беспозвоночных в количествах, значительно превышающих следовые, тогда как катехоламины и серотонин (5-ОТ) в некоторых структурах НС как в головном мозгу млекопитающих, так и НС беспозвоночных могут находиться в «следовых» количествах (табл. 1). Другие «следовые амины» — октопамин, синергизин, фенилэтаноламин, N-метилфенилэтаноламин, гистамин и N-метилтриптамин — здесь не будут рассмотрены, хотя было показано, что некоторые из них, например, л-октопамин, играют важную функциональную роль у беспозвоночных. За последние 10 лет появилось несколько обзоров и книг, посвященных следовым аминам [1—7].

ФЭА и Т образуются из родительских аминокислот соответственно фенилаланина и триптофана путем их декарбоксилирования; это справедливо и в отношении тираминов, хотя в случае этих двух аминов имеет место гидроксилирование фенилалкильного радикала и декарбоксилирование катехоловых предшественников [4—7 и 8—10]. Содержание следовых аминов у млекопитающих в норме колеблется на уровне от 0,05 до 12 нг/г с максимальной концентрацией в хвостом ядре (табл. 2). Применение в недавней работе [11] более чувствительных аналитических методов в сочетании с более тонкой анатомической диссекцией позволило показать, что по крайней мере в случае тираминов их максимальная концентрация была найдена в экстрапирамидальной и мезолимбической областях. В случае ФЭА, Т и лТА была установлена (в %) их синаптическая локализация (табл. 3) [12].

Главные метаболиты следовых аминов, так называемые следовые кислоты, образующиеся путем окислительного деаминации аминов, распределяются аналогично аминам, но содержание их обычно в 2—30 раз выше, чем соответствующих аминов (табл. 2). Некоторые ингибиторы МАО существенно повышают концентрацию следовых аминов [13] и соответственно снижают содержание следовых кислот. Путем тщательного выбора ингибитора МАО, его дозы и времени после инъекции можно увеличивать концентрацию следового амина до ее уровня, характерного для распространенных биогенных аминов. Так, например, можно увеличить концентрацию лТА в полосатом теле после введения фенелзина до уровня 1 мкг/г. С помощью паргиллина в сравнительно высоких дозах было показано [14, 15] (табл. 4), что во всяком случае ФЭА и Т могли проявлять очень короткое время полужизни и быстрое накопление. На основании изучения скорости исчезновения аминов после внутримозговой инъекции таким же путем было установлено очень короткое время полужизни и у тираминов [16—18].

Захват и высвобождение. В хвостом ядре и гипоталамусе крыс были обнаружены высоко- и низкоаффинные системы захвата лТА и лТА. Хотя в большинстве случаев захват этих аминов оказался похожим на захват дофамина (ДА), эти процессы можно различить с по-

Таблица 1

Концентрация биогенных аминов в нервной ткани позвоночных
и беспозвоночных (в нг/г)

Организм	ФЭА	пТА	мТА	Т	ДА	НА	А	5-ОТ
Человек (хвостатое ядро)	1,5	1,2	3,1	0,4	416	н. о.	—	649
Крыса (целый мозг)	1,8	1,1	0,32	0,50	600	490	40	400
Кролик (целый мозг)	0,44	0,36	0,16	0,05	480	434	30	380
Курица (целый мозг)	0,71	0,50	0,30	<0,30	290	418	46	700
Осьминог (глазные доли)	3,0	79,0	0,6	0,6	4690	3900	н. о.	4180
Виноградная улитка (ганглии)	0,60	7,5	1,1	6,4	2200	<50	н. о.	2250
Саранча (ганглии)	<0,20	72,0	0,20	<0,20	—	110	—	—
Омар (ганглии)	—	150	—	—	110	—	—	150
Морская звезда (лучевой нерв)	4,4	2,2	<0,80	1251	5950	153	—	<30

Примечание. Некоторые данные заимствованы из статей [7, 29, 55]; н. о.—не обнаружено. ФЭА—фенилэтиламин, пТА—п-тирамин, мТА—м-тирамин, Т—триптамин, ДА—дофамин, НА—норадреналин, А—адреналин, 5-ОТ—серотонин

Таблица 2

Региональное распределение некоторых следовых аминов и следовых кислот в головном мозгу крыс (в нг/г)

Отдел мозга	ФЭА	ФУК	пТА	пОФУК	мТА	мОФУК	Т	ИУК
Гипоталамус	2,1	60,1	1,2	4,5	0,2	1,2	0,9	23,7
Полосатое тело	4,2	64,6	11,1	28,3	3,0	5,3	2,9	63,6
Стол	1,6	33,1	0,4	8,6	0,10	1,8	0,2	11,7
Мозжечок	2,1	31,3	0,1	8,1	0,01	1,2	0,3	10,1
Остальные области	1,4	27,6	0,5	5,3	0,20	1,7	0,3	—

Примечание. ФЭА—фенилэтиламин, ФУК—фенилуксусная кислота, пТА—п-тирамин, пОФУК—п-оксифенилуксусная кислота, мТА—м-тирамин, мОФУК—м-оксифенилуксусная кислота, Т—триптамин, ИУК—индолилуксусная кислота.

мощью блокаторов ДА—дезипрамина и бензотропина [19]. Если нагрузить срезы хвостатого ядра радиоактивно меченными тираминами, то их Ca^{2+} -зависимое высвобождение под влиянием K^+ в деполяризующих концентрациях будет протекать аналогично высвобождению ДА, однако с помощью определенных стимулирующих фармакологических агентов эти процессы можно отличить. Например, фенамин высвобождает ДА, пТА и мТА, а метилфенидат, кокаин, амфоселевая кислота и некоторые аминотетралины высвобождают только тирамины [20, 21 и 2, 3, 7]. Изучение высвобождения тираминов из срезов хвостатого ядра крыс после введения животным фенелзина [22] позволило заключить, что эндо-

Таблица 3

Субклеточное распределение следовых аминов в головном мозгу крыс
(в % от общего содержания)

Фракция	Фенил- этиламин	н-ти- рамин	Трип- тамин
Ядро	9,5	6,1	9,7
Грубая митохондриальная фракция	27,7	25,9	33,6
Микросомы	10,7	5,3	15,5
Надосадочная жидкость	51,5	61,5	41,5
Миелин	7,1	8,9	12,6
Синаптосомы	15,0	13,5	18,0
Митохондрии	5,5	2,6	2,9

• *Примечание.* Мозжечок исключен; фракционирование проведено по методу Whitaker, Barker [52].

генные ДА, нТА и мТА высвобождаются из нервных окончаний также Ca^{2+} -зависимым путем, и что этот процесс зависит от целостности нервных волокон, находящихся в пучке медиального отдела переднего мозга. В более поздней работе, в которой высвобождение аминов определяли в отсутствие блокады МАО ее ингибиторами, было показано, что, по-видимому, высвобождение истинно эндогенных мТА и нТА происходит по Ca^{2+} -зависимому пути (Dyck, личное сообщение). Трудности в измерении высвобождения ФЭА и Т связаны с их очень малой эндогенной

Таблица 4

Скорость накопления и метаболизма биогенных аминов

Биогенные амины	Скорость накопления (нМ г/ч)	Время по- лу жизни (мин)
Фенилэтиламин	1,5	0,4
Дофамин	1,8	150
Норадреналин	0,4	250
Триптамин	0,24	0,28
Серотонин	1,55	77

Примечание. Данные пригодятся по Durden, Philips [14].

концентрацией и тем фактом, что, будучи неполярными, они легко диффундируют через мембраны. Однако в 1984 г. Dyck [23] заключил, что существует общая система захвата для Т и 5-ОТ, но Т, возможно, не высвобождается, а легко вымывается из срезов. Используя push-pull-канюлю и фермент-изотопный анализ или ВЭЖХ, Philips и соавт. сумели показать, что ФЭА [24—26] и нТА (Philips, личное сообщение).

как и фенамин и КСІ, вызывают мощное высвобождение ДА, норадреналина, 3-метокситирамина и 5-ОТ.

Эффекты фармакологических агентов и повреждений. В присутствии обычных высвобождающих агентов (резерпина, 6-оксидофамина, тетрабензамина, оксипертина) содержание тираминов снижалось в общем в той же степени, что и содержание ДА, 5-ОТ и норадреналина [27]. Оказалось значительно труднее обнаружить уменьшение количества ФЭА и Т; имеет ли оно на самом деле место под действием обычных высвобождающих амины агентов, необходимо еще доказательно выяснить. Эффективные в клинике нейролептики, снижающие метаболизм ДА, также влияли на содержание мТА и лТА, но разнонаправленно: количество лТА в хвостатом ядре повышалось с сопутствовавшим снижением количества мТА и метаболизма ДА. Такой реципрокный эффект наблюдался и при всех других манипуляциях, влияющих на ДА (введение агонистов, антагонистов, предшественников и ингибиторов при повреждениях, стимуляции, стрессе) (табл. 5).

В табл. 6 представлены результаты исследований эффектов химического или электролитического повреждения черной субстанции и ядра шва на содержание ФЭА, мТА, лТА, ДА, Т и 5-ОТ в нервных окончаниях полосатого тела [28—35]. Для обнаружения изменений в содержании некоторых следовых аминов было необходимо вводить крысам соответствующий ингибитор МАО (депренил в случае ФЭА и паргиллин в случае Т). При повреждении дорзального *pars compacta* черной субстанции происходило значительное повышение содержания мТА, тогда как количество лТА и ДА снижалось, что, возможно, свидетельствует о наличии специфических мТА-содержащих нейронов [31]. Результаты таких экспериментов с повреждением определенных отделов головного мозга указывают на то, что следовые амины, по меньшей мере частично, локализованы внутри нейронов, и что ФЭА, мТА и лТА образуются в черной субстанции или около нее (или проходят через нее), а также эти амины сосуществуют с ДА. Они не образуются в дорзальной или медиальной частях шва и не проходят через них. Нейроны, содержащие Т, видимо, не зависят от целостности 5-ОТ-нейронов, по крайней мере, в области шва среднего мозга; они не расположены в дорзальной или медиальной частях, но, по-видимому, зависят от целостности nigrostriatalной дофаминергической системы.

Электрофизиология. При контофорезе следовых аминов или отдельно вместе с другими предполагаемыми нейромедиаторами они оказывают как прямые, так и косвенные эффекты. Так, тирамины, например, в коре больших полушарий или в хвостатом ядре воспроизводят эффекты катехоламинов, хотя и не столь стойко [36]. С другой стороны, Т оказывает мощное депрессантное действие даже на клетки, возбужденные 5-ОТ. При электрофорезе следовых аминов на клетку слабыми токами они не изменяли электрофизиологической активности клетки. Однако сочетание такого воздействия с аппликацией родственных аминергических нейромедиаторов (ДА, 5-ОТ, норадреналина) приводило к резкому по-

Реципрокные отношения между концентрациями л- и м-тирамина (лТА и мТА) и метаболизмом дофамина (ДА) в присутствии фармакологических агентов, влияющих на дофамин, и при повреждениях

Агенты	лТА	мТА	метаболизм ДА
Антагонисты	↓	↑↑	↑
Агонисты	↑	↓	↓
Высвобождающие агенты и блокаторы захвата	↓	↑↑	↑
Метаболические предшественники	↓	↑	↑
Синтетические ингибиторы	↑	↓	↓
Повреждения (кратковременные электролитические или химические)	↓	↑	↑
Стресс	↓	↑	↑

Примечание. ↑ возрастание; ↓ понижение; ↑↑ тенденция к возрастанию.

Таблица 6

Эффект хронического повреждения черной субстанции или ядер шва на содержание биогенных аминов в нервных окончаниях в полосатом теле

Биогенные амины	Повреждение черной субстанции	Повреждение ядер шва
Фенилэтиламин	снижение	без изменений
л-Тирамин	снижение	без изменений
м-Тирамин	снижение	без изменений
Дофамин	снижение	без изменений
Триптамин	снижение	без изменений
Серотонин	без изменений	снижение

Примечание. По данным, приведенным в работах [30—35].

тендированию эффекта последних. В случае клетки, заторможенной 5-ОТ, Т значительно потенцировал эффект, тогда как в случае клеток, возбуждаемых 5-ОТ, даже ничтожное количество Т снимало стимулирующий эффект 5-ОТ с последующим развитием депрессии [36, 37]. Было обнаружено взаимодействие некоторых следовых аминов и с другими нейромедиаторами, например, лТА и Т с ацетилхолином, Т с глутаматом, ФЭА с опиоидными пептидами. Эти свидетельства нейромедиа-

торной и/или нейромодуляторной роли следовых аминов подтверждаются недавно обнаруженными рецепторами для некоторых из них [38—51].

Заключение. Хотя и было установлено, что амины поведенчески активны и вовлечены прямо или косвенно в двигательную активность, стереотипию, прием воды и пищи, сексуальное поведение, агрессивность, циклы бодрствование—сон, терморегуляцию [2, 3], эти аспекты нами не обсуждаются, как и их роль в этиологии ряда неврологических и психических нарушений.

Если придерживаться критериев, которым, по Iversen, должны удовлетворять нейромедиаторы, то многие из них подходят следовым аминам. Они содержатся в нейронах, высвобождаются из них по Ca^{2+} -зависимому механизму (в препаратах *in vitro* и *ex vivo*), при ионтофорезе проявляют депрессантную активность и потенцируют эффект других предполагаемых нейромедиаторов, высвобождаются из пузырьков, в которых хранятся и очень быстро инактивируются посредством MAO, их эффект нейтрализуется некоторыми фармакологическими агентами (метерголином в случае Т). Эти критерии, однако, в настоящее время недостаточны для причисления их к разряду синаптически активных веществ, поэтому, следуя Dismukes [53], мы определили [54] следовые амины как нейрогуморы (цитозольные, пре- и/или постсинаптические, вторичные, не прямые). В будущем необходимо выяснить возможность их сосуществования и одновременного высвобождения с другими предполагаемыми нейромедиаторами с уточнением нейроанатомической локализации: их эффекты на уровне клеточных мембран с использованием методов patch-clamp и внутриклеточной регистрации при дальнейшем изучении их рецепторов. Кроме того, необходимо установить их участие в различных сторонах поведения и в этиологии психиатрических и неврологических нарушений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Trace Amines and the Brain (eds. E. Usdin, M. Sandler), p. 1—301, M. Dekker, New York, 1976.
2. Neurobiology of the Trace Amines (eds. A. A. Boulton, G. B. Baker, W. G. Dewhurst, M. Sandler), p. 1—517, Humana Press, New Jersey, 1984.
3. Neuropsychopharmacology of the Trace Amines (eds. A. A. Boulton, P. R. Bieck, L. Maitre, P. Riedorfer), p. 1—510, Humana Press, New Jersey, 1980.
4. Boulton A. A. — In: Trace Amines and the Brain (eds. E. Usdin, M. Sandler), p. 21—37, M. Dekker, New York, 1976.
5. Boulton A. A. Life Sci., v. 23, p. 659—672, 1978.
6. Boulton A. A. Int'l. Rev. Biochem., v. 26, p. 197—206, 1979.
7. Boulton A. A., Juorio A. V. In: Handbook of Neurochemistry I (ed. A. Lajtha), p. 187—222, Plenum Press, New York, 1982.
8. Boulton A. A., Juorio A. V. Experientia, v. 39, p. 130—134, 1983.
9. Juorio A. V., Boulton A. A. J. Neurochem., v. 39, p. 859—863, 1982.
10. Juorio A. V. Neuropharmacology, v. 22, p. 71—73, 1983.
11. Sardar A., Juorio A. V. Proc. Can. Coll. Neuropsychopharmacol. Mtg., Vancouver, 1986.

12. Boulton A. A., Baker G. B. J. *Neurochem.*, v. 25, p. 477-481, 1975.
13. Philips S. R., Boulton A. A. J. *Neurochem.*, v. 33, p. 159-167, 1979.
14. Durden D. A., Philips S. R. J. *Neurochem.*, v. 34, p. 1725-1732, 1980.
15. Juorio A. V., Durden D. A. *Neurochem. Res.*, v. 9, p. 1283-1293, 1984.
16. Wu P. H., Boulton A. A. *Can. J. Biochem.*, v. 51, p. 1104-1112, 1973.
17. Wu P. H., Boulton A. A. *Can. J. Biochem.*, v. 52, p. 374-381, 1974.
18. Wu P. H., Boulton A. A. *Can. J. Biochem.*, v. 53, p. 42-50, 1975.
19. Petrali E. H., Boulton A. A., Dyck L. E. *Neurochem. Res.*, v. 4, p. 633-642, 1979.
20. Dyck L. E. *Neurochem. Res.*, v. 3, p. 775-791, 1978.
21. Dyck L. E., Boulton A. A., Jones R. S. *G. Eur. J. Pharmacol.*, v. 65, p. 33-40, 1980.
22. Dyck L. E., Juorio A. V., Boulton A. A. *Neurochem. Res.*, v. 6, p. 705-716, 1982.
23. Dyck L. E. *Neurochem. Res.*, v. 9, p. 617-628, 1984.
24. Philips S. R., Robson A. M. N. Y. *Acad. Sci. Conf. Neurochem. Analysis of the Conscious Brain: Voltammetry and Push-Pull Perfusion* (в печати) (1986).
25. Builey B. A., Philips S. R., Boulton A. A. *Neurochem. Res.* (в печати) (1985).
26. Philips S. R. *Life Sci.* (в печати) 1986.
27. Juorio A. V. — In: *Neurobiology of the Trace Amines* (eds. A. A. Boulton, G. B. Baker, W. G. Dewhurst, M. Sandler), p. 145-162, Humana Press, New Jersey 1984.
28. Juorio A. V., Greenshaw A. J., Boulton A. A. — In: *Neuropsychopharmacology of the Trace Amines* (eds. A. A. Boulton, P. R. Dieck, L. Maitre, P. Riederer), p. 87-99, Humana Press, New Jersey, 1985.
29. Juorio A. V. *Comp. Pharmacol.* (в печати), 1985.
30. Greenshaw A. G., Juorio A. V., Nguyen T. V. *Brain Res. Bull.* (в печати), 1986.
31. Juorio A. V., Jones R. S. *G. J. Neurochem.*, v. 36, p. 1898-1903, 1981.
32. Jones R. S. G., Juorio A. V., Boulton A. A. J. *Neurochem.*, v. 40, p. 396-401, 1983.
33. Juorio A. V., Greenshaw A. J. *Neurochem. Res.*, v. 11, p. 687-693, 1986.
34. Juorio A. V., Greenshaw A. J. *Neurochem. Res.*, v. 15, p. 422-426, 1985.
35. Juorio A. V., Greenshaw A. J. *Brain Res.*, v. 381, p. 385-389, 1986.
36. Jones R. S. G. *TIPS*, v. 4, p. 425-429, 1983.
37. Jones R. S. G. *Prog. Neurobiol.*, v. 19, p. 117-139, 1982.
38. Vaccart A. *Brit. J. Pharm.*, v. 96, p. 635, 1985.
39. Hauger R. L., Skolnick P., Paul S. M. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 83, p. 147-148, 1982.
40. Kellar K. J., Cascio C. S. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 78, p. 475-478, 1982.
41. Cascio C. S., Kellar K. J. *Neuropharmacol.*, v. 21, p. 1219-1221, 1982.
42. Cascio C. S., Kellar K. J. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 95, p. 31-39, 1983.
43. Bruning G., Rommelspacher H. *Life Sci.*, v. 34, p. 1441-1446, 1984.
44. Wood P. L., Pilgipil C., LaFaille F., Nair N. P. V., Glennon R. A. *Arch. int. Pharmacodyn.*, v. 268, p. 194-201, 1984.
45. Charlton K. G., Johnson T. P., Maurice R. W., Clarke P. E. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 106, p. 661-664, 1984.
46. Cascio C. S., Kellar K. J. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 120, p. 101-105, 1986.
47. McCormack J. K., Beltz A. J., Larson A. A. J. *Neurosci.*, v. 6, p. 94-101, 1983.
48. Altar C. A., Wasley A. M., Martin L. L. *Neurosci.*, v. 17, p. 263-273, 1986.
49. Perry D. G. J. *Pharmacol. exp. Therap.*, v. 236, p. 548-559, 1985.
50. Korasawa A., Serikyaku S., Ishatani R. *Life Sci.*, v. 38, p. 1331-1337, 1986.
51. Klenz E., Riederer P., Jellinger K., Noller N. — In: *Neuropsychopharmacology of the Trace Amines* (eds. A. A. Boulton, P. R. Dieck, L. Maitre, P. Riederer), p. 460-475, Humana Press, New Jersey, 1985.

52. Whittaker V. P., Burker L. A. In: *Methods in Neurochemistry* (ed. R. Fried), M. Dekker, New York, 1972.
53. Diemkes R. K. *Behav. Brain Sci.*, v. 2, p. 409—448, 1979.
54. Boulton A. A. *Behav. Brain Sci.*, v. 2, p. 418, 1979.
55. Muckay W. P., Yates C. M., Wright A., Hamilton P., Davies P. J. *Neurochem.* v. 30, p. 841—848, 1978.

Поступила 9. IX 1986

УДК 577.25:[576.354.46+615.9]

БЕСКЛЕТОЧНАЯ МОДЕЛЬ НЕЙРОСЕКРЕЦИИ

ЛИШКО В. К., ТЕРЛЕЦКАЯ Я. Т., ГЕГЕЛАШВИЛИ Г. К.

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

Показана возможность моделирования процесса нейросекреции в бесклеточной системе, состоящей из очищенных фракций синаптических везикул, плазматических мембран синапсом и микромолярных концентраций Ca^{2+} . При исследовании эффекта латротоксина на такой бесклеточной системе установлено, что в среде без Ca^{2+} латротоксин вызывал слияние синаптических плазматических мембран с синаптическими везикулами и фосфатидилхолиновыми липосомами. Изучена зависимость скорости этого процесса от концентрации латротоксина. Фузогенный эффект латротоксина, связанного с синаптической мембраной, антитела к латротоксину не устраняли. Проведенные исследования позволяют предположить, что пресинаптический эффект латротоксина обусловлен не только его каналобразующими, но и фузогенными свойствами.

Согласно существующим представлениям, синаптическая передача нервного импульса осуществляется нейромедиаторами, которые высвобождаются из синаптических везикул слиянием с пресинаптической мембраной нервных окончаний. Процесс нейросекреции зависит от концентрации Ca^{2+} внутри синапсом и протекает по типу экзоцитоза. Механизм этот универсален для многих секреторных процессов, и общие закономерности его хорошо изучены [1, 2]. Однако до сих пор не известны ни молекулярные структуры, непосредственно принимающие участие в этом процессе, ни природа их взаимодействия. Поэтому необходимо более глубокое изучение взаимодействия отдельных компонентов механизма экзоцитоза *in vitro* в условиях моделирования. Такой методический подход расширяет экспериментальные возможности выяснения молекулярных механизмов нейросекреции.

Нами разработана система, состоящая из изолированных фрагмен-

тов плазматических мембран синапсом и синаптических везикул [3]. Показано, что эта модель может имитировать процесс выброса медиатора в синаптическую щель. На такой модели нейросекреции и были проведены исследования по выяснению пресинаптического эффекта α -латротоксина.

Материалы и методы

Фракции плазматических мембран синапсом и синаптических везикул получали, как описано ранее [3]. О слиянии синаптических везикул с фрагментами мембран судили по выходу радиоактивной метки $^{22}\text{Na}^+$ или $^{86}\text{Rb}^+$ из синаптических везикул предварительно нагруженных. К суспензии синаптических везикул (1 мг белка/мл) добавляли $^{22}\text{Na}^+$ или $^{86}\text{Rb}^+$ ($5 \cdot 10^6$ имп/мин/мг белка) и инкубировали в течение 18–20 ч при 4° . Из суспензии нагруженных синаптических везикул во время эксперимента отбирали аликвоты (50–100 мкл) и к ним добавляли 9-кратный объем 5 мМ трис-НСl буфера, рН 7.4, содержащего 0.32 М сахарозу, 1 мМ ЭГТА, а также другие компоненты в зависимости от цели эксперимента. Через определенные промежутки времени аликвоты по 1 мл износили на колонки с КМ-сефадексом G-25 (15X8 мм) и элюировали 0.5 мл используемого суспендирующего раствора при 22° [4]. При этом с катионообменником связывалась метка, локализованная во внешней среде, элюат содержал синаптические везикулы с меткой, заключенной во внутреннем объеме. Радиоактивность измеряли на счетчике Delta 300 («Tracor Analytica», США) в сцинтилляционной жидкости ЖС-103. По убыванию радиоактивности внутри везикул судили о количестве метки, вышедшей из синаптических везикул.

Концентрацию свободного Ca^{2+} в среде с ЭГТА определяли по методу Portzehl и соавт. [5]; концентрацию белка — по методу Markwell и соавт. [7], стандартную калибровочную кривую строили по бычьему сывороточному альбумину.

Фосфатидилхолиновые липосомы диаметром около 10 нм получали методом обращения фаз [6]. Для получения липосом с внутривезикулярной меткой изотоп $^{86}\text{Rb}^+$ ($5 \cdot 10^6$ имп/мин на 1 мл) вводили в буфер перед ультразвуковой обработкой. Экстравезикулярную метку удаляли гелевой фильтрацией суспензии липосом на колонке с КМ-сефадексом С-25.

Латротоксин выделяли из цельного яда каракутца (*Latrodectus mactans tede-singuttatus*) на жидкостном хроматографе FPLC («Pharmacia», Швеция) на колонке Моно-Q элюцией 0, 33 М NaCl. После рехроматографии был получен, по данным электрофореза в ПААГ и иммуноэлектрофореза, гомогенный белок с величиной M_r 130 кД.

Антисыворотку к латротоксину получали из кроликов повторными инъекциями латротоксина с адьювантом Фрейнда. Антилатротоксинные антитела получали методом высаливания сернокислым аммонием и характеризовали двойной иммунодиффузией по Оухтерлоу и перекрестным иммуноэлектрофорезом. Титр препарата составлял 1:24.

Обработку синаптических мембран латротоксином проводили при 22° в течение 15 мин. При необходимости свободный латротоксин удаляли промыванием мембран 10-кратным объемом инкубационного раствора с последующим центрифугированием при 130000g, 30 мин.

Результаты и обсуждение

О процессе слияния синаптических везикул с мембранами синапсом судили по выходу радиоактивной метки, предварительно введенной во внутренний объем везикул. Как видно из данных, представленных на рис. 1, инкубация синаптических везикул с мембранами синапсом в среде без Ca^{2+} не оказывала влияния на выход $^{22}\text{Na}^+$. В то же время Ca^{2+} (10^{-4} М) инициировал взаимодействие синаптических везикул с

пресинаптической мембраной, что приводит к высвобождению содержимого везикул. Этот процесс зависит от концентрации Ca^{2+} ; так, при концентрации Ca^{2+} всего $5 \cdot 10^{-6}$ М наблюдали лишь полумаксимальный эффект (рис. 2). Приведенные результаты позволяют считать, что используемая модель имитирует процесс нейросекреции—*in vitro* происходило слияние синаптических везикул с фрагментами пресинаптической мембраны с одновременным выбросом содержимого везикул в среду.

Вызывало интерес изучение на данной модели механизма действия некоторых нейротоксинов, обладающих пресинаптическим действием. Среди них особое внимание привлекал латротоксин, который связывает-

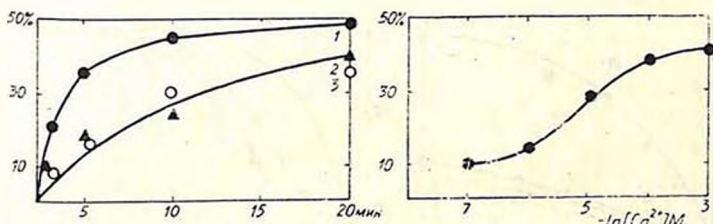


Рис. 1. Выход $^{22}\text{Na}^+$ из синаптических везикул в зависимости от времени инкубации с мембранами синапсом. 1—везикулы, мембраны, 10^{-4} М Ca^{2+} , 2—то же в отсутствие Ca^{2+} , 3—везикулы, 10^{-4} М Ca^{2+} . В среде инкубации соотношение везикулы/мембрана 1:5 (по белку). По оси абсцисс—время в мин; по оси ординат—выход $^{22}\text{Na}^+$ в %

Рис. 2. Выход $^{22}\text{Na}^+$ из синаптических везикул в присутствии мембран синапсом в зависимости от концентрации Ca^{2+} . Соотношение в среде везикулы/мембрана 1:5 (по белку). Время инкубации 5 мин. По оси абсцисс—концентрация Ca^{2+} , по оси ординат—выход $^{22}\text{Na}^+$ в %

ся со специфическим рецептором на пресинаптической мембране [8] и стимулирует выход всех типов медиаторов [9]. Принято считать, что, присоединяясь к специфическому рецептору на пресинаптической мембране, латротоксин индуцирует вход Ca^{2+} в нервное окончание и таким образом стимулирует экзоцитоз—высвобождение нейромедиаторов. Однако экспериментально полученные данные не укладываются полностью в этот предполагаемый механизм нейротоксического эффекта латротоксина. Аналогичное действие латротоксина обнаруживается и в среде, не содержащей Ca^{2+} [10]. По-видимому, латротоксин усиливает процесс экзоцитоза не только благодаря своим ионофорным свойствам.

Действие латротоксина исследовали на предложенной нами бесклеточной модели нейросекреции. Было установлено, что латротоксин (10 нМ) в инкубационной среде, не содержащей Ca^{2+} , инициировал слияние синаптических везикул и мембран синапсом (рис. 3). Аналогичный результат был получен при наличии в среде одного лишь Ca^{2+} без латротоксина. При этом, как видно из рис. 3, латротоксин не оказывал

влияния на проницаемость синаптических везикул. Далее было установлено, что взаимодействие синаптических везикул и мембран синапсом зависит от концентрации латротоксина (рис. 4). При изучении этой зависимости в модельную систему вводили мембраны синапсом, обработанные латротоксином в разной концентрации. При этом обработку мембран проводили следующим образом. В одном случае весь латротоксин после предварительной инкубации с мембранами синапсом оставался в среде. При другом варианте удаляли ту часть латротоксина, которая, возможно, не связалась с мембранами синапсом. В обоих случаях, как следует из рис. 4, были получены практически одинаковые

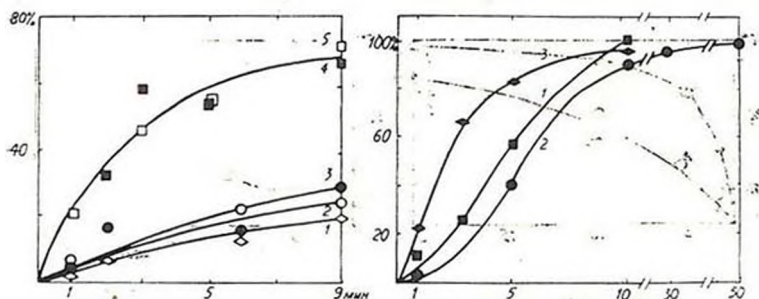


Рис. 3. Влияние латротоксина (10 нМ) на взаимодействие синаптических везикул и мембран синапсом. Выход $^{86}\text{Rb}^+$ из синаптических везикул в среде, содержащей: 1—везикулы; 2—везикулы, мембраны; 3—везикулы, латротоксин; 4—везикулы, мембраны, латротоксин; 5—везикулы, мембраны, 10^{-4} М Ca^{2+} . По оси абсцисс—время в мин; по оси ординат—выход $^{86}\text{Rb}^+$ в %

Рис. 4. Зависимость взаимодействия синаптических везикул и мембран синапсом от концентрации латротоксина. Выход $^{22}\text{Na}^+$ из синаптических везикул в присутствии мембран синапсом, обработанных латротоксином в следующих условиях: 1—свободный латротоксин присутствует в среде; 2—свободный латротоксин удален; 3—обработка в присутствии 10^{-4} М Ca^{2+} ; после обработки свободный латротоксин и Ca^{2+} удалены. По оси абсцисс—концентрация латротоксина в нМ; по оси ординат—выход $^{22}\text{Na}^+$ в %

результаты. Полумаксимальный эффект взаимодействия мембранных структур достигался при концентрации латротоксина 5 нМ. В таких условиях введение Ca^{2+} в инкубационную среду не ускоряло процесса слияния. Однако, если обработку мембран латротоксином проводили в присутствии Ca^{2+} (10^{-4} М), полумаксимальный эффект латротоксина обнаруживается уже при концентрации 2.5 нМ, что свидетельствует об усилении связывания нейротоксина с мембранами синапсом.

Эти результаты указывают на то, что в осуществлении межмембранных взаимодействий участвует связанный с мембранами, а не свободный латротоксин. Такое предположение подтверждается результатами экспериментов, представленных на рис. 5. Обработанные латротоксином

(10 нМ), но не отмытые от несвязавшегося нейротоксина мембраны синапсом инкубировали с антителами против латротоксина в течение 20 мин при 22°, а затем использовали в модельной системе. Несмотря на такую обработку, эффект латротоксина проявлялся в полной мере, в то время как аналогичная обработка свободного латротоксина до инкубации с мембранами полностью ингибировала его действие. Поэтому представляется маловероятным участие свободного или адсорбированного на поверхности мембран латротоксина в инициации процесса слияния.

Интересно было выяснить, насколько специфичен обнаруженный фузогенный эффект латротоксина по отношению к синаптическим везикулам. Будет ли он проявляться, если вместо них в среду добавить липосомы?

На рис. 6 представлены данные, свидетельствующие о том, что

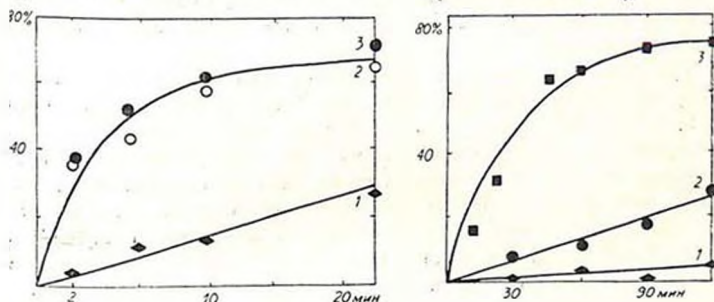


Рис. 5. Выход $^{86}\text{Rb}^+$ из синаптических везикул в присутствии мембран синапсом, обработанных: 1—латротоксином (10 нМ), предварительно проинкубированным с антителами к нему; 2—латротоксином; 3—латротоксином, а затем антителами к нему. По оси абсцисс—время в мин; по оси ординат—выход $^{86}\text{Rb}^+$ в %

Рис. 6. Взаимодействие фосфатидилхолиновых липосом с мембранами синапсом. Выход $^{86}\text{Rb}^+$ из липосом в среде, содержащей: 1—липосомы; 2—липосомы, мембраны синапсом; 3—липосомы, мембраны синапсом, обработанные латротоксином (10 нМ). По оси абсцисс—время в мин; по оси ординат—выход $^{86}\text{Rb}^+$ из липосом в %

в среде, не содержащей Ca^{2+} , нагруженные $^{86}\text{Rb}^+$ фосфатидилхолиновые липосомы активно взаимодействовали с мембранами синапсом, предварительно обработанными латротоксином. По-видимому, полипептидная часть латротоксина, проникающая через мембрану синапсом, имеет гидрофобную группировку, которая легко связывается с липидной мембраной липосом. Таким образом, латротоксин, встроенный в мембрану синапсом, придает ей способность взаимодействовать с другими мембранными структурами, как биологическими, так и искусственными.

На основании полученных нами экспериментальных данных на бесклеточной модели нейросекреции можно заключить, что латротоксин, помимо известной каналообразующей активности, обладает еще фузо-

генными свойствами. Именно фузогенной активностью латротоксина можно объяснить пресинаптический эффект его на нервных окончаниях в отсутствие Ca^{2+} . Обнаруженное новое свойство латротоксина в экспериментах с использованием бесклеточной модели нейросекреции расширяет методические подходы к выяснению механизма экзоцитоза и нейросекреции.

CELL-FREE MODEL OF NEUROSECRETION

LISHKO V. K., TERLETSKAYA YA. T., GEGELASHVILI G. K.

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

A cell-free model of neurosecretion consisting of purified fractions of synaptic vesicles, synaptic plasma membranes and micromolar amounts of Ca^{2+} is proposed.

The effect of latrotoxin—a protein of *Latrodectus mactans* *tredinguttatus* venom—on this model was investigated. It was shown that in Ca^{2+} -free medium latrotoxin induced fusion of synaptic plasma membranes with synaptic vesicles as well as with phosphatidylcholine liposomes. The rate of this process versus latrotoxin concentration has been studied. It was established that effect of latrotoxin incorporated into synaptic membranes cannot be eliminated by latrotoxin antibodies. It was concluded that presynaptic effect of latrotoxin is due not to its channel-forming properties only but to fusogenic properties as well.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Burgoyne R. D. *Biochim. et biophys. acta*, v. 779, N2, p. 201—217, 1984.
2. Creutz C. E. *Metal Ions Biol. Syst.*, v. 17, p. 319—351, 1984.
3. Лишко В. К., Терлецкая Я. Т., Гегелашвили Г. К. *Биол. мембраны*, т. 3, № 2, с. 191—196, 1986.
4. Мудрак Н. Н., Колчинская Л. Н., Лишко В. К. *Укр. биохим. журн.*, т. 55, № 2, с. 185—189, 1983.
5. Portzehl H., Caldwell P. C., Ruegg J. C. *Biochim. et biophys. acta*, v. 79, N3, p. 581—591, 1964.
6. Szoka E., Papahadjopoulos D. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Biol. Sci.*, v. 75, N9, p. 4194—4198, 1978.
7. Markwell M. A. K., Haas S. M., Bieber L. L., Tolbert M. E. *Anal. Biochem.*, v. 87, N1, p. 206—210, 1978.
8. Scheer H., Meldolesi J. *EMBO J.*, v. 4, N2, p. 323—327, 1985.
9. Treng M. C., Cohen R. S., Siekevitz P. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Biol. Sci.*, v. 75, N8, p. 4016—4020, 1978.
10. Hurlbut W. P., Ceccarelli B. *Adv. in Cytopharmacology* (eds. B. Ceccarelli, B. Clementi), Raven Press, N. Y., v. 3, p. 87—115, 1979.

Поступила 9. IX 1986

ГИПОТЕЗА О СУЩЕСТВОВАНИИ НОВОЙ ВЫСШЕЙ КАТЕГОРИИ В ИЕРАРХИИ РЕГУЛЯТОРНЫХ ПЕПТИДОВ

АШМАРИН И. П.

МГУ им. М. В. Ломоносова, биологический факультет

Анализ данных о взаимных влияниях регуляторных пептидов (РП) на их выход во внутреннюю среду организма позволил выявить группу РП—взаактивный интестинальный пептид (ВИП), холецистокинин (ХЦК), нейротензин и, возможно, некоторые другие, которые занимают особое положение. РП этой группы оказывают влияние на выход других разнообразных РП, включая гипоталамические пептиды, но сами в сравнительно небольшой степени подвержены регулируемому выходу действию последних. Наряду с этими, именно ВИП и ХЦК характеризуются особенно высоким содержанием в коре больших полушарий головного мозга. Рассмотрена гипотеза о том, что ВИП и ХЦК представляют собой более высокую иерархическую категорию РП по сравнению с либериными и статинами гипоталамуса.

Взаимные влияния РП на выход их в различные области организма представляются в настоящее время чрезвычайно сложными. До середины 70-х годов сложилась так называемая «унитарная концепция» [1], согласно которой на вершине иерархической лестницы РП находятся пептиды-регуляторы, образующиеся в гипоталамусе (рилизинг-факторы, либерины и статины), которые модулируют выход всех (или большинства) пептидных гормонов гипофиза. В свою очередь, гипофизарные РП служат регуляторами выхода большей части пептидных и стероидных гормонов на периферии или оказывают прямое действие на функции ряда систем организма. Стремительное развитие исследований РП в течение последнего десятилетия, открытие многих десятков новых РП, образующихся в разных отделах организма и характеризующихся полифункциональностью, выявление новых функций у ранее открытых РП,— все это привело и к чрезвычайному усложнению представлений о взаимных влияниях РП на их выход в среды организма. Это не означает отмены установленных ранее иерархических отношений. В какой-то мере произошло даже укрепление представлений о том, что в гипоталамусе образуются более или менее специфические регуляторы выхода всех РП гипофиза. Были открыты и всесторонне изучены новые РП такого типа, например, кортиколиберин. Однако на эту стройную схему наложился многочисленный, подчас противоречивые данные о действии других РП, особенно тех, которые образуются в отделах головного мозга вне гипоталамуса, на выход как самих РП гипоталамуса, так и ряда других РП, находящихся на всех ступенях упомянутой иерархической лестницы. Задача настоящей работы состоит в обобщении обширных литературных данных по этой проблеме и попытке выявления новой ступени в иерархии РП.

Для наиболее наглядного представления и удобства анализа взаимных влияний РП мы сформировали схемы 1 и 2. На этих схемах РП размещены по окружностям. Возле каждого РП на схеме 1 имеются

две точки. первая из которых (D) служит началом стрелок, отражающих активирующее действие данного РП на выход других РП, а вторая (R) является «мишенью» стрелок от других РП, включенных в схему, и отражает активирующее действие последних на выход данного РП. На схеме 2 таким же образом представлено подавляющее действие каждого из РП.

Схемы основаны преимущественно на литературных данных, опубликованных до 1984 г. включительно и обобщенных в предыдущем обзоре ([2], табл. 4). Поэтому, стремясь сократить объем литературных

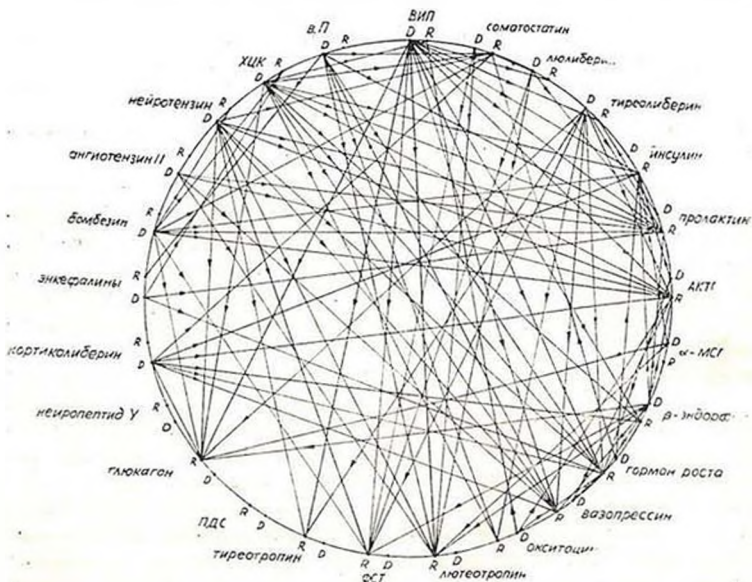


Схема 1. Взаимные активирующие воздействия регуляторных пептидов.

ссылок, здесь мы указываем преимущественно работы, не включенные в указанный обзор. К ним относятся, в частности, сообщения, в которых подтверждается усиление выхода пролактина [3—5] и гормона роста [5] под действием нейротензина, и выявляется эффект последнего на выход соматостатина коры больших полушарий головного мозга *in vitro* [6]. Расширены представления о регуляторных эффектах бомбезина: его внутривенное введение приводило к существенному повышению уровня содержания ХЦК, инсулина, энтерогликина, гастрина и нейротензина в плазме крови [7]. Бомбезин является также вероятным стимулятором выхода соматостатина [8].

При анализе схем 1 и 2 обращает на себя внимание обилие воздействий, исходящих от ХЦК [9—19], ВИП [20, 21], нейротензина и бом-

безина [11, 22]. Они направлены на широкий круг РП, но особого внимания заслуживает действие этих пептидов на выход гормонов гипоталамуса. Так, ХЦК и нейротензин активируют выход соматостатина и подавляют выход люлиберина и тиреолиберина; ВИП, напротив, подавляет выход соматостатина и активирует выход люлиберина и тиреолиберина. Отметим также активирующее действие всех трех пептидов на выход вазопрессина, учитывая, что гипоталамус является одним из отделов, где образуется вазопрессин. Четвертый из перечисленных выше РП—бомбезин—усиливает выход соматостатина и подавляет выход тиреолиберина. Сопоставим эти данные с тем фактом, что все три отме-

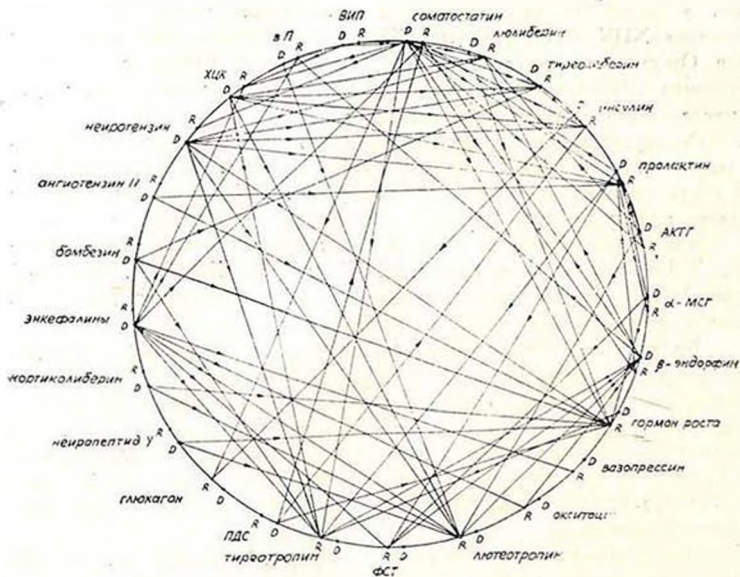


Схема 2. Взаимные подавляющие воздействия регуляторных пептидов.

ченных РП обнаружены в мозгу и вне гипоталамуса, причем ХЦК и ВИП особенно много в коре—40—500 пг/мг сырой ткани [23]. По их содержанию кора занимает одно из первых мест в организме, причем есть все основания считать, что в ней они не только содержатся, но и синтезируются. Важно также, что и кора, и гипоталамус находятся за ГЭБ, иначе говоря, этот барьер не является препятствием на пути ХЦК и ВИП от коры к гипоталамусу. Нейротензин и бомбезин, хотя и содержатся в коре, но не столь изобильно, как ХЦК и ВИП (2—4 пг/мг сырой ткани или менее) [23]. Все это является достаточным для предположения, что по крайней мере ХЦК и ВИП, а, возможно, и некоторые другие РП, находятся на вершине иерархии пептидных регуляторов.

Рассмотрим аргументы, противоречащие выдвинутому предположению. Активирующее действие ХЦК и ВИП на выход пептидов гипоталамуса может быть не прямым, а опосредованным. Настойчивый поиск влияний самых разнообразных регуляторных факторов на ту или иную функцию, включая выход РП гипоталамуса, всегда может привести к обнаружению некоторого влияния, если не отбирать наиболее быстрые и четко выраженные эффекты, причем те именно, которые наблюдаются при внутримозговом введении изучаемого РП. Однако работы, использованные при построении схем 1 и 2, относятся, как правило, к последней категории. Тем не менее, для превращения выдвинутых предположений в доказательства потребуются исследования тонких механизмов действия ХЦК, ВИП и других РП на выход гипоталамических пептидов. Открытым остается и вопрос о том, имеет ли каждый из рассматриваемых РП коры преимущественную специализацию на регуляцию выхода одного из гипоталамических пептидов.

Обращаясь вновь к схеме 2, где представлены подавляющие влияния, следует отметить обилие соответствующих эффектов энкефалинов [24]. В числе объектов действия опять оказывается РП гипоталамуса соматостатин, а также вазопрессин и окситоцин [25].

Характерным пептидом коры является недавно открытый нейропептид Y. По содержанию он близок к ХЦК и ВИП (150—210 пг/мг сырой ткани) [23]. Однако пока данные о его влиянии на выход других РП весьма немногочисленны.

Выдвигаемое предположение об особой роли ХЦК, ВИП и, возможно, некоторых других пептидов коры в иерархии РП не противоречит накапливающимся данным о других многочисленных проявлениях их биологической активности—поведенческой, сосудорегуляторной и других. Довольно давно на примере РП гипоталамуса показано, что сочетание их специфического регуляторного действия на выход других РП с целым рядом других четко выраженных функций вообще характерно для пептидов-регуляторов.

Таким образом, развивая далее исследования взаимных влияний РП на их выход в среды организма, целесообразно иметь в виду предлагаемую гипотезу о существовании наиболее высокой иерархической категории пептидов-регуляторов, образующихся в коре больших полушарий головного мозга и модулирующих выход РП гипоталамуса. К ним относятся, с наибольшей вероятностью, ХЦК и ВИП.

Автор благодарит Н. В. Плахину за идею графического представления взаимосвязи между регуляторными пептидами.

HYPOTHESIS OF THE EXISTENCE OF A NEW HIGHER CATEGORY IN THE HIERARCHY OF REGULATORY PEPTIDES

ASHMARIN I. P.

M. V. Lomonosov State University, Moscow

The analysis of the mutual effects of regulatory peptides (RP) on their release into the internal media of the organism made it possible to reveal a new group of RP including vasoactive intestinal peptide (VIP), cholecystokinin (CCK), neurotensin and perhaps some others which occupy a peculiar position. These RP modulate the secretion of other various RP (including hypothalamic peptides) but their own release is not affected significantly by the latter. Besides, it is characteristic of VIP and CCK to exist in cerebral cortex in particularly high quantities. A hypothesis that these peptides belong to the higher category in the hierarchy of RP (as compared with hypothalamic liberins and statins) is put forward.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Биохимия гормонов и гормональной регуляции (под ред. К. А. Юдаева). М., Наука, 1976.
2. Ашмарин И. П., Обухова М. Ф. Биохимия, т. 51, вып. 4, с. 531—545, 1986.
3. Memo M., Castelletti L., Valerio A., Pizzi M., Missale C., Carruba M. O., Spagno P. F. Regul. Pept., Suppl. 4, p. 200—202, 1985.
4. Canonico P. L. Mol. and Cell. Endocrinology, v. 42, №3, p. 215—220, 1985.
5. Rivier C., Brown M., Vale W. Endocrinology, v. 100, №3, p. 751—754, 1977.
6. Robbins R. J., Landon R. M. Brain Res., v. 332, №1, p. 161—164, 1985.
7. Nambu M., Ghatei M. A., Adrian T. B., Baccarese-Hamilton A. J., Muldery P. K., Bloom S. R. Biomed. Res., v. 5, №3, p. 229—234, 1984.
8. Wakabayashi I., Tonegawa Y., Shibasaki T., Ihara T., Hattori M., Ling N. Life Sci., v. 36, №15, p. 1437—1445, 1985.
9. Han J.—Sh., Ding X.—Z., Fan Sh.—G. Neuropeptides, v. 5, №4—6, p. 399—402, 1985.
10. Itoh Sh., Katsuzawa G., Yoshikawa K. Can. J. Physiol. and Pharmacol., v. 63, №1, p. 81—83, 1985.
11. Karashima T., Okajima T., Kato K., Ibayashi H. Endocrinol. Jap., v. 31, №5, p. 539—548, 1984.
12. Федотов В. П., Саломаткина Н. В., Гурлошиников В. И., Вахрамеев Л. А., Агашина Л. В., Шоачкин Ю. П., Коломейцева Л. А. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 97, № 6, с. 729—723, 1984.
13. Rozsa Z., Varro V. Neuropeptides, v. 6, №1, p. 71—81, 1985.
14. Matsumura M., Yamanol A., Yamamoto S., Mori H., Saito S. Hormone and Metab. Res., v. 16, №12, p. 626—630, 1984.
15. Matsumura M., Yamanol A., Yamamoto S., Mori H., Saito S. Hormone and Metab. Res., v. 17, №6, p. 293—297, 1985.
16. Schusdzlara V., Lenz N., Rewes B., Pfeijffer E.F. Neuropeptides, v. 4, №6, p. 507—519, 1984.
17. Soll A. H., Amrian D. A., Park J., Elashoff J. D., Yamade T. Amer. J. Physiol., v. 248, №5, p. G569—573, 1985.
18. Thomas R. M., Sander L. D. Peptides, v. 6, №4, p. 703—707, 1985.

19. *Matsumura M., Yamanoi A., Yamamoto S., Saito S.* Neuroendocrinology., v. 36, №6, p. 443—448, 1983.
20. *Vijayan E., Samson W. K., Said S. I., McCann S. M.* Endocrinology., v. 104, p. 53—57, 1979.
21. *Ahren B.* Peptides, v. 6, №4, p. 585—590, 1985.
22. *Pontiroli A. E., Scarpignato C.* Horm. Res., v. 23, №2, p. 129—136, 1985.
23. *Ашмарин И. П., Обухова М. Ф.* Журн. высш. нервн. деят-сти, т. 35, № 2, с. 211—221, 1985.
24. *Micevych P. E., Yaksh T. L., Go V. W., Finkelstein J. A.* Brain Res., v. 337, №2, p. 382—385, 1985.
25. *Summy-Long J. Y., Miller D. S., Rosella-Dampman L. M., Hartman R. D., Emmert S. E.* Brain Res., v. 309, №2, p. 362—366, 1984.

Поступила 9. IX 1986

Поступила 9. IX 1986

ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЛОКАЛИЗАЦИИ НЕКОТОРЫХ ПЕПТИДНЫХ НЕЙРОГОРМОНОВ В ГИПОТАЛАМО-ГИПОФИЗАРНОМ КОМПЛЕКСЕ ПОЗВОНОЧНЫХ

ПОЛЕНОВ А. Л., БЕЛЕНЬКИЙ М. А., ДАНИЛОВА О. А.

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

На основании собственных и литературных данных представлена картина распределения в гипоталамо-гипофизарном комплексе разных позвоночных структур, продуцирующих кортиколиберин, вазопрессин и окситоцин. Описана общая тенденция развития этих систем в ходе онтогенеза и обсуждено значение перечисленных нейрогормонов для регуляции адаптивных реакций позвоночных животных.

В настоящем сообщении рассмотрены результаты собственных исследований и литературные данные, касающиеся нейропептидов, действующих в организме дистантно, как нейрогормоны (НГ), то есть через кровь, тканевую и спинномозговую жидкости. У позвоночных животных различного уровня организации показана локализация в гипоталамо-гипофизарном комплексе структур, продуцирующих кортиколиберин (КЛ), вазопрессин (ВП), окситоцин (ОТ) и их гомологи, таким образом те НГ, которые прежде всего вовлечены в поддержание гомеостаза и обеспечение защитно-приспособительных реакций организма. Представлены данные о становлении указанных структур в раннем онтогенезе млекопитающих, в частности белой крысы.

Данные о распределении нейросекреторных клеток (НСК) различной зрелости и особенно терминальных отделов их аксонов и дендритов, формирующих различные типы нейросекреторных контактов, вносят оп-

ределенный вклад в решение вопроса об их функциональном значении и о путях действия продуцируемых ими НГ.

Структуры, продуцирующие нонапептидные нейрогоормоны. Уже первые гистохимические исследования убедительно показали, что нонапептидные НГ локализуются почти исключительно в «классических» гомориположительных нейросекреторных формациях. У всех Апаипіа НСК, вырабатывающие нонапептидные НГ, находятся в преоптическом ядре гипоталамуса, причем преимущественно в его дорсальной крупноклеточной части. Многие из этих клеток располагаются в непосредственной близости ст эпидимной выстилки III желудочка, а их дендриты контактируют с его полостью. Такие контакты особенно хорошо видны, например, у осетровых рыб, подвергнутых гипофизэктомии [1]. НСК преоптического ядра у большинства Апаипіа продуцируют вазотоин (ВТ) и мезотоин (МТ), причем убедительно показано, что эти НГ синтезируются в разных НСК [2, 3]. У костистых рыб вместо МТ-ергических клеток обнаружены НСК, содержащие изотоин [2]. У круглоротых и ганондных рыб, в частности у осетровых, в преоптическом ядре четко идентифицированы лишь ВТ-ергические НСК, хотя по данным биологического тестирования [4] и по предварительным результатам иммуноцитохимических исследований [5] у последней группы рыб наряду с ВТ выявляется и ОТ-подобный НГ. У большинства низших позвоночных в преоптическом ядре нет какой-либо определенной зональности в распределении ВТ- и МТ-ергических элементов.

У рептилий и птиц НСК, продуцирующие ВТ и МТ, находятся в двух нейросекреторных формациях—супраоптическом и паравентрикулярном ядрах. У млекопитающих, НСК которых образуют ВП и ОТ, добавляется еще и постоптическое ядро. Кроме того, в гипоталамусе птиц и млекопитающих находятся дополнительные группы НСК, вырабатывающие нонапептиды [6]. В супраоптическом ядре млекопитающих ВП-ергические НСК локализованы преимущественно в медиобазальной части, а дорсолатерально их окружают ОТ-ергические НСК. В паравентрикулярном ядре ВП-ергические НСК представлены крупно- и мелкоклеточными элементами. Они занимают крупноклеточную часть ядра, а также медиальную, дорсальную и среднюю части мелкоклеточной зоны. ОТ-ергические НСК локализованы в ростродорсальном участке крупноклеточной части паравентрикулярного ядра [7]. У крыс ВП-ергические клетки выявлены и в дорсомедиальной части супрахиазматического ядра, однако эти клетки не имеют связи с нейрогемальной зоной нейрогипофиза, и, по-видимому, образуют только экстрагипоталамические проекции [8].

Многочисленные аксоны НСК, продуцирующих нонапептиды, направляются в передний (среднее возвышение) и в задний нейрогипофиз (задняя доля). Так, у изученных нами осетровых рыб терминалы ВТ-ергических НСК занимают обширную зону вблизи оболочки мозга, где контактируют с капиллярами первичного портального сплетения [5]. Значительное количество ВТ-ергических структур выявляется в контакте с капиллярами портальной системы гипофиза и у представителей других клас-

сов позвоночных [3]. У млекопитающих ВП-содержащие волокна, оканчивающиеся в переднем нейрогипофизе, принадлежат НСК мелкоклеточной части паравентрикулярного ядра и клеткам переднекомиссуральной группы [9, 10]. Проекций из супраоптического ядра там не выявлено.

Как показали электрономикроскопические иммуногистохимические исследования, нейросекреторные гранулы, содержащие ВП или ВТ в терминалах, локализованных в переднем нейрогипофизе, значительно меньше по размерам таковых, наблюдаемых в заднем нейрогипофизе [3, 11]. Эти данные свидетельствуют о том, что ВП (ВТ), выделяющийся в портальную циркуляцию в переднем нейрогипофизе и в систему общей циркуляции в заднем нейрогипофизе, продуцируется в разных НСК. Об этом же свидетельствуют и наши данные о различиях в реакции НСК переднекомиссуральной группы, паравентрикулярного ядра и супраоптического ядра у крыс, подвергнутых истинной адrenaлэктоми или только ложной [12].

Число ОТ-содержащих структур в переднем нейрогипофизе довольно ограничено. Так, у осетровых рыб лишь незначительное количество ОТ-иммунореактивных структур находится в переднем нейрогипофизе, причем их локализация в целом сходна с таковой ВТ-ергических элементов [5].

ВП (ВТ)- и ОТ (МТ)-ергические волокна и терминалы составляют основную массу структур заднего нейрогипофиза. Здесь терминалы НСК разной эргичности контактируют преимущественно с капиллярами системы общей циркуляции. У осетровых рыб часть терминалов контактирует с полостью гипофизарных бухт III желудка [5]. У всех позвоночных, кроме птиц, ВП (ВТ)-ергические волокна образуют либо опосредованные соединительной тканью, либо прямые контакты с железистыми клетками промежуточной доли гипофиза [3]. У млекопитающих (крыса) ВП-ергические волокна, принадлежащие в основном НСК супраоптического ядра и крупноклеточной части паравентрикулярного ядра, более или менее равномерно заполняют весь задний нейрогипофиз. ОТ-содержащие волокна располагаются преимущественно по периферии заднего нейрогипофиза.

Кортиколиберинергические структуры. Сопоставление препаратов, обработанных для иммуноцитохимического выявления КЛ и окрашенных по Гомори-Габу паральдегид-фуксином, позволило заключить, что этот НГ и гомориположительный нейросекреторный материал продуцируются разными НСК. У костистых рыб [13] и амфибий [14] КЛ-ергические НСК находятся в мелкоклеточной части преоптического ядра. Напротив, у осетровых рыб основная масса таких НСК сосредоточена в туберальном ядре, и лишь отдельные слабоокрашенные НСК выявляются в преоптическом ядре. У осетровых рыб эти НСК образуют многочисленные дендровентрикулярные контакты [15]. У млекопитающих (крыса) КЛ-ергические НСК сосредоточены в дорсомедиальной части паравентрикулярного ядра [16, 17]. Аксоны КЛ-ергических НСК направляются в основном в наружную зону срединного возвышения, где образуют контакты с капиллярами первичного портального сплетения, преимущественно в его ро-

стральном и медиальном отделах, реже в его каудальной части. Лишь небольшое число КЛ-содержащих волокон проникает в задний нейрогипофиз [18]. Например, у осетровых рыб такие волокна оканчиваются в контакте с соединительнотканной оболочкой, разделяющей задний нейрогипофиз и промежуточную долю, а также на синусоидных капиллярах системы общей циркуляции [15]. У млекопитающих КЛ-содержащие волокна видны лишь в проксимальном отделе заднего нейрогипофиза, однако никто не наблюдал их проникновения в промежуточную или переднюю доли гипофиза.

Представленная нами картина распределения пептидных НГ в гипоталамо-гипофизарном комплексе предполагает их выработку в разных НСК. Однако в последнее время появляется все больше сведений о наличии в одной НСК разных пептидов. В частности, описана колокализация ВП и КЛ в дорсомедиальной части паравентрикулярного ядра адреналэктомированных крыс. Есть указания на колокализацию ОТ и КЛ в НСК переднекомиссуральной группы [19, 20], что, однако, не подтвердилось нашими экспериментами, поскольку ни в норме, ни после адреналэктомии или введения колхицина нам не удалось обнаружить КЛ-иммунореактивных НСК в переднекомиссуральной группе.

В ходе эмбриогенеза иммуногистохимическим методом удается выявить ВП в перикарионах НСК супраоптического и паравентрикулярного ядер у 16-суточных плодов крыс [21]. В отличие от супраоптического и паравентрикулярного ядер, где уже у 10-суточных крыс имеется много иммунореактивных ВП и ОТ, в переднекомиссуральной группе у крыс этого возраста выявляются лишь отдельные клетки подобной эргичности. По прошествии 2-х недель их количество заметно возрастает, увеличивается интенсивность реакции на ВП и, особенно, на ОТ. Размеры ВП- и ОТ-синтезирующих НСК в супраоптическом и паравентрикулярном ядрах достигают дефинитивной величины к концу 1-го месяца жизни. ВП-ергические НСК супраоптического ядра и крупноклеточной части паравентрикулярного ядра меньше ОТ-ергических НСК как в этих центрах, так и в самой переднекомиссуральной группе.

КЛ иммуногистохимически впервые удалось выявить в ходе эмбриогенеза у 18-суточных плодов крыс [22]. Его количество увеличивается вплоть до родов, но непосредственно после рождения он перестает выявляться: первые его следы вновь начинают появляться только спустя 12 ч [22].

Анализ представленных в этом сообщении данных в функциональном аспекте позволяет прийти к следующим заключениям.

1. Обнаружение у низших позвоночных (например, у осетровых рыб) контактов терминалей дендритов и аксонов ВТ-, ОТ- и КЛ-ергических НСК с полостью III желудочка указывает на то, что их пептидные НГ могут поступать в области вентрикулярных контактов и в спинномозговую жидкость, оказывая таким путем нейротропный эффект на ЦНС.

2. Наличие контактов терминалей аксонов преимущественно КЛ- и ВП-ергических НСК с капиллярами первичного портального сплетения в

переднем нейрогипофизе допускает влияние НГ через портальный кровоток на функцию железистых клеток передней доли гипофиза, в первую очередь, на кортикотропоциты. Убедительно показано, что у млекопитающих ВП потенцирует действие КЛ, приводя к усилению выброса АКТГ в кровь [23].

3. Наличие терминалей аксонов ВТ-, ВП- и КЛ-ергических НСК на границе с промежуточной долей гипофиза, а ВП-ергических волокон в самой промежуточной доле допускает возможность влияния этих НГ на функцию ее железистых клеток. Так, у млекопитающих показано, что КЛ стимулирует выделение не только АКТГ, но и α -меланоцитостимулирующего гормона [23].

4. Наличие многочисленных контактов ВТ-, ВП- и ОТ (МТ)-ергических аксональных терминалей, а также части КЛ-ергических терминалей (у осетровых рыб) в заднем нейрогипофизе с капиллярами системы общего кровотока объясняет возможность поступления больших количеств пептидных нейрогормонов, а также какого-то количества КЛ в кровь. У млекопитающих установлено, что КЛ стимулирует секрецию норадреналина мозгового вещества надпочечников [24]. Возможно, именно таким путем в условиях стресса реализуется двойное пептид- и моноаминергическое влияние на функцию целого комплекса висцеральных органов, включая и периферические эндокринные железы-мишени.

IMMUNOGYTOCHEMICAL LOCALIZATION OF SOME PEPTIDE NEUROHORMONES IN HYPOTHALAMO-HYPOPHYSAL COMPLEX OF VERTEBRATA

POLENOV A. I., BELENKY M. A., DANILOVA O. A.

I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry USSR Acad. Sci., Leningrad

On the basis of personal and literature data, a pattern of distribution of structures, producing corticoliberin, vasopressin and oxytocin inside the hypothalamo-hypophyseal complex of vertebrata is presented. A common trend in the development of these systems in ontogenesis is described and importance of the above mentioned neurohormones in the regulation of the adaptation functions is discussed.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Поленов А. А., Белецкий М. А., Кузик В. В. Материалы Всесоюз. конф. «Экологическая физиология и биохимия рыб» (под ред. Ю. Б. Вирбикса). с. 417—418, Вильнюс, 1985.
2. Acher R. Neurosecretion and Neuroendocrine Activity (eds W. Bargmann et al.), p. 111—113, Berlin-Heidelberg, N Y., Springer, 1978.
3. Dierickx K. Int. Rev. Cytol., v. 62, p. 119—185, 1980.
4. Геллер Г. С., Заиди С. М. А., Поленов А. А., Гарлов П. Е.—В кн.: Тезисы отчетной сессии ЦНИОРХ, с. 40—42, Астрахань, 1972.

5. Гоосенс Н., Дисрикс К., Казаков В. К., Кузик В. В., Бельский М. А., Поленов А. Л.—В кн.: Структурная и функциональная организация нейроэндокринной системы (под ред. А. Л. Поленова), с. 30, Иваново, 1982.
6. Bleier R., Cohn P., Stiggelkov I. R.—In: Handbook of the Hypothalamus (eds. Morgan P. J., Panksepp J.), p. 137—220., N. Y., M. Dekker, 1979.
7. Hou-Yu A., Lamme A. T., Zimmerman E. A., Silverman A.-J. Neuroendocrinology, v. 44, p. 235—246, 1986.
8. Vandesande F., Dierickx K., De Mey J. Cell. Tiss. Res., v. 156, p. 377—380, 1975.
9. Swanson L. W., Kuypers H. G. J. M. J. Comp. Neurol., v. 194, p. 555—570, 1980.
10. Lechan R. M., Nestler J. L., Jacobson S. Brain Res., v. 245, p. 1—15, 1982.
11. Krisch B. Progr. Cyt:chem. Histochem., v. 13, part 2, p. 1—163, 1980.
12. Данилова О. А., Хрустич М., Черниговская Е. В. Журн. эволюц. биохимии и физиологии, т. 19, с. 571—578, 1983.
13. Olivereau M., Oliveier F., Vandesande F., Verdonck W. Coll. Tiss. Res., v. 237, p. 379—382, 1984.
14. Fasolo A., Andreone C., Vandesandw F. Neurosci. Lett., v. 49, p. 135—142, 1984.
15. Belenky M. A., Kuzik V. V., Chernigovskaya E. V., Polenov A. L. Gen. Comp. Endocrinol., v. 60, p. 20—26, 1985.
16. Bloom F. E., Battenberg E. L. F., Rivier J., Vale W. Regulatory Peptides, v. 4, p. 43—48, 1982.
17. Vale W., Rivier C., Brown M. R. et al. Recent Progr. Hormone Res., v. 39, p. 245—270, 1983.
18. Kawata M., Hashimoto K., Takahara J., Sano Y. Cell. Tiss. Res., v. 230, p. 247—258, 1983.
19. Roth K. A., Weber E., Barchas J. D. Life Sci., v. 31, p. 1857—1860, 1982.
20. Sazchenko P. E., Swanson L. W., Vale W. J. Neurosci., v. 4, p. 1118—1129, 1984.
21. Wolf G., Trautmann B. Endocrinology, B. 69, S. 222—226, 1977.
22. Bugnon C., Fellmann D., Gouget A., C. R. Acad. Sci., Sér 3, v. 294, p. 599—604, 1982.
23. Sakly M., Schmitt G., Koch B. Neuroendocrinol. Lett., v. 4, p. 289—294, 1982.
24. Brown M. R., Fisher L. A., Webb V., Vale W. Brain Res., v. 328, p. 355—357, 1985.

Поступила 9. IX 1986

УДК 577.112.389.6+612.82

БЕЛКИ, ПЕПТИДЫ И АУТОИММУННЫЕ ПОРАЖЕНИЯ МИЕЛИНА

ХАШИМ Дж. А.

Отделение хирургии и микробиологии Больничного центра Св. Луки: Колумбийский университет, Нью-Йорк, США

Рассеянный склероз и экспериментальный аллергический энцефаломиелит (ЭАЭ) являются патологическими процессами, связанными с поражениями миелина. Между этой болезнью у людей и ЭАЭ животных много общего, причем антигенные детерминанты ЭАЭ в последние 40 лет явились предметом многочисленных исследований и хорошо известны. В настоящее время причиной болезни считают основной белок миелина (ОБМ), положительно заряженный полипептид, содержащий около 170 ами-

нокислотных остатков. Хотя ЭАЭ у животных вызывается целым ОБМ, для развития ЭАЭ у разных видов достаточно введения лишь определенных малых фрагментов молекулы ОБМ. В данном обзоре обсуждается структура некоторых таких фрагментов—их аминокислотная последовательность и необходимая для индуцирования болезни последовательность эпитопов. Проведенные исследования на крысах линии *Levís* ясно свидетельствуют о том, что ЭАЭ медируется не только ответом Т-клеток на детерминанту п ОБМ со специфической последовательностью; для индукции Т-клетками классических признаков болезни, включая поражение ЦНС, необходим и ответ В-клеток на равным образом определенный участок ОБМ.

Рассеянный склероз является болезнью, связанной с демиелинизацией ЦНС. Она приводит к инвалидности и в острой фазе характеризуется расширением сосудов с инфильтрацией клеток плазмы и других факторов в околососудистое пространство, что ведет к воспалению и/или демиелинизации [1]. Многообразие типов клинических и неклинических симптомов рассеянного склероза и непредсказуемость течения болезни в каждом индивидуальном случае предполагает существование множества ее форм, возможно, вызываемых разными агентами. При рассеянном склерозе разрушение миелина нервных волокон и их осевых цилиндров приводит к образованию вокруг кровеносных сосудов склеротических бляшек. Что же запускает эту цепь, приводящую к воспалению и демиелинизации, и какова природа растормаживающих и патогенных факторов пока не ясно. Было предложено много теорий и сделано много выводов [2—12], но они не удовлетворяют исследователей, которые на протяжении многих лет изучали модель рассеянного склероза—ЭАЭ на лабораторных животных.

ЭАЭ—модель. Экспериментальные данные ясно показали сходство ЭАЭ с рассеянным склерозом [13—15]. Различные формы ЭАЭ, включая острую и хроническую, можно вызывать введением уникального антигена—ОБМ, естественного компонента миелина центральной и периферической НС [16]. Хотя другие компоненты миелина, в частности главный основной белок протеолипидов (известный как липофин), также вызывают демиелинизацию у морских свинок [17, 18] и кроликов [19], а галактоцереброзиды [20—22] потенцируют демиелинизацию, вызванную ОБМ, который остается важнейшим антигеном, ответственным за иммунные сдвиги, ведущие к демиелинизации в присутствии или отсутствии других компонентов миелина.

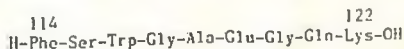
Основной белок миелина. ОБМ—главный компонент миелина как центральной, так и периферической НС. Он охарактеризован с химической и биологической стороны. Большая часть информации об ОБМ получена при исследованиях его в растворе; полученные сведения привели к полной расшифровке первичной структуры ОБМ быка [23] и человека [24]. Несмотря на допущенные при этом ошибки [25], биологическую активность этого белка признают, в основном, связанной с его первичной структурой и структурой многих его фрагментов, расшифрованной в результате их исследований в растворе [26].

Одной из отличительных черт ОБМ является его иммунологическая активность. Установлено, что он индуцирует, активирует и/или потенци-

рует иммунные реакции как гуморальные, так и клеточные. И общий ответ на введение ОБМ приводит к отторжению нормального миелина и развитию классических признаков ЭАЭ у животных.

Во многих сообщениях описано предупреждение, подавление и обратное развитие ЭАЭ после введения ОБМ без полного адьюванта Фрейнда [27—33]. Недостатком этих исследований является то, что в них были использованы недостаточно очищенные препараты ОБМ, которые содержали фрагменты ОБМ, способные регулировать течение болезни у животных [34, 35]. На деле же введение очищенного ОБМ не предотвращало или не подавляло ЭАЭ независимо от дозы или схемы лечения [36] и не индуцировало функцию клеток-супрессоров при переносе лимфоцитов от доноров, подвергнутых действию ОБМ, сингенным реципиентам [37]. Очевидно, защитные участки ОБМ погружены вглубь его молекулы, и их защитные функции у соответствующих видов животных могут выявляться лишь после высвобождения из родительской молекулы с одновременной инактивацией детерминант, ответственных за развитие ЭАЭ [34, 38]. Эти работы подчеркивают роль фрагментов ОБМ в биологической активности родительской молекулы.

Фрагменты ОБМ. ОБМ легко расщепляется эндогенными протеазами мозга *in situ*. Некоторые из этих ферментов были идентифицированы, так же как специфические места расщепления пептидных связей в молекуле ОБМ [39—42]. ОБМ легко атакуется и экзогенными протеазами, ряд которых его полностью гидролизует в течение 30-минутной инкубации [43]. Несмотря на такую чувствительность к действию протеаз, многие из образующихся фрагментов также мощно индуцируют болезнь (ЭАЭ) с клиническими и патологическими симптомами, похожими, если не идентичными вызываемым родительской молекулой ОБМ [44]. Эти наблюдения позволяют нам предсказать, что ЭАЭ-индуцирующая способность ОБМ может быть связана со специфическими участками пептидной цепи и что она сохраняется или уничтожается в зависимости от фермента, использованного для фрагментации. Например, показано, что индуцирующая ЭАЭ активность ОБМ у морских свинок и кроликов исчезает при обработке этого белка химотрипсином [45] и сохраняется при обработке пепсином [44]. Так, из продуктов действия пепсина на бычий ОБМ был выделен фрагмент, содержащий всего один остаток триптофана [44], и была установлена его аминокислотная последовательность [46]; оказалось, что он может вызвать ЭАЭ у морских свинок [44, 46]. Дальнейшее изучение этого фермента позволило установить, что участок ОБМ, вызывающий ЭАЭ у морских свинок, представляет собой конапептид [47] со следующей аминокислотной последовательностью:



С помощью аналогичного подхода была установлена последовательность участка ОБМ, вызывающего ЭАЭ у кроликов [48]. Она имеет общие черты с детерминантой ЭАЭ у морских свинок:

Детерминанта, вызывающая ЭАЭ у кроликов



Так как фрагмент со специфической аминокислотной последовательностью, вызывающий ЭАЭ у морских свинок, не вызывает ЭАЭ у кроликов, и наоборот, мы пришли к выводу, что в молекуле ОБМ существует много детерминантных последовательностей и каждая специфична для определенного вида животных. Так, последовательность, вызывающая ЭАЭ у обезьян [49], явно отличается от таковой для морских свинок и кроликов:



Наиболее подробно изучен участок ОБМ, вызывающий ЭАЭ у крыс линии *Lewis* [50—53]. Ни высокоочищенный препарат ОБМ быка, ни его фрагмент 44—89 не вызывали ЭАЭ у крыс линии *Lewis*. И наоборот, как интактный ОБМ морских свинок, так и его фрагмент 44—89 активно вызывали ЭАЭ у крыс линии *Lewis* [26]. Тщательное сопоставление аминокислотной последовательности фрагментов ОБМ 44—89 быка и морской свинки выявило весьма небольшое, но определенное филогенетическое отличие в аминокислотной последовательности 69—84.

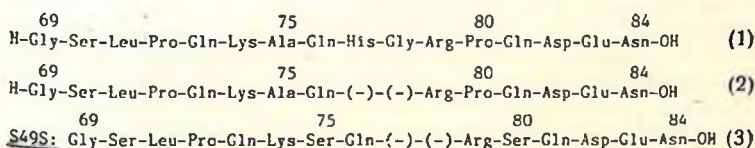
Последовательность аминокислотных остатков 69—84 в молекуле

ОБМ из разных источников

- | | | | | | | | | | | |
|-----|--|--|--|----|----|--|--|----|--|----|
| | 69 | | | 74 | 75 | | | 80 | | 84 |
| (1) | Gly-Ser-Leu-Pro-Gln-Lys-Ala-Gln-His-Gly-Arg-Pro-Gln-Asp-Glu-Asn-OH | | | | | | | | | |
| (2) | Gly-Ser-Leu-Pro-Gln-Lys-Ser-Gln-(-)-(-)-Arg-Ser-Gln-Asp-Glu-Asn-OH | | | | | | | | | |
| (3) | Gly-Ser-Leu-Pro-Gln-Lys-Ser-Gln-(-)-(-)-Arg-Thr-Gln-Asp-Gln-Asn-OH | | | | | | | | | |
| (4) | Gly-Ser-Leu-Pro-Gln-Lys-Ser-(-)-His-Gly-Arg-Thr-Gln-Asp-Glu-Asn-OH | | | | | | | | | |
| (5) | Gly-Ser-Leu-Pro-Gln-Lys-Ala-Gln-(-)-(-)-Arg-Pro-Gln-Asp-Glu-Asn-OH | | | | | | | | | |

Бык (1), морская свинка (2), крыса (3), человек (4), модифицированный пептид быка (5).

Здесь хорошо видны филогенетически обусловленные различия в последовательности участков 69—84. Последовательность 69—74 составляет С-концевую гексапептидную детерминанту, вызывающую ЭАЭ у кроликов. Так как последовательности, вызывающие ЭАЭ у морских свинок и кроликов, не перекрываются и расположены в разных частях молекулы ОБМ, тот же принцип может относиться и к последовательности фрагмента, вызывающего ЭАЭ у крыс. Таким образом, аминокислотная последовательность фрагмента 69—74 не обязательно должна составлять часть детерминанты, вызывающей ЭАЭ у крыс. Для проверки этого предположения твердофазным методом [50] нами были синтезированы пептиды с последовательностью 68—84 молекулы ОБМ быка и морской свинки, а также соответствующий аналог с последовательностью 69—84 быка, в котором остатки 77 и 78 были исключены:



Пептид S49S, детерминанта ЭАЭ морской свинки (1), пептид S8, детерминанта ЭАЭ быка (2), пептид S49, модифицированный пептид быка (3).

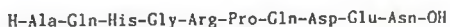
Мы обнаружили, что пептид S8 не вызывал ЭАЭ у крыс линии *Lewis* [50]; наоборот, пептид S49—аналог S8, в котором при синтезе остатки 77 и 78 (His-Gly) не были включены, активно вызывал болезнь. Хотя пептид S49 является аналогом бычьего пептида S8, присутствие остатка Ala в положении 75 и остатка Pro в положении 80 не изменяло ЭАЭ-индуцирующего свойства этой последовательности [51, 52]. Пептид S49S, соответствующий последовательности этого участка ОБМ морской свинки, был активен, как и пептид S49 [53]. Возможно, что группа His-Gly в положении 77—78 в молекуле бычьего ОБМ может быть ответственна за внутримолекулярное взаимодействие между гистидином и глутамином (Gln-73) или лизином (Lys-74), изолируя тем самым бычью детерминанту как в пептиде S8, так и в целой молекуле ОБМ. Присутствие His⁷⁷-Gly⁷⁸ блокирует узнавание бычьей аминокислотной последовательности детерминанты ЭАЭ иммунной системой крыс, но способность к нему появляется или при удалении этого дипептида (как в пептиде S49) или при удалении дипептида Gln⁷³-Lys⁷⁴ (из пептида S8)—введение этих измененных пептидов приводило к развитию классического ЭАЭ.

Одним из важных наблюдений, которому редко придавали значение, является разница в ЭАЭ-индуцирующем свойстве родительской молекулы ОБМ и отдельной ее детерминанты, вызывающей болезнь. Клинические и гистопатологические признаки болезни близки, если не идентичны, в обоих случаях, однако по молярным отношениям для индуцирования

симптомов равной степени требуется от 10 до 100 раз большее количество пептида, чем ОБМ. Это позволило предположить, что цельная молекула ОБМ может содержать не одну, а несколько энцефалитогенных детерминант для определенного вида животного и болезнь, вызываемая ОБМ, может быть комбинированным или синергическим эффектом таких множественных энцефалитогенных детерминант. Однако это предположение экспериментально пока не доказано. Равным образом, более высокая ЭАЭ-продуцирующая потенция родительской молекулы ОБМ по сравнению с эффектом ее пептидных фрагментов может быть обусловлена наличием в молекуле ОБМ вспомогательных детерминант и детерминант-супрессоров, однако комбинированная экспрессия этих двух типов детерминант будет противоречить высокой энцефалитогенной потенции ОБМ. Тот факт, что ОБМ не индуцирует функцию клеток-супрессоров, свидетельствует против наличия, а более вероятно, узнавания супрессорных детерминант в присутствии узнаваемых и мощных энцефалитогенных детерминант [37, 54, 55].

Ряд иммуноактивных детерминант молекулы ОБМ был идентифицирован, была определена их аминокислотная последовательность, доказана биологическая активность синтезированных детерминантных последовательностей. Однако мало внимания было уделено выявлению детерминантных последовательностей, способных вызывать выработку специфических антител, особенно тех, которые играют роль в развитии и контроле иммунных процессов, приводящих к демиелинизации.

В последние годы в содружестве с проф. D. Дау и его сотрудниками в Университете им. Дьюка (Сев. Каролина, США) мы установили, что антитела к ОБМ могут играть важную роль как в индукции, так и в регуляции иммунных реакций, приводящих к болезни. Было обнаружено, что антитела к энцефалитогенной детерминанте для крыс линии *Lewis* (пептид S6):



не узнают гомологичную аминокислотную последовательность (в пептиде S79), которая индуцирует функцию клеток-супрессоров, реализующих развитие ЭАЭ у некоторых видов:



Хотя аминокислотные последовательности в этих двух пептидах различаются только по С-концевому остатку (аспарагиновому в пептиде S6 и глутаминовому в пептиде S79), их антигенные свойства различны, и антитела к одному из них не преципитируют другой. Мы предположили поэтому, что антитела, по-видимому, могут играть определенную роль в патогенезе ЭАЭ и решили заново исследовать участок 65—102 в ОБМ морских свинок, в котором расположена активная энцефалогенная для крыс линии *Lewis* последовательность [53]. Был синтезирован пептид S53 со следующей последовательностью:

Введение крысам линии *Lewis* этого пептида, присоединенного к метилированному бычьему сероальбумину, или Me-BSA-S53, у животных появлялись клинические признаки болезни, напоминающие острый ЭАЭ: слабость задних конечностей, летаргия, повисшие хвосты. Однако ни у одной из крыс не наблюдали развития симптомов, таких типичных для острой формы ЭАЭ, как выраженный паралич задних конечностей или недержание. Гистологический анализ головного и спинного мозга и седалищного нерва показал полное отсутствие классических поражений, наблюдаемых при ЭАЭ: инфильтрация клетками плазмы, околосоудистые воротничко-инфильтраты и/или демиелинизированные очаги. В сыворотке крови были обнаружены антитела к S53, особенно у крыс, которым был введен Me-BSA-S53. Эксперименты по переносу антител от доноров, получавших Me-BSA-S53, сингенным реципиентам на протяжении 2 недель, привели к развитию клинических признаков болезни, аналогичных тем, которые имели место при активной иммунизации с помощью Me-BSA-S53, но гистопатологических признаков на срезах седалищного нерва, головного и спинного мозга при окраске с их помощью Н и Е или окраски на миелин (люксоль быстрый синий—AgNO₃) не было обнаружено. Можно заключить, что антитела к S53 недостаточны для развития классических симптомов ЭАЭ, обычно наблюдаемых после введения ОБМ морских свинок, и для этого необходимы дополнительные детерминанты с энцефалитогенной аминокислотной последовательностью. Для проверки этой гипотезы пептид S53 был удлинен по N-концу на 3 (пептид S55S) и на 6 (пептид S49S) аминокислотных остатков в соответствии с природной структурой ОБМ:

S55S:

72 75 84
H-Pro-Gln-Lys-Ser-Gln-Arg-Ser-Gln-Asp-Glu-Asn-OH

S49S:

69 75 84
Gly-Ser-Leu-Pro-Gln-Lys-Ser-Gln-Arg-Ser-Gln-Asp-Glu-Asn-OH

При введении крысам линии *Lewis* с полным адьювантом Фрейнда как пептид S55S, так и пептид S49S через 15 дней вызывали картину острого ЭАЭ. Клинические признаки при этом включали тяжелый паралич задних конечностей, недержание, иногда даже смерть. Гистологический анализ обнаружил типичное для ЭАЭ поражение головного и спинного мозга с обширными демиелинизированными очагами. В сыворотке крови были выявлены антитела к пептидам S55S и S49S так же, как и к пептиду S53S. Таким образом, наличие антител к S53 оказалось необходимым для развития болезни.

Возник вопрос о природе той аминокислотной последовательности, которую надо ввести, чтобы вызвать патологический процесс в ЦНС и, тем самым, клинический ЭАЭ. Тщательное рассмотрение последователь-

ностей в тех пептидных остатках, которые присоединялись к пептиду S53, показало, что группа Gln-Lys, которая, как это было обнаружено ранее [56], является основной последовательностью, ответственной для индукции гиперчувствительности задержанного типа у экспериментальных животных.

Таким образом, прибавление детерминанты Т-клеток к детерминанте В-клеток, определяемой последовательностью пептида S53, обеспечивает детерминанты для В- и Т-клеток, примером чему служит полная аминокислотная последовательность пептидов S55 или S49. Мы заключили, что последовательности пептидов S55S и S49S обеспечивали два эпитопа для функций В- и Т-клеток: обе они необходимы для развития классического ЭАЭ и определяют аминокислотную последовательность эпитопов, характеризующих вид животных, чувствительный к ЭАЭ, а именно крыс линии *Lewis*.

MYELIN PROTEINS, PEPTIDES AND AUTOIMMUNE DISEASES OF MYELIN

GEORGE A. HASHIM

Departments of Surgery and Microbiology St. Luke's-Roosevelt Hospital Center and Columbia University

Multiple Sclerosis (MS) and Experimental Allergic Encephalomyelitis (EAE) are immunological diseases of myelin. Although many similarities exist between the human and the experimental animal diseases, the antigenic principles responsible for the latter, EAE, are well known and have been the subject of many reports over the past 40 years. To date, researchers ascribe the disease to the myelin basic protein (MBP), a basically charged polypeptide of about 170 amino acid residues. Although the intact MBP induces EAE in animals, the entire molecule is not necessary for disease; rather, small and defined regions of the MBP induce disease in one species or another. In this overview, we discuss the structure of some of these regions, their amino acid sequences and the sequence epitopes necessary for inducing disease. Studies done in *Lewis* rats clearly show that the disease, EAE, is not only mediated by a T cell response to specific sequence determinant found in the MBP; rather a B cell response to an equally defined region of the MBP is necessary for primed T cells to induce classical signs of disease, including CNS pathology.

ЛИТЕРАТУРА

1. McAlpine D., Lumsden C. E., Acheson E. D. Multiple sclerosis: A Reappraisal, second edition, William and Wilkins, Baltimore, 1972.
2. Caspary E. A. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, v. 28, p. 61—68, 1965.
3. Dick G., McKeown F., Wilson D. C. Brit. Med. J., v. 1, p. 7—13, 1958.

4. Reed D., Sever J., Kurtzke J. F., Kurland L. T. *Archs. Neurol.* Chicago, v. 10, p. 402-411, 1964.
5. McAlpine D., Lumsden C. E., Acheson E. D. *Multiple Sclerosis: A Reappraisal*, E. and S. Livingstone, London, 1959.
6. Swank R. L. A biochemical basis of multiple sclerosis *Amer. Lecture Series*, publication N417 Springfield: Thomas, publisher, 1961.
7. Margulis M. S., Soloviev V. D., Shubladze A. K. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, v. 9, 63-74, 1946.
8. Leibowitz S. The immunology of multiple sclerosis in Adams, Hallpike, Tourtellotte, *Multiple sclerosis, pathology, diagnosis and management*. Chap. 12, p. 379-412 (Williams Wilkins, Baltimore), 1983.
9. Hauser S. L., Ault K. A., Levin M. J., Garavay M. R., Weiner H. L. *J. Immunol.*, v. 127, p. 1114-1117, 1981.
10. Santoli D., Moretta L., Lisak R., Gilden D., Koprowski H. *J. Immunol.*, v. 120, p. 1369-1371, 1978.
11. Hashim G. A., Lee D. H., Pierce J. C., Braun C. W., Fitzpatrick H. F. *Neurochem. Res.*, v. 3, p. 37-48, 1978.
12. Hashim G. A., Brewen M. J. *Neurosci. Res.*, v. 13, p. 349-355, 1985.
13. Arnason B. G. W. *Neurol. Clin.*, v. 1, p. 765-782, 1983.
14. Alvord E. C., Jr. The etiology and pathogenesis of experimental allergic encephalomyelitis in: *The central nervous system*. (eds. O. T. Bailey, D. E. Smith), p. 52-70, the William and Wilkins Co., Baltimore, 1968.
15. Paterson P. Y. *Adv. Immunol.*, v. 5, p. 131-208, 1966.
16. Hashim G. A. Multiple sclerosis and allergic encephalomyelitis in: *Handbook of Neurochem.*, (ed. A. Lajtha), Plenum Publ. Corp., v. 10, p. 207-223, 1985.
17. Hashim G. A., Wood D. D., Moscarello M. A. *Neurochem. Res.*, v. 5, p. 1137-1145, 1980.
18. Hashim G. A., Wood D. D., Moscarello M. A.: —In *Neurochemistry and Clinical Neurology*, Progress in Clinical and Biological Res. (eds. by L. Battistin, G. A. Hashim, A. Lajtha, Alan R. Liss), N. Y. Publisher, v. 39, p. 21-39, 1980.
19. Van der Veen R. C., Sokel R. A., Lees M. B. *J. Neuroimmunol.*, v. 11, p. 321-333, 1986.
20. Ruine C. S., Traugott U., Farouq M., Bornstein M. B., Norton W. T. *Lab. Invest.*, v. 45, p. 174-182, 1981.
21. Ruine C. S., Johnson A. B., Marcus D., Suzuki, Bornstein M. B. *J. Neurol. Sci.*, v. 52, p. 117-131, 1981.
22. Brozman C. F., Traugott U., Ruine C. S. Analysis of humoral and cellular events and the role of lipid haptens during CNS demyelination. *Actaneuropathol. Suppl.* (Berlin), v. 9, p. 59-70, 1983.
23. Eylar E. H., Brostoff S. W., Hashim G. A., Caccam J., Burnett P. *J. Biol. Chem.*, v. 246, p. 5770-5784, 1971.
24. Carnegie P. R. *Biochem. J.*, v. 123, p. 57-67, 1971.
25. Scoble H. A., Whittaker J. N., Biemann K. *J. Neurochem.*, v. 47, p. 614-616, 1986.
26. Hashim G. A. *Immunol. Rev.*, v. 39, p. 60-107, 1978.
27. Shaw C. M., Fahlberg W. J., Kies M. W., Alvord E. C., Jr. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, v. 19, p. 166-168, 1960.
28. Field E. J., Caspary E. A. *Nature*, v. 201, p. 936-938, 1964.
29. Alvord E. C., Jr., Shaw C. M., Hruby S., Kies M. W. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 122, p. 333-345, 1965.
30. Roboz-Einstein E., Csejtey J., Davis W. J., Rauch H. C. *Immunochemistry*, v. 5, p. 567-575, 1968.
31. Rauch H. C., Roboz-Einstein E. *J. Neurol. Sci.*, v. 23, p. 99-116, 1974.

32. Eylar E. H., Jackson J., Rothenberg B., Brostoff S. W. *Nature*, v. 236, p. 74—76, 1972.
33. Driscoll B. F., Kies M. W., Alvord E. C., Jr. *J. Immunol.*, v. 112, p. 392—397 1974.
34. Hashim G. A., Sharpe R. D., Carvalho E. F., Stevens L. E. *J. Immunol.*, v. 116, p. 126—130, 1976.
35. Swanborg R. H. *J. Immunol.*, v. 109, p. 540—546, 1972.
36. Hashim G. A. *Neurochem. Res.*, v. 5, p. 101—113, 1980.
37. Hashim G. A. *J. Immunol.*, v. 126, p. 419—423, 1981.
38. Hashim G. A. *Nature*, v. 1256, p. 593—595, 1975.
39. Benuck M., Marks N., Hashim G. A. *Eur. J. Biochem.*, v. 52, p. 615—621, 1975.
40. Roboz-Einstein E., Csejty J., Marks N. *FEBS Lett.*, v. 1, p. 191—195, 1968.
41. Marks N., Benuck M., Hashim G. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, v. 55, p. 68—74, 1974.
42. Whitaker J. N., Seyer J. M. *J. Biol. Chem.*, v. 254, p. 6956—6953, 1979.
43. Hashim G. A., Eylar E. H. *Arch. Biochem. and Biophys.*, v. 129, p. 635—644, 1969.
44. Hashim G. A., Eylar E. H. *Arch. Biochem. and Biophys.*, v. 129, p. 645—654, 1969.
45. Hashim G. A., Schilling F. J. *Arch. Biochem. and Biophys.*, v. 156, p. 287—297, 1973.
46. Eylar E. H., Hashim G. A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 61, p. 644—650, 1968.
47. Westell F. C., Robinson A. R., Caccam J., Jackson J., Eylar E. H. *Nature*, v. 229, p. 22—24, 1971.
48. Shapira R., Chou F. C—H., McKneally S., Urban E., Kibler R. *Science*, v. 173, p. 736—733, 1971.
49. Karkanis Y. D., Carlo J. C., Brostoff S. W., Eylar E. H. *J. Biol. Chem.*, v. 250, p. 1718—1722, 1975.
50. Hashim G. A. *Science*, v. 195, p. 1219—1221, 1977.
51. Hashim G. A., Carvalho E. F., Sharpe R. D. *J. Immunol.*, v. 121, p. 665—670, 1978.
52. Hashim G. A., Sharpe R. D., Carvalho E. F. *J. Neurochem.*, v. 32, p. 73—77 1979.
53. Hashim G. A., Day E. D., Fredone L., Intintola P. *J. Neurosci. Res.*, v. 16—Nov., 1986.
54. Kardys E., Hashim G. A. *J. Immunol.*, v. 127, p. 862—866, 1981.
55. Hashim G. A., Sharpe R. D., Carvalho E. F., Stevens L. E. *J. Immunol.*, v. 116, p. 126—130, 1976.
56. Hashim G. A., Sharpe R. D. *Immunochemistry*, v. 11, p. 633—640, 1974.

Поступила 10. IX 1986

ПОИСК ЭНДОГЕННЫХ ПЕПТИДНЫХ ЛИГАНДОВ БЕНЗОДИАЗЕПИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ: ВЫДЕЛЕНИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

БРУСОВ О. С., ЯКОВЛЕВ А. Г., ПЛОТНИКОВ В. В., *БАРАМ Г. И.,
*ГРАЧЕВ М. А., **КУМАРЕВ В. П., КУДРЯКОВА Т. Б.,
**БОРОВКОВ А. А., **КОБЗЕВ В. Ф.

ВНЦ психического здоровья АМН СССР, Москва;

*НИИ биоорганической химии СО АН СССР, **НИИ цитологии и генетики
СО АН СССР, Новосибирск

Разработана схема разделения индивидуальных пептидов, включающая высокоэффективную твердофазную экстракцию и микроколоночную хроматографию. На основе этого перехода из гипофиза быка был выделен в гомогенном виде пептидный ингибитор специфического связывания диазепам, который был нами назван пептид 2-2-1. Он обладает высоким сродством к бензодиазепиновым (БЗ) рецепторам и содержится в значительной концентрации в ткани гипофиза. Предпринята попытка идентифицировать ген пептидного ингибитора специфического связывания 3H-диазепама.

Обнаружение высокоаффинных мест специфического связывания психотропных препаратов и последующее открытие эндогенных опиоидных пептидов—лигандов морфинорецепторов привело к предположению о возможности существования эндогенных лигандов к основным группам лекарственных рецепторов. Во многих лабораториях с начала 80-х годов были начаты систематические работы по выделению подобных лигандов. Наибольшие усилия были направлены на поиск лигандов к бензодиазепиновым рецепторам. Однако до настоящего времени эти усилия не увенчались успехом.

В связи с этим рассмотрим какие же проблемы приходится решать при проведении такого поиска. Обратимся с этой целью к понятию эндогенного лиганда нейронного рецептора. Эндогенными лигандами принято обозначать гипотетические природные соединения, синтезирующиеся в физиологических условиях и попадающие в место действия в количествах, достаточных для реализации психотропного эффекта в результате взаимодействия с соответствующими лекарственными рецепторами ЦНС. Очевидно, что стратегия поиска лигандов должна включать этапы изучения химической структуры ингибиторов специфического связывания психотропного препарата, а также доказательства участия обнаруженных ингибиторов в модуляции *in vivo* активности лекарственных рецепторов ЦНС и, как следствие, в регуляции психического статуса человека и животных. Какая часть этой обширной программы уже выполнена? В настоящее время в биологических объектах выявлен ряд соединений различной структуры, способных снижать специфическое связывание диазепама [1]. Однако до сих пор не установлено, способны ли эти ингибиторы модулировать в физиологических условиях активность нейронов путем взаимодействия с БЗ-рецепторами. Поэтому вопрос о существовании эн-

догенных лигандов к этим рецепторам остается все еще открытым. На наш взгляд, дальше других в этом направлении удалось продвинуться группе сотрудников, руководимых д-ром Costa в США, которые обнаружили, выделили в гомогенном виде и частично охарактеризовали структуру пептида-ингибитора специфического связывания диазепама, названного ими DBI [2]. В опытах на животных этот пептид обладал выраженным анксиогенным действием, которое снималось введением диазепама или антагониста бензодиазепиновых рецепторов—соединения Ro-15-1788. Изучение распределения этого пептида в головном мозгу показало, что он локализован в основном в пределах ГАМК-ергических структур. На этом основании была выдвинута гипотеза о том, что DBI является котрансммитером ГАМК, модулирующим *in vivo* функциональную активность ГАМК-рецепторов в пределах ГАМК-бензодиазепинового рецепторного комплекса [3, 4].

При трипсинолизе этого пептида был выделен активный, содержащий 18 аминокислот фрагмент, способный связываться с БЗ-рецепторами и обладающий сходной фармакологической активностью [3, 4]. Однако микромолярное средство DBI и его фрагментов к БЗ-рецепторам заставляет сомневаться в участии этих пептидов в регуляции ГАМК-ергической нейротрансмиссии *in vivo*.

Выделение пептидного ингибитора специфического связывания ³H-диазепама из ткани гипофиза теленка. Во Всесоюзном научно-исследовательском центре психического здоровья АМН СССР совместно с Новосибирским научно-исследовательским институтом биоорганической химии СО АН СССР был также предпринят поиск эндогенных лигандов БЗ-рецепторов в пределах класса нейропептидов. Мы исходили из того, что биоактивные нейропептиды представляют собой нейромодуляторы, то есть взаимодействуют с нейронными структурами наподобие психотропных соединений. Кроме того, такие эксперименты дают непосредственный выход на структуры соответствующих генов и открывают большие возможности для молекулярно-генетических и биотехнологических исследований. С этой целью была разработана схема разделения индивидуальных пептидов, включавшая высоксоэффективную твердофазную экстракцию на предварительных этапах и микроколоночную хроматографию на конечных стадиях их выделения. Это позволило резко сократить время и повысить эффективность разделения индивидуальных пептидов и снизить вероятность образования артефактных продуктов. На основе этого подхода из гипофиза быка был выделен в гомогенном виде пептидный ингибитор специфического связывания диазепама, обладающий высоким сродством к бензодиазепиновым рецепторам и содержащийся в ткани гипофиза в значительной концентрации. Этот пептид в дальнейшем будем обозначать как пептид 2-2-1.

На рис. 1 приведена общая схема выделения пептидного ингибитора из гипофиза быка. Используемый нами метод Барамы и соавт. [5] для выделения индивидуальных пептидов из гипофиза является общим по отношению ко всем пептидам с величиной M_r до 10 кД. Он заклю-

чается в кислотной экстракции пептидов из гомогенатов ткани, концентрировании их на обращенной фазе и каскада обратнoфазных хроматографий в градиенте ацетонитрила в трис-фторацетатном буфере при нейтральном значении рН (рН 7) с последующим рехроматографированием выделенных пиков при рН 2 в градиенте ацетонитрила, содержащего 0,1% трифторуксусной кислоты. Разделение проводили при вы-

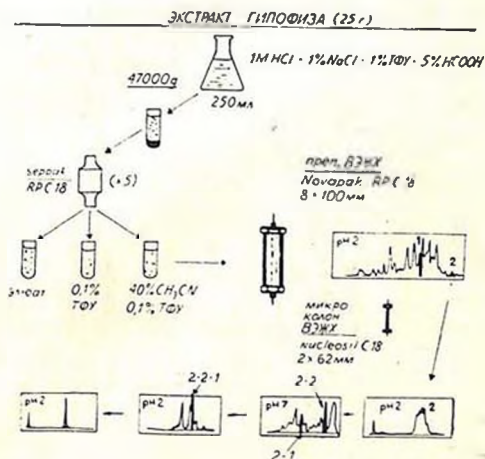


Рис. 1. Схема очистки из ткани гипофиза теленка пептидного ингибитора специфического связывания ^3H -дiazепама

сокой нагрузке на колонку, а последние хроматографические этапы выполняли на микроколонках объемом 200 мкл. Значительное изменение селективности, вызванное изменением рН и природы ион-парного реагента, позволило полностью разделять компоненты фракций после препаративной колонки. Использование микроколоночной хроматографии дало возможность избежать потерь материала, которые обычно происходят в случае разбавленных растворов. Во всех хроматографических экспериментах проводили 2-волновую детекцию: при 210 и 280 нм, используя многоволновой детектор типа «Милихром» (СССР) с объемом проточной кюветы 1,5 мкл [6]. Это давало возможность выявлять содержание ароматических аминокислот и оценивать гомогенность выделяемых пептидов. Ингибирующую активность фракций по отношению к связыванию ^3H -diazепама с мембранами коры больших полушарий головного мозга теленка определяли по методу Mohler, Okada [7].

После разделения экстракта на препаративной колонке был получен хроматографический профиль, представленный на рис. 2. Видно, что в анализируемом материале содержалось 2 фракции, ингибирующие специфическое связывание diaзепамa. Дальнейшей очистке подвергал только 2-й пик, так как он был менее загрязнен примесями.

Данный материал наносили на микрокололку в кислой среде (кололка 2×62 мм, Nucleosil 5C18, элюция линейным градиентом ацетонитрила от 0 до 50%, содержащего 0,1% трифторуксусной кислоты с рН 2 со скоростью 50 мкл/мин в течение 20 мин). Было обнаружено, что исходная фракция элюировалась в виде группы соединений, близких по хроматографической подвижности. При этом вся ингибирующая активность была локализована в пределах этой группы пиков (данные не показаны).

В связи с этим, для повышения эффективности разделения была

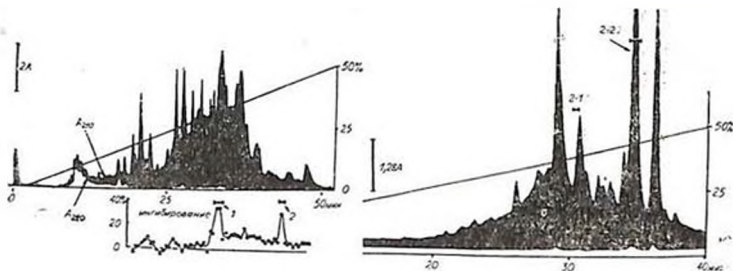


Рис. 2. Профиль элюции кислотного экстракта ткани гипофиза теленка (2,5 г) после обращеннофазной хроматографии на полупрепаративной колонке (8×100 мм) с сорбентом NovaPack 5C18. Колонку элюировали линейным градиентом ацетонитрила от 0 до 50%, содержащим 0,1% трифторуксусной кислоты, со скоростью 2 мл/мин в течение 50 мин. Собрали 50 фракций объемом 0,5 мл, каждую из которых тестировали на способность ингибировать специфическое связывание ^3H -диазенама. В верхней части рисунка представлен профиль УФ-поглощения материала при 210 нм (верхний профиль) и 280 нм (нижний профиль). В нижней части рисунка представлена ингибирующая способность фракций в % от контроля

Рис. 3. УФ-профиль поглощения (210 и 280 нм) при элюции активного материала, полученного после микроколоночной хроматографии Nucleosil 5C18 при рН 2, при рехроматографии в нейтральных условиях. Колонку (2×62 мм) с сорбентом Nucleosil 5C18 элюировали линейным градиентом ацетонитрила от 0 до 50%, содержащим 0,1%-ный трис-трифторфосфатный буфер рН 7, со скоростью 50 мкл/мин в течение 40 мин. Фракции, ингибирующие специфическое связывание ^3H -диазенама, выделены на рисунке и обозначены как 2-1 и 2-2

изменена селективность колонки посредством изменения рН и природы ион-парного реагента. Активный материал после предыдущей хроматографии был объединен и рехроматографирован в этих новых условиях. Нанесенный материал разделился на большое число пиков (рис. 3). Анализ полученных фракций показал наличие ингибирующей активности в пределах фракций, обозначенных на рис. 3 как фракции 2-1 и 2-2, которые затем были рехроматографированы в кислой среде. Фракция 2-1 после хроматографии разделилась на ряд пиков, при этом вся ингибиторная активность ассоциировалась только с одним из этих пиков (данные не по-

казаны). К сожалению, количество вещества в этом пике было недостаточно для его дальнейшего анализа. Фракция 2-2 после рехроматографии также разделалась на ряд УФ-пиков (рис. 4). Ингибирующая активность была ассоциирована с 3-мя фракциями. Максимальная активность была локализована в 1-й фракции. Поэтому дальнейший анализ проводили именно с этой фракцией. Для контроля чистоты этой фракции ее вновь хроматографировали в тех же условиях (рис. 5). Отношение величин поглощения при 210 и 280 нм оставалось постоянным вдоль всего его профиля, что указывает на гомогенность этой фракции.

Для доказательства пептидной природы выделенного пика он был подвергнут трипсинолизу. На рис. 6 представлен профиль элюции триптических фрагментов выделенного соединения. В верхней части рис. 6 изображен соответствующий профиль элюции материала, полученного после инкубации трипсина с буфером в аналогичных условиях, что является контролем на возможное загрязнение материала продуктами гидролиза самого трипсина. В области локализации исходного соединения пики от-

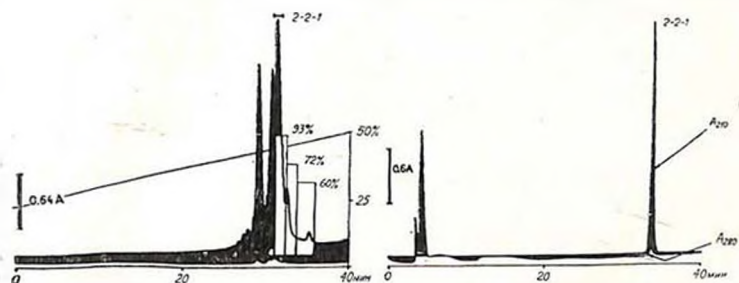


Рис. 4. Профиль элюции фракции 2-2 после рехроматографии на микроколонке при pH 2. Колонку (2×62 мм) с сорбентом Nucleosil 5C18 элюировали линейным градиентом ацетонитрила с 20 до 50%, содержащим 0,1% трифторуксусной кислоты pH 2, со скоростью 50 мкл/мин в течение 40 мин. Открытыми столбиками обозначено ингибирование специфического связывания 35 S-метки активными фракциями в %. Для дальнейшего анализа была взята фракция, ингибирующая связывание на 93% (фракция пептида 2-2-1).

Рис. 5. Профиль элюции фракции пептида 2-2-1 после рехроматографии на микроколонке при pH 2. Условия хроматографии приведены на рис. 4.

сутствуют. Эти данные однозначно показывают, что выделенное вещество являлось пептидом. Поскольку триптическая карта достаточно проста, величина M_r выделенного пептида (пептид 2-2-1), по-видимому, невелика. Следует заметить, что количество триптических фрагментов в пептиде 2-2-1 оказалось значительно меньше, чем в пептиде DBI (2—4).

В таблице приведено сравнение некоторых характеристик пептида 2-2-1 и пептида DBI. Исходя из среднестатистических значений длины триптического фрагмента, находящихся в пределах 10—20 аминокислот и количества фрагментов пептида 2-2-1 можно оценить величину M_r этого

пептида, которая будет порядка 4—8 кД. При этом мы предполагаем, что пептид не имеет аномальной аминокислотной последовательности. Если предположить, что пептид 2-2-1 конкурентно взаимодействует с БЗ-рецепторами, то можно оценить величину сродства пептида к последним, которая будет на 1-2 порядка больше, чем у пептида DBI (2-4). Кроме того, величины отношения оптических плотностей при 210 и 280 нм, экспериментально установленные для пептида 2-2-1 и рассчитанные для пептида DBI, достоверно различаются. Таким образом, можно предположить,

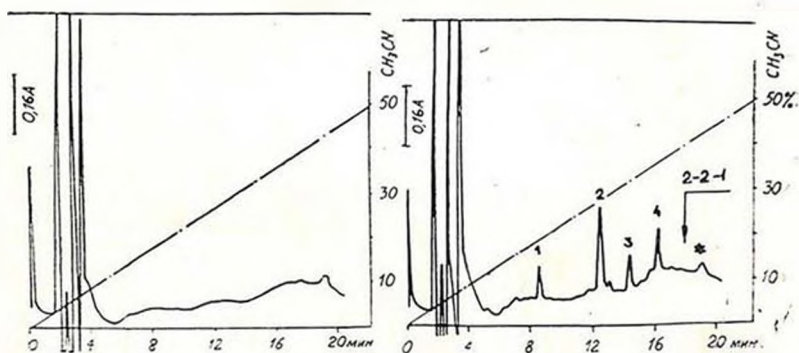


Рис. 6. Профиль элюции триптических фрагментов очищенного пептида 2-2-1 после микроколоночной хроматографии при pH 2. 1 мкг пептида 2-2-1 расщепляли ТРСК-трипсином («Serva», ФРГ, 0,05 мкг) в течение 8 ч. при 40° в 45 мкл 0,1 М трис-HCl буфера, pH 8,0. Продукты протеолиза наносили на колонку (2×62 мм, Nucleosil 5C18) и элюировали линейным градиентом ацетонитрила от 0 до 50%, содержащим 0,1% трифторуксусной кислоты pH 2, со скоростью 100 мкл/мин в течение 22 мин. Выход пептидов прослеживали по определению УФ-поглощения элюата при 210 нм. Стрелкой показано время выхода исходного пептида 2-2-1

что определенное по спектральным характеристикам содержание ароматических аминокислот в пептиде 2-2-1 не соответствует составу DBI.

Поскольку точных оценок величин M_i и сродства мы пока не имеем, то удастся оценить содержание пептида 2-2-1 в гипофизе только относительно его констант ингибирования. Эта величина равна приблизительно 10 значениям K_i , то есть средняя концентрация пептида в гипофизе примерно в 10 раз больше концентрации, необходимой для 50%-ного вытеснения диазепама из БЗ-рецепторов. Столь высокое значение содержания пептида 2-2-1 может свидетельствовать о том, что гипофиз является местом хранения этого соединения.

Общая характеристика пептида 2-2-1 свидетельствует, что он, видимо, является наиболее вероятным кандидатом на роль эндогенного лиганда БЗ-рецепторов из числа известных до настоящего времени ингибиторов специфического связывания диазепама.

Таким образом, с помощью примененных в данной работе твердо-

фазной экстракции и микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии нами был получен пептид-ингибитор специфического связывания диазепамов, отличающийся от ранее известного пептидного ингибитора—DBI. Очевидно, первоочередной задачей является расшифровка его структуры, исследование топографии в головном мозгу и изучение физиологической роли. На повестке дня также стоит синтез соответствующих олигонуклеотидных зондов, выделение и изучение гена, кодирующего синтез пептида 2-2-1.

Идентификация гена пептидного ингибитора специфического связывания 3H -диазепамов. В настоящее время в ВНИИ психического здоровья

Таблица

Сравнение некоторых свойств пептидов 2-2-1 и DBI

Параметры	2-2-1	DBI
Величина M_r (кД)	4-8*	11,7
A_{280}/A_{210}	0,02-0,005	0,048*
K_i ($n_{11}=1$), (нМ)	75-150*	4000

* Рассчитанные значения. Данные для пептида DBI взяты из работ Costa и соавт. [2-4].

АМН СССР совместно с Новосибирским научно-исследовательским институтом цитологии и генетики СО АН СССР начаты работы по синтезу олигонуклеотидных проб и с их помощью изучение генетических факторов, контролирующих синтез соответствующих пептидов. В качестве модельной была взята задача синтеза и проперки олигонуклеотидного зонда, позволяющего обнаружить ген пептида DBI. Этот пептид с величиной M_r около 11,7 кД обнаруживается в головном мозгу человека и крысы в концентрации от 10 до 20 мкМ и, по-видимому, является анксиогенным веществом [2-4].

Пептид DBI состоит из 104 аминокислот, последовательность которых не имеет гомологий ни с одной из известных аминокислотных последовательностей пептидов млекопитающих [2].

С целью обнаружения и последующего клонирования специфического структурного гена DBI мы воспользовались традиционным методом идентификации генов посредством использования в качестве молекулярных зондов олигонуклеотидных проб, нуклеотидная последовательность которых воспроизводит предполагаемую последовательность гена, кодирующего пептид. Использование синтетических олигонуклеотидов в качестве молекулярных зондов, как правило, сопряжено со сложными и кропотливыми процедурами выделения, идентификации и клонирования специфических мРНК. Отличие нашего метода заключалось в одновременном синтезе нескольких олигонуклеотидов, комплементарных различным участкам предполагаемого гена, объединении их в единую двунитевую

структуру и ее клонировании в бактериальном векторе. Такой подход позволяет, опуская все этапы выделения и клонирования специфических мРНК, непосредственно выявлять интересующие геномные фрагменты ДНК благодаря тому, что используемую в качестве зонда рекомбинантную плазмиду можно метить радиоактивными изотопами до достаточно высокой специфической активности.

На основе знания генетического кода и частот встречаемости отдельных кодонов и динуклеотидов в геноме млекопитающих по эмиссионным последовательностям коротких пептидных фрагментов пептида DBI—фрагментов T7 и T5, обладающих выраженной анксиогенной активностью [2—4], были синтезированы 4 частично взаимно комплементарных олигонуклеотида. Смесь их была отождествлена, обработана ДНК-лигазой и полученная двунитевая структура клонирована по предусмотренным липким концам в бактериальной плазмиде pUC19.

Рекомбинантная плазмидная ДНК, полученная таким способом, была помечена ^{32}P методом нуклеотидного замещения до специфической активности около 10^9 имп/мин/мкг ДНК и использована в качестве зонда в процедуре блоттинг-гибридизации с рестриктивными фрагментами геномной ДНК человека. Полученные результаты свидетельствуют о наличии в геноме человека по крайней мере двух типов фрагментов ДНК, гомологичных использованной пробе. Первый из них был представлен EcoRI-фрагментами ДНК длиной около 5000 пар нуклеотидов и обнаруживался во всех исследованных геномных ДНК как уникальная последовательность. Другой тип—фрагменты длиной 2800 пар нуклеотидов—также обнаруживался почти во всех исследованных геномах, однако характеризовался выраженным полиморфизмом по числу копий, которое может различаться в геномах разных индивидов в десятки раз.

В ближайшее время основными задачами наших исследований будут непосредственное клонирование гена DBI, определение его первичной структуры и изучение механизмов амплификации. Представляется также важным определение, является ли полиморфная копия DBI-гена наследственным признаком и какую роль такой признак может играть в развитии депрессивных состояний у человека.

SEARCH FOR ENDOGENOUS LIGANDS OF BENZODIAZEPINE RECEPTORS: ISOLATION AND GENETIC STUDIES

BRUSOV O. V., YAKOVLEV A. G., PLOTNIKOV V. V., *BARAM G. I.,
*GRACHEV M. A., **KUMAREV V. P., KUDRYAKOVA T. B.,
**BOROVKOV A. A., **KOBZEV V. F.

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

**Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division of the USSR Acad. Sci. Novosibirsk;

**Institute of Cytology and Genetics, Siberian Division of the USSR Acad. Sci., Novosibirsk

With the aid of the developed purification scheme including high performance solid phase extraction and microcolumn chromatography a peptide inhibitor of the specific binding of ^3H -diazepam (peptide 2—2—

1) has been isolated in a homogenous state from bovine hypothalamus. The affinity of this peptide to benzodiazepine receptors and its concentration in hypophysis are high. An attempt to identify the human gene of DBI peptide is also made.

ЛИТЕРАТУРА

1. Speth R. S., Jonson R. W., Regan J., Reisine T., Kobayashi D. M., Bresoltn N., Roeske W. R., Yamamura H. I. *Federat. Proc.*, v. 39, p. 3332—3038, 1980
2. Costa E.—in: *Profile of a neuroscience research program at the National institute of Mental Health (1968 thru 1985)*, p. 253, Tipolitografia Campisi Uicenza, Italia, 1985.
3. Corda M. G., Ferrary M., Guidotti A., Konkel D., Costa E. *Neurosci. Lett.*, v. 47, p. 319—325, 1984.
4. Ferrero P., Santi M. R., Conti-Tronconi B., Costa E., Guidotti A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 83, p. 827—831, 1985.
5. Барам Г. И., Грачев М. А., Назимов Н. В., Плетнев А. Р., Прессман Е. К., Рубин О. Г., Сальчиков Я. А., Семашко Н. В., Чумаков М. П., Шемякин В. В., Ямщиков В. Ф. *Биооргани. химия*, т. 11, № 12, с. 1677—1680, 1985.
6. Baram G. I., Grachev M. A., Komarova W. I., Perelroyzen M. P., Bolvanov Yu. A., Kuzmin S. U., Kargaltsev U. U., Kuper E. A. *J. Chromatogr.*, v. 264, p. 69—90, 1983.
7. Mohler H., Okada T. *Science*, v. 198, p. 849—853, 1977.

Поступила 9. IX 1986

УДК 612.822.1:577.175.823:615.212.7:547.95

НЕЙРОХИМИЧЕСКИЕ И НЕЙРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПЕРЕСТРОЙКИ В СТРУКТУРАХ МОЗГА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ НЕКОТОРЫХ НЕЙРОПЕПТИДОВ

ГЕРШТЕИН А. М.

Институт мозга ВНИИ психического здоровья АМН СССР, Москва

Комплексное нейрофизиологическое и цитобioхимическое исследование показало, что при однократном системном введении тетрапептида (Tyr-D-Ala-Gly-Phe-NH₂) или таффина (Thr-Lys-Pro-Arg) в период выраженного их действия на двигательную активность животных наблюдаются существенные изменения систем синтеза и деградации моноаминов, АХЭ, а также метаболизма белков и некоторых протеаз в структурах двигательной системы головного мозга исследованных млекопитающих. Эти изменения проявлялись как на корковом, так и на подкорковом уровнях, затрагивая в большей степени подкорковые структуры (хвостатое ядро).

Действие биоактивных нейропептидов на ЦНС осуществляется либо за счет их взаимодействия со специфическими рецепторами, либо за счет влияния на медиаторные системы головного мозга. При этом они проявляют по отношению к последним модулирующие эффекты [1]. В связи с этим в последние десятилетия заметно повышенный интерес к изучению

механизмов действия биоактивных эндогенных пептидов, их роли в организации и регуляции физиологических процессов, в частности в ЦНС [2]. Вместе с тем, пептиды представляют собой хорошую биологическую модель для исследования морфохимической организации структур мозга, входящих в ту или иную функциональную систему мозга (двигательная, зрительная, слуховая и т. д.), так как, несмотря на полифункциональность пептидов, для многих из них известна определенная направленность по отношению к конкретным функциям мозга.

В лаборатории цитохимии Института мозга на протяжении ряда лет совместно с лабораторией морфофизиологии условного рефлекса проводятся цитобихимические исследования по изучению влияния нейропептидов на превращения нейромедиаторов и белков в корково-подкорковых структурах мозга некоторых млекопитающих. В настоящем сообщении делается попытка обобщить полученные в лаборатории материалы для выявления корреляции между функциональным состоянием животного и морфохимическими изменениями в отдельных структурах мозга, возникающими при воздействии нейропептидов на организм.

Проведено сравнительное изучение действия 2-х тетрапептидов—тафцина и тетрапептидамида (ТПА)—для каждого из которых преобладающим является воздействие на двигательную активность. Синтетический аналог опиоидных пептидов ТПА по физиологическим критериям [4] характеризуется двухфазностью своего действия. В течение 30 мин после введения ТПА оказывает анальгетический эффект с развитием в последующие периоды (от 40 мин до 3 суток) двигательных нарушений, проявляющихся в снижении у животных двигательной активности. Тетрапептид тафцин также обладает двухфазным действием [5], однако в первые 15—30 мин после системного введения для него характерно возрастание двигательной активности, сопровождающееся целым рядом изменений со стороны поведения животного (агрессивность, отсутствие чувства страха и т. д.); это возбуждающее действие в последующие 4 ч сменяется на седативный эффект.

Была предпринята попытка проанализировать по использовавшимся нами показателям (метаболизм нейромедиаторов и белков) состояние структур сенсомоторной коры и хвостатого ядра в период изменения двигательной активности у животных, ее снижение при воздействии ТПА и ее активация при действии тафцина.

Материалы и методы

Одной группе кроликов породы шиншилла и крысы линии Wistar вводили подкожно ТПА (синтезированный в лаборатории синтеза белка ВКНЦ АМН СССР) из расчета 500 мкг/кг массы животного, другой группе животных—тафцин («Serva», ФРГ) из расчета 300 мкг/кг; пептиды растворяли в 1 мл физиологического раствора. После инъекции ТПА животных декапитуировали через 3 суток, так как по физиологическим данным в этот период отмечаются расстройства со стороны двигательных функций, а анальгетический эффект уже отсутствует. После инъекции тафцина животных декапитуировали через 15—30 мин—период наиболее ярко выраженного общего, в том числе и двигательного, возбуждения.

Были исследованы сенсомоторная область коры больших полушарий и хвостатое ядро мозга кроликов и крыс. В субфракциях синаптических мембран (В), синапсом (С и D) и митохондрий (Е), выделенных в градиенте плотности сахарозы (0,8—1,4 М), спектрофотометрически определяли активность АХЭ [6] и МАО типа А (субстрат серотонин) [7] и типа В (субстрат-п-нитрофениламин) [8]. Результаты определения выражали в процентах величины У. А. ферментов по отношению к контрольным данным, принятым за 100%. Количественными цитохимическими методами в нейронах определяли активность аминсалицилааминазы (АМПА) [9], АХЭ [10] и МАО [11] на люминесцентном микроскопе ЛЮМАМ в условных единицах оптической плотности при длине волны для АМПА—550, АХЭ—486, МАО—590 нм. Интерферометрически по сухой массе вещества нейронов определяли содержание и концентрацию структурированных белков с одновременным определением размеров нейронов [12]. Экспериментальные данные обработаны статистически по критерию Стьюдента.

Результаты исследования

Через 15—30 мин после введения тафцина у животных отмечали общее возбуждение, выражавшееся целым рядом физиологических проявлений (побежки, стойки, поведение в «открытом поле» и т. д.). При этом каких-либо изменений в уровне активности МАО и АХЭ при их послойном определении [13] как в коре, так и в хвостатом ядре не наблюдали (рис. 1). Вместе с тем дифференцированное выявление форм МАО А и В при определении их в субфракциях синапсом (С и D) и митохондриях (Е) [14] показало, что в сенсомоторной коре и хвостатом ядре активность МАО типа А была достоверно снижена на 25%, тогда как для МАО типа В характерным оказалось возрастание ее активности в коре и подкорке до 140—200%. Изменения активности АХЭ в этот период не было.

После введения ТПА [4] уже через 40 мин у животных выявлялись изменения в двигательной сфере: снижение двигательной активности, нарушение координации движений задних конечностей и т. д. Одновременно во всех исследованных корковых, подкорковых и стволовых структурах

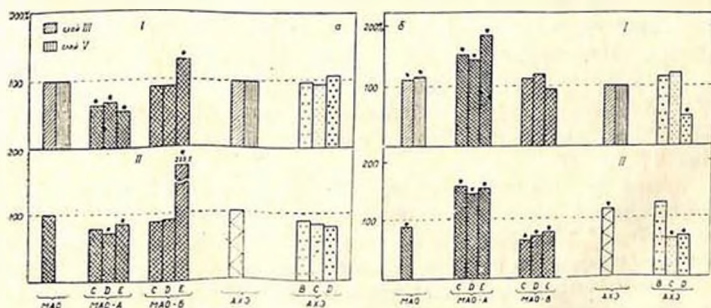


Рис. 1. Изменение активности МАО и АХЭ в субклеточных фракциях сенсомоторной коры (I) и хвостатого ядра (II) под действием тафцина в течение 15—30 мин (а) и ТПА в течение 3-х суток (б); III—в % к контролю

мозга имело место снижение амплитуды ЭЭГ. Процентное же соотношение частот, составляющих ЭЭГ, в каждой из структур не отличалось от такового до введения препарата. На второй день после введения препарата нарушения в двигательной сфере были менее выраженными, амплитуда ЭЭГ, особенно в неокортикальных образованиях, приближалась к исходной. На третий день симптомы двигательных расстройств опять становились более выраженными по сравнению с предшествующим днем. Во всех структурах мозга наблюдалось и большее снижение амплитуды ЭЭГ.

Таким образом, на основании физиологических критериев можно говорить, что изменения, вызываемые ТПА, носили ундулирующий характер.

В то же время под влиянием ТПА цитохимически было обнаружено возрастание уровня активности МАО в слое III сенсомоторной коры (на 11%) и ее достоверное снижение (на 11%) в структурах хвостатого ядра. Во всех субфракциях сенсомоторной коры и хвостатого ядра достоверно увеличивалась активность МАО типа А, в среднем на 60%, тогда как активность МАО типа Б была достоверно снижена в хвостатом ядре (на 28—56%). Уровень активности АХЭ при послойном определении достоверно возрастал только в хвостатом ядре (на 15%), был снижен в субфракции D сенсомоторной коры (на 50%) и в субфракциях С и D (на 35%) хвостатого ядра [15].

При интерферометрическом определении сухой массы вещества нейронов, которая на фиксированном материале отражает содержание в них структурированных белков [12], через 15—30 мин после введения тафцина было обнаружено возрастание содержания белка в цитоплазме нейронов слоя III сенсомоторной коры (на 40%) без изменения их размеров (рис. 2). В слое V также достоверно (на 35%) возрастало содержание белка в цитоплазме нейронов с одновременным увеличением и их размеров (на 31%). Достоверное возрастание содержания белка в цитоплазме (на 40%) имело место и в исследованных нейронах хвостатого ядра [16]. При этом было отмечено и достоверное (на 30%) возрастание количества SH-групп низкомолекулярных типов в тяжелых синапсоммах сенсомоторной коры [14].

Активность АМП достоверно возрастала в слоях III и V коры (на 26 и 30% соответственно) и была снижена в структурах хвостатого ядра (на 11%) [13].

Через 3 суток после введения ТПА в цитоплазме нейронов слоя V сенсомоторной коры наблюдали достоверное уменьшение содержания белка (на 15%); в нейронах же слоя III оно оставалось на уровне контроля. Одновременно размеры нейронов достоверно уменьшались (на 20 и 17% соответственно). В хвостатом ядре содержание белка в цитоплазме нейронов достоверно возрастало (на 30%). При этом в нейронах слоев III и V, а также в нейронах хвостатого ядра возрастало и включение ³H-лейцина в белки соответственно на 12, 28 и 14% [17]. Активность АМП во всех исследованных структурах возрастала; в слое III—на 57%, в слое V—на 29% и в хвостатом ядре—на 21% [18].

Сопоставление ответной реакции корково-подкорковых структур на воздействие исследованных пептидов показало, что как при введении ТПА, так и тафизина, наибольшие изменения, если судить по числу показателей по сравнению с корой, происходят в структурах хвостатого ядра, причем в большей мере это проявляется при введении ТПА. Для различных видов животных, в том числе и крыс, показано, что хвостатое ядро вовлекается в организацию двигательных программ. Полученные

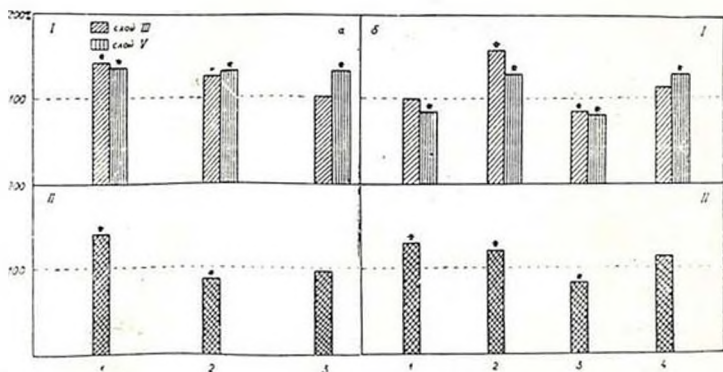


Рис. 2. Содержание белка и активность аминопептидазы в структурах мозга через 15—30 мин после введения тафизина (а) и через 3-е суток после введения ТПА (б). I—сенсомоторная кора, II—хвостатое ядро

материалы согласуются с известными из литературы физиологическими данными, указывающими на участие хвостатого ядра в процессах памяти, восприятия, внимания, эмоций и мотиваций [19, 20].

Следует также отметить, что изменения в метаболизме белков были выражены в значительно большей степени, чем со стороны медиаторных систем. Это находит свое объяснение в полученных нами ранее данных при работе с другими экспериментальными моделями, особенно при зрительной депривации [21], и известных из литературы данных о том, что адекватным показателем изменения функционального состояния ЦНС являются сдвиги в метаболизме белков [22].

NEUROCHEMICAL AND NEUROPHYSIOLOGICAL SHIFTS IN BRAIN STRUCTURES UNDER THE EFFECT OF SOME NEUROPEPTIDES

GERSTEIN L. M.

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

The period of effect on motor activity that follows systemic administration of Tyr-D-Ala-Gly-Phe-NH₂ and tuftsin (Thr-Lys-Pro-Arg) is accompanied by significant changes in the systems of biosynthesis

and degradation of monoamines, acetylcholinesterase and proteinase activity and metabolism of proteins in motor structures of mammalian brain. These changes have been detected in cortical and subcortical regions, affecting most of all subcortical structures, namely n. caudatus.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Вальдман А. В. *Вопр. мед. химии*, т. 30, № 3, с. 56—63, 1984.
2. Ашмарин И. П. *Вопр. мед. химии*, т. 30, № 3, с. 2—7, 1984.
3. Келешева Л. Ф., Толпыго С. М. *Журн. высш. нерв. деят-сти*, т. 34, № 1, с. 169—171, 1984.
4. Попова Н. С., Доведова Е. А. *Журн. высш. нерв. деят-сти*, т. 34, № 3, с. 926—931, 1984.
5. Вальдман А. В., Козловская М. М., Ашмарин И. П., Минаева М. Ф., Анохин К. В. *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, т. 92, № 7, с. 31—33, 1981.
6. Hestrin S. J. *Biol. Chem.*, v. 180, p. 249—261, 1949.
7. Popov V., Roseler C., Thiemann H., Matthies H. *Acta biol. et med. ger.*, v. 26, p. 239—245, 1971.
8. Горкин В. Э., Верёвкина И. В., Гринская Л. И., Жердса Л. В., Кляшторин Л. Б., Кривиченкова Р. С., Комиссарова Н. В., Леонтьева Г. А., Романова Л. А., Сесерина И. С., Фейгина С. М.—В кн.: *Современные методы в биохимии*, с. 155—161, М., Медицина, 1967.
9. Герштейн Л. М. *Цитология*, т. 7, № 6, с. 769—773, 1965.
10. Karnovsky M. J., Roots L. J. *Histochem. Cytochem.*, v. 12, p. 219—221, 1964.
11. Glenner G. G., Burthor H. W. J. *Histochem. Cytochem.*, v. 5, p. 591—600, 1957.
12. Бродский В. Я. *Трофика клетки*, М., Наука, 1966.
13. Сергутина А. В. *Тезисы докл. IV Всесоюз. конф. «Физиология и биохимия медиаторных процессов»*, с. 295, М., 1985.
14. Доведова Е. А., Качалова Л. М., Орлова Е. Н. *Журн. невропатол. и психиатрии*, т. 86, № 7, с. 1025—1028, 1986.
15. Герштейн Л. М., Доведова Е. А., Узбеков М. Г., Голикова Т. А., Сергутина А. В., Ашмарин И. П. *Нейрохимия*, т. 3, № 3, с. 236—243, 1984.
16. Герштейн Л. М., Чеботарева Т. А. *Нейрохимия*, т. 5, № 2, с. 180—184, 1986.
17. Худосерков Р. М. *Нейрохимия*, т. 5, № 1, с. 53—56, 1986.
18. Герштейн Л. М., Сергутина А. В., Худосерков Р. М. *Цитология*, т. 27, № 9, с. 1059—1063, 1985.
19. Мухин Е. И. *Журн. высш. нерв. деят-сти*, т. 33, № 1, с. 46—53, 1983.
20. Schneider J. S. *Biological Psychiatry*, v. 19, № 12, p. 1693—1710, 1984.
21. Пизарова Э. Д., Буснюх М. М., Герштейн Л. М., Доведова Е. А., Узбеков М. Г.—В кн.: *Развивающийся мозг и среда*, с. 142—192, М., 1980.
22. Hyden H. *Neurochemistry*, Springfield, Ill № p. 331—375, 1962.

Поступила 10. IX 1986

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПЕПТИДА ДЕЛЬТА-СНА ПРИ СТРЕССОРНЫХ СОСТОЯНИЯХ ОРГАНИЗМА

ХВАТОВА Е. М., *ДОВЕДОВА Е. Л., **МИХАЛЕВА И. И.

Горьковский медицинский институт, *НИИ мозга ВНИЦ психического
здоровья АМН СССР

**Институт биорганической химии АН СССР, Москва

Исследовано влияние пептида дельта-сна (ПДС) в стрессорных состояниях организма на содержание серотонина и 5'-оксиндоуксусной кислоты (5'-ОИУК) мозга, и активность ферментов наружной мембраны митохондрий: МАО типа А, МАО типа Б и гексокиназы. Уровень серотонина во всех изученных состояниях не отличается от нормы, содержание 5'-ОИУК увеличено, особенно в хвостатом ядре и коре мозга кроликов. Установлена значительная активация МАО типа А в отдельных образованиях и в целом мозгу животных; напротив, активность МАО типа Б подавляется. Введение ПДС регулирует распределение МАО типа А между митохондриями и цитоплазмой, изменяющееся при стрессовом состоянии и полностью предупреждает стресс-протективную мобилизацию гексокиназы, восстанавливая до нормы способность фермента к адсорбции на митохондриальной мембране.

Показано, что нонапептид, получивший название пептида дельта-сна (ПДС), оказывает широкое влияние на различные типы функциональных реакций организма [1], в частности обладает антистрессорным влиянием [2, 3]. Однако до сих пор неизвестен специфический механизм действия ПДС и невелика информация о метаболическом ответе головного мозга на его введение.

В настоящем сообщении представлены данные о влиянии введения ПДС при стрессорных состояниях организма на активность в ткани мозга митохондриальной МАО типа А и Б, а также на активность фермента с переменной внутриклеточной локализацией—гексокиназы (ГК), на содержание серотонина и 5'-ОИУК в субклеточных фракциях гомогената мозга.

Материалы и методы

Эксперименты были проведены на кроликах и беспородных крысах-самцах. Стрессорное состояние с целью создания психомоторного возбуждения вызывали введением Л-ДОФА (диэтилэриоритина, 50—60 мг/кг) или пребыванием животных в барокамере (196 мм рт. ст., экспозиция 15 мин) с целью создания острой реакции в ответ на быстрое разрежение атмосферы. Через 60 мин после введения психомоторного агента кроликам субокупиально производили инъекцию ПДС в дозе 50 мг/кг и прослеживали его действие 30 мин. Крысам ПДС вводили внутрибрюшинно за 20 мин до помещения в барокамеру. Из сенсомоторной области коры больших полушарий и хвостатого ядра мозга кроликов и из больших полушарий мозга крыс методом дифференциального центрифугирования выделяли неочищенную митохондриальную и цитоплазматическую фракции [4]. При последующем высокоскоростном центрифугировании в ступенчатом градиенте плотности сахарозы митохондриальную фракцию разделяли на суммарные фракции синапсом и митохондрий [5].

Активность МАО типа А (субстрат серотонин) и МАО типа Б (субстрат *p*-нитро-фенилэтиламин) у кроликов определяли спектрофотометрически при 240 и 450 нм со-

ответственно, регистрируя образующиеся в присутствии семикарбазиды продукты окислительного дезаминирования используемых NH_2 -субстратов [6]. Активность МАО типа А у крыс определяли по методу Горкина и соавт. [7]; об активности фермента судили по освобождению аммиака после изотермической отгонки. Содержание серотонина и 5'-ОИУК в субфракциях синапсом определяли флуориметрическим методом [8]. Активность ГК определяли в очищенной фракции митохондрий мозга крыс энзиматическим методом и выражали в нмоль NADPH/мин/г ткани [9]. Способность ГК к сольбунизации с митохондриальной мембраной определяли при ступенчатой 3-кратной добавке 0,1 М KCl [10, 11]. Связывание ее с мембраной митохондрий изучали при добавлении в среду инкубации 10 мМ MgCl_2 [12].

Результаты и обсуждение

При введении ПДС интактным животным активность молекулярных форм МАО в мозгу кроликов и крыс изменялась разнонаправленно (рис. 1). Активность МАО типа А в митохондриях, выделенных из целого мозга крыс, так же, как в митохондриях сенсомоторной коры и хвостатого ядра мозга кроликов, возрастала, тогда как активность МАО типа Б, напротив, в них подавлялась. То же самое устойчиво проявлялось и в синапсомах.

Введение психостимулирующего агента (L-ДОФА) кроликам, при-

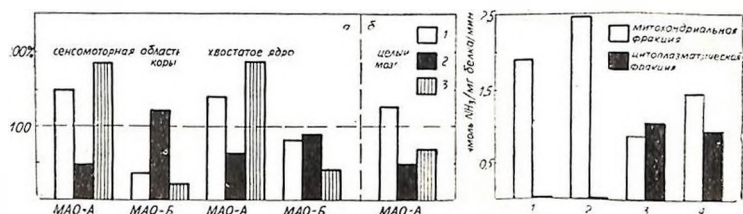


Рис. 1. Влияние ПДС на активность МАО митохондрий мозга кроликов (а) и крыс (б) в норме и стрессорном состоянии животных. 1—ПДС. 2—стрессорное состояние, 3—ПДС+стрессорное состояние. По оси ординат—активность МАО в %

Рис. 2. Активность МАО типа А в митохондриальной и цитоплазматической фракции мозга крыс в норме (1), при гипоксическом стрессе (2), введении ПДС (3) и сочетании действия гипоксического стресса и введения ПДС (4). По оси ординат—активность МАО типа А (нмоль NH_3 /мг белка/мин)

водившее их в состояние моторного возбуждения или пребывание крыс в разреженной атмосфере, сопровождались одинаковым изменением активности молекулярной системы МАО. Двукратное снижение активности МАО типа А найдено у крыс и кроликов как в митохондриях из целого мозга, так и в субклеточных фракциях отдельных структур мозга (рис. 1). В отличие от этого, активность МАО типа Б в субклеточных фракциях обеих структур существенно не отклонялась от нормы, за исключением

лишь активации МАО типа Б в синапсосах сенсомоторной коры кроликов.

В другой серии опытов было изучено влияние ПДС до и после воздействия стрессорного агента. Введение ПДС крысам до помещения их в барокамеру приводило к частичному снижению эффекта этого фактора на активность МАО типа А в митохондриях мозга крыс. Введение ПДС кроликам, получившим L-ДОФА, приводило к значительной активации (в 2 раза выше нормы) МАО типа А, что было в равной степени выражено в митохондриях своих исследованных образований мозга (рис. 1). Активность МАО типа Б в этом случае также значительно изменялась — ее уменьшение составляло от 3 до 7 раз в субфракциях ткани мозга и было особенно выражено в коре.

Изучение активности МАО типа А в митохондриальной и цитоплазматической фракциях мозга крыс показало (рис. 2), что в норме в цитоплазме активность МАО типа А достоверно не выявлялась. После введения ПДС происходило увеличение моноаминоксидазной активности, но лишь в митохондриальной фракции. При стрессорной же гипоксии были установлены существенные изменения. В этих условиях происходило снижение активности МАО типа А в митохондриях, и она появлялась в цитоплазме, причем ее величина в последней становилась практически равной с активностью в митохондриальной фракции. Предварительное введение ПДС животным до их помещения в барокамеру приводило к значительно меньшему падению активности МАО типа А в митохондриях и лишь небольшому повышению ее в цитоплазме. Однако в обеих субфракциях величина активности МАО типа А не достигала все же исходного уровня у интактных животных (рис. 2).

Уровень содержания серотонина в субфракциях клеток мозга во всех изученных состояниях практически не отличался от нормы. Установлено лишь нарастание количества его метаболита (5'-ОИУК), наиболее выраженное в синапсосах хвостатого ядра мозга кроликов при введении ПДС.

Далее в тех же условиях была изучена активность ГК как ключевого фермента утилизации глюкозы в мозгу с характерной особенностью этого фермента — переменной внутриклеточной локализацией при экранировании в митохондриях их наружной мембраной. Как видно из таблицы, у интактных животных 90% общей клеточной активности ГК связано с митохондриями. При стрессорном состоянии организма доля митохондриальной ГК снижалась на 10%, введение же ПДС препятствовало этому эффекту стресса. Существенных изменений в гексокиназной активности цитоплазмы не было установлено.

Способность ГК к солиubilизации заметно меняется под действием 0,1 М KCl. Так, при 3-кратном повторении добавки 0,1 М KCl к митохондриям интактных животных первая порция снимала 25% активности ГК, а последняя оставляла на митохондриальной мембране лишь 51% от исходной величины. При стрессорном воздействии 1-я солиubilизация снимала 41,5% активности ГК, а после 3-й оставалось всего

Таблица

Внутриклеточное распределение активности гексокиназы и способность фермента к
солюбилизации с митохондриальными мембран в норме, при гипоксическом стрессе
и введении пептида дельта-сна (ПДС)

Активность гексокиназы к мкмоль NADPH /мин·г ткани					
Норма		Гипоксический стресс		Сочетание стресса и ПДС	
клеточная	митохондриальная	клеточная	митохондриальная	клеточная	митохондриальная
Общая	исходная	общая	исходная	общая	исходная
12,60±0,24	10,20±0,19	14,90±0,11	12,03±0,20	12,68±0,14	11,67±0,18
Митохондриальная	1-е добавление KCl	митохондриальная	1-е добавление KCl	митохондриальная	1-е добавление KCl
11,2±0,2	7,6±0,4	12,03±0,14	7,03±0,20	11,67±0,18	10,0±0,19
Цитоплазматическая	2-е добавление KCl	цитоплазматическая	2-е добавление KCl	цитоплазматическая	2-е добавление KCl
0,58±0,01	6,50±0,38	0,78±0,02	6,3±0,2	0,69±0,01	8,90±0,13
	3-е добавление KCl		3-е добавление KCl		3-е добавление KCl
	5,2±0,2		5,50±0,18		6,5±0,1

46% активности ГК, связанной с митохондриями. Предварительное введение ПДС предупреждало нарушение мембранно-ферментных взаимоотношений и после 1-й солюбилизации потеря активности ГК митохондрий составляла лишь 14,5%, а после 3-й в них оставалось еще более 55% активности (таблица).

Полученные данные свидетельствуют, что солюбилизация ГК с митохондриальной мембраны наиболее эффективна при первой добавке 0,1 М КСI; лабильность связи этой части ГК в митохондриях подтверждается увеличением выхода ГК при этом почти в 2 раза в сравнении с нормой у животных, находившихся в стрессорном состоянии.

Изменение степени солюбилизации ГК в присутствии КСI отчетливо указывает на нарушение связи этого фермента с наружной мембраной митохондрий в условиях острого гипоксического стресса и предупреждения этого нарушения введением ПДС. В пользу этого свидетельствуют также результаты исследования способности ГК к адсорбции митохондриями при добавлении в среду инкубации $MgCl_2$. В норме митохондрии способны адсорбировать 40% ГК из инкубационной среды, при стрессорном состоянии только 14%, а после введения ПДС эта способность сохранилась почти на уровне нормы, оставляя 37,5%.

Проведенные исследования по изучению влияния ПДС на ферментативную активность в мозгу позволили установить, что он оказывает влияние на активность ферментов, ассоциированных с наружной мембраной митохондрий. Введение ПДС изменяло активность МАО в митохондриях мозга в зависимости от типа этого фермента: активность МАО типа А возрастала во всех изученных отделах мозга, в то время как активность МАО типа Б заметно снижалась в коре больших полушарий и несколько меньше — в хвостатом ядре. Еще большие различия были выявлены при введении ПДС в качестве антистрессорного средства. Так, ПДС в 2—4 раза увеличивал активность МАО типа А, сниженную в митохондриях мозга в условиях действия стресса, тогда как активность МАО типа Б в этом случае, напротив, еще больше подавлялась. В норме введение ПДС не изменяло внутриклеточное распределение моноаминоксидазной активности, практически сосредоточенной в митохондриальной фракции. При стрессорном же состоянии, наряду со снижением активности МАО в митохондриях, была установлена значительная ее активность в цитоплазме, а введение ПДС, хотя и не полностью, предохраняло от этих сдвигов.

Еще более наглядны изменения в активности ГК, характеризующейся переменной внутриклеточной локализацией. Введение ПДС при стрессорном состоянии полностью предотвращало выход ГК из митохондрий. Это было убедительно подтверждено и при изучении солюбилизации ГК под влиянием КСI. В этом случае введение ПДС не только полностью предупреждало вызываемое стрессом увеличение солюбилизации фермента, но даже проявлялось определенное удержание ГК митохондриями. Одновременно при введении ПДС способность митохондриальной мембра-

лы к адсорбции ГК сохранялась на уровне нормы, тогда как в отсутствие ПДС при стрессе она уменьшалась в 3 раза.

Таким образом, на двух моделях стрессорного состояния животных установлено влияние ПДС на активность и внутриклеточное распределение ферментов (МАО и ГК), ассоциированных с наружной мембраной митохондрий. В то же время с помощью радиоиммунного анализа выяснено, что ПДС-подсбный материал содержится внутриклеточно, главным образом, в митохондриях, и показано проникновение ПДС через ГЭБ [13]. Эти данные могут свидетельствовать о прямом влиянии экзогенного ПДС на митохондрии ткани головного мозга, а также о мембранном эффекте ПДС, наиболее отчетливо проявляющемся при стрессорном состоянии организма. Выявленные нами различия в конечном результате действия ПДС на молекулярные формы МАО логично связать с разной прочностью их связи с митохондриальной мембраной. По мнению Горошинской [14], МАО типа Б имеет более устойчивую связь с митохондриями, чем МАО типа А. Значительная активация МАО типа А при введении ПДС в стрессорном состоянии, наиболее выраженная в субфракциях коры больших полушарий мозга, позволяет думать, что ПДС может оказывать стресс-протективное и антиневротическое действие в условиях психомоторного стресса.

Было также показано, что ПДС, наряду с известными метаболитами [15], может участвовать во внутриклеточном перераспределении ГК как фактор регуляции ее активности.

METABOLIC EFFECTS OF DELTA SLEEP INDUCING PEPTIDE IN STRESS

KHVATOVA E. M., *DOVEDOVA E. L., **MIKHALEVA I. I.

Gorky Medical School, *Brain Research Institute, All-Union Research Center of Mental Health, USSR Acad. Med. Sci. Moscow; **M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, USSR Acad. Sci, Moscow.

In stress conditions the effect of delta sleep inducing peptide has been studied on the activity of brain MaO (both types) and hexokinase as well as on the content of serotonin and 5-hydroxyindolic acid in brain subcellular fractions. The serotonin level at all states studied does not differ from the control, the amount of 5-OIAA is increased, particularly in nucleus caudatus and brain cortex. The significant activation of MAO-A in some brain structures and in the whole brain is found; on the contrary the MAO-B activity is decreased. The DSIP infusion regulates the distribution of MAO-A between the mitochondria and cytoplasm, that changes in stress, and completely preserves stress-protective solubilization of hexokinase normalizing the ability of the enzyme to absorb on mitochondrial membranes.

1. Kastin A. Y., Olson S. A., Shally A. V., Coy D. H. Trends Neurosci., v. 3, p. 163—165, 1980.
2. Scherschlicht R., Marias J., Schneeberger J., Steiner M. — In: Sleep (eds. W. P. Koella, P. Levin), p. 147—155, Basel, S. Karger A. G., 1981.
3. Судаков К. В., Иванов В. П., Коплик Е. В., Михалова И. И. Физiol. журн., СССР, т. 18, с. 1—5, 1983.
4. Бизольд Д. — В кн.: Биохимия и функция нервной системы. Материалы международного симпозиума, с. 115—122, Л., Наука, 1965.
5. De Robertis E., Pellegrino de rald P. A. Rodrigues de Leres Arnais R., Salganicoff L. J. Neurochem., v. 9, p. 23—25, 1962.
6. Porov N., Rösler V., Thiemann C., Mathies H. Acta biol. et med. germ., B. 26, S 239—245, 1971.
7. Горкин В. Э., Веревкина А. В., Гринцева Л. И. — В кн.: Современные методы в биохимии, т. 2, с. 155—157, М., Медицина, 1968.
8. Kolan B. M., Нечасов Н. В. Лаб. дело, т. 5, с. 301—303, 1979.
9. Purich D., From H. et al. Adv. Enzymol., v. 39, p. 249—326, 1973.
10. Wilson J. E. J. Biol. Chem., v. 243, № 13, p. 3640—3647, 1968.
11. Алексахина Н. В., Ситнича Н. Ю., Щербатых Л. Н. Биохимия, т. 38, № 38, с. 915—921, 1975.
12. Erik D. S. et al. Biochim. et biophys. acta, v. 755, p. 112—118, 1983.
13. Graf M., Kastin A. Neurosci. a. Biobehav. reviews, v. 8, p. 83—93, 1984.
14. Горошинская И. А. Укр. биохим. журн., т. 57, № 2, с. 41—46, 1985.
15. Wilson J. E. Curr. topics in Cell Regul., v. 16, p. 2—54, 1980.

Поступила 9. IX 1986

УДК 612.766.2—08:612.822.1:[547.95:547.943]

РЕАКЦИЯ ОПИОИДНОЙ СИСТЕМЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА НА СТРЕСС И ЕЕ ЗАВИСИМОСТЬ ОТ СОСТОЯНИЯ КАТЕХОЛАМИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

ТИГРАНЯН Р. А.

Институт по стандартизации и контролю лекарственных средств МЗ СССР, Москва

В различных отделах головного мозга крыс (гипоталамус, средний и продолговатый мозг, гипофиз, стриатум) исследовали содержание β -эндорфина, Met-, Leu-энкефалина при воздействии однократной и многократно повторяемой иммобилизации. Показано, что ответная реакция опийных систем на иммобилизационный стресс особенно выражена в эмоциогенных структурах мозга (гипоталамус и средний мозг) и гипофизе. Содержание опиоидных пептидов менялось в зависимости от длительности иммобилизации; наиболее выраженные изменения отмечались на 150-й мин. После ежедневной в течение 40 дней иммобилизации наблюдалось развитие адаптации к этому хроническому стрессорному воздействию. Внутривентрикулярное введение α -оксидофамина (6-ОН-ДА) вызывало повышение концентрации опиоидов в большинстве структур мозга. Внутривентрикулярная инъекция 6-ОН-ДА не оказывала выраженного влияния на содержание опиоидных пептидов в исследованных тканях, но изменяла направленность ответа опийной системы при иммобилизационном стрессе.

Опиоидная система составляет одно из центральных звеньев механизма регуляции эндокринных, гемодинамических, болевых и поведенческих компонентов реакции организма на стрессорное воздействие [1—4]. Установлено, что в запуске и развитии стрессорной реакции важная роль принадлежит катехоламинергическим нейронам [5—6]. Иммунохимическими и электрофизиологическими методами показано тесное нейроанатомическое [7—9] и функциональное [8, 10] взаимодействие между опиоидной и катехоламинергической системами. Установлено, что опиоидные пептиды значительно изменяют метаболизм и секрецию катехоламинов в ткани головного мозга [11]. Тем не менее вопрос о том, каким образом осуществляется взаимодействие катехоламинергической и опиоидной систем при стрессе и какое влияние при этом оказывает возбуждение катехоламинергических нейронов на опиоидные нейроны, изучен недостаточно.

В связи с этим нами были исследованы изменения содержания опиоидных пептидов в различных отделах головного мозга крыс при иммобилизационном стрессе и роль катехоламинергических систем в наблюдаемых изменениях.

Материалы и методы

Исследования проводили на крысах-самцах линии Wistar массой 250—300 г. Иммобилизацию (ИММ) создавали по усовершенствованному методу Selye [12] путем фиксации животных на специальных раздвижных металлических столиках: эта модель сочетает эмоциональный (реакция освобождения) и физический стресс (мышечная работа) [13]. Осуществляли однократную ИММ продолжительностью 5, 30 или 150 мин и повторяемую ИММ в течение 7 или 40 дней по 150 мин ежедневно. Содержание опиоидных пептидов при стрессе исследовали в условиях функционального нарушения катехоламинергических систем путем введения 6-оксидофамина (6-ОН-ДА), который вызывает обратимую дегенерацию адренергических, а в мозгу — дофаминергических нейронов [14]. Периферическую десимпатизацию осуществляли внутрибрюшинным введением 6-ОН-ДА в дозе 200 мг/кг в изотоническом растворе NaCl с 0,2%-ной аскорбиновой кислотой; на 4-й день после введения препарата (или изотонического раствора NaCl с 0,2%-ной аскорбиновой кислотой) крыс подвергали 150-минутной ИММ. Повреждения центральных катехоламинергических систем достигали введением под стеротаксическим контролем в III желудочек мозга 6-ОН-ДА в дозе 150 мкг в изотоническом растворе NaCl с 0,1%-ной аскорбиновой кислотой; 150-минутную ИММ проводили на 6-й день после введения препарата. Учитывая зависимость ответа опиатных систем на стресс от времени суток [15], крыс деканитировали в одно и то же время — в интервале 9—12 ч утра.

Определяли содержание Met-энкефалина (Met-Э), Leu-энкефалина (Leu-Э) и β -эндорфина (β -Э) в гипоталамусе, гипофизе, среднем и продолговатом мозгу, Met-Э и Leu-Э в стриатуме; исследуемые отделы мозга выделяли на холоду по специальной схеме [16]. Концентрацию опиоидных пептидов определяли методом радиоиммунного анализа с помощью коммерческих наборов фирмы „Immuno Nuclear Corporation“ и „Seragen“ (США). Подготовка тканей для анализа описана ранее [17]. Статистическую достоверность данных оценивали по t-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Контрольные значения, установленные у интактных животных, составляли (в пмоль/мг сырого веса): стриатум— $1,012 \pm 0,151$ (Met-Э), $0,453 \pm 0,45$ (Leu-Э); гипоталамус— $0,750 \pm 0,048$ (Met-Э), $0,342 \pm 0,036$ (Leu-Э), $0,163 \pm 0,022$ (β-Э); средний мозг— $0,233 \pm 0,021$ (Met-Э), $0,088 \pm 0,009$ (Leu-Э), $0,014 \pm 0,001$ (β-Э); продолговатый мозг— $0,330 \pm 0,023$ (Met-Э), $0,101 \pm 0,011$ (Leu-Э), $0,018 \pm 0,003$ (β-Э); гипофиз— $0,696 \pm 0,057$ (Met-Э), $0,365 \pm 0,049$ (Leu-Э), $8,95 \pm 1,06$ (β-Э).

Показано, что 5-минутная ИММ вызывала у крыс выраженное повышение концентрации Leu-Э и β-Э в среднем мозгу и гипофизе, Leu-Э в стриатуме (рис. 1, а). Изменений концентрации Met-Э не было отмечено, что указывает на различия в характере реагирования Leu- и Met-энкефалинергических систем на кратковременный стресс. 30-минутная ИММ сопровождалась общей тенденцией к снижению уровня содержания опионидных пептидов в большинстве исследованных структур головного мозга, особенно выраженному в гипоталамусе (рис. 1, б). Более длительная 150-минутная ИММ приводила к значительному повышению содержания пептидов в гипоталамусе и энкефалинов в гипофизе, причем количество Met-Э и Leu-Э в гипоталамусе в 9,8 и 2,7 раза, в Leu-Э в гипофизе—в 3,7 раза превышало контрольные величины. Концентрация β-Э в гипофизе снижалась по сравнению с контролем в 2,6 раза (рис. 1, в). Таким образом, содержание опионидных пептидов зависело от длительности ИММ, то есть от интенсивности стрессорного воздействия.

Повторяемая ежедневно в течение 7 дней ИММ приводила к повышению содержания Leu-Э в стриатуме и среднем мозгу (рис. 1, г). Следует отметить, что в этой серии опытов изменения содержания опиоидов в гипоталамусе и гипофизе, наблюдавшиеся после однократной ИММ, нивелировались, что указывает на развитие адаптационных процессов в этих отделах мозга.

Животные, которых подвергали ИММ ежедневно в течение 39 дней, на 40-й день были разделены на 2 группы: 1) без ИММ в день забоя (адаптированный контроль) и 2) после 150-минутной ИММ. У крыс адаптированного контроля отмечалось снижение содержания Leu-Э и β-Э в гипоталамусе и продолговатом мозгу. Leu-Э в гипофизе и Met-Э в продолговатом мозгу (рис. 2, а). После 40-й ИММ концентрация опионидных пептидов не отличалась от показателей интактных животных, а уровень Met-Э в гипофизе даже значительно (в 2,5 раза) превышал контрольные значения; при этом наблюдалось повышение (по сравнению с адаптированным контролем) содержания Met-Э и Leu-Э в гипофизе и Met-Э в продолговатом мозгу (рис. 2, б).

В последующей серии опытов была изучена реакция опиатной системы на воздействие ИММ при изменении функционального состояния катехоламинергической системы мозга и периферической адренергической иннервации.

В опытах с периферическим введением 6-ОН-ДА у животных, кото-

рым предварительно вводили изотонический раствор, ИММ приводила к выраженному повышению концентрации опиоидных пептидов в гипоталамусе и Leu-Э в гипофизе, а также к понижению содержания β -Э в гипофизе (рис. 3, А, а); эти данные соответствуют полученным нами результатам при 150-минутной ИММ (рис. 1, в). Симпатэктомированные животные (то есть животные, получившие 6-ОН-ДА) проявляли выраженную агрессивность по отношению друг к другу, при этом отмечалось по-

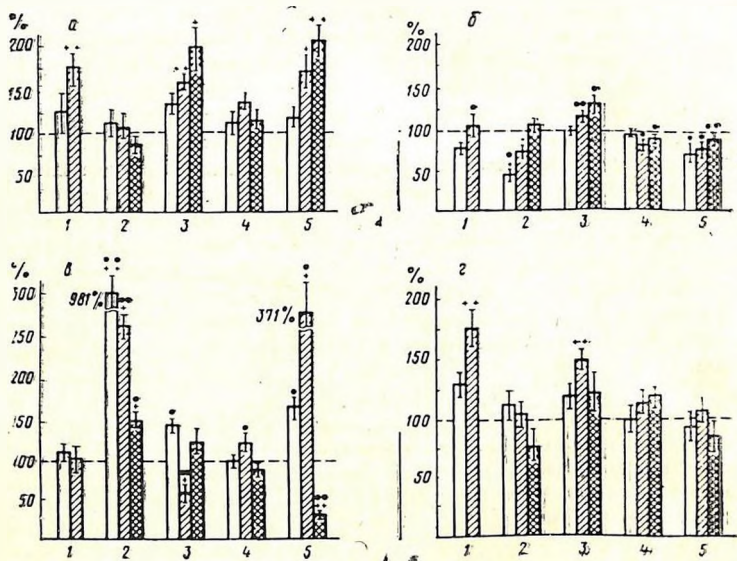


Рис. 1. Содержание опиоидных пептидов в головном мозгу крыс при 5- (а), 30- (б), 150- (в) и 7×150-минутной (г) иммобилизации. 1—стриатум, 2—гипоталамус, 3—средний мозг, 4—продолговатый мозг, 5—гипофиз; □—Met-энкефалин, ▨—Leu-энкефалин, ▩— β -эндорфин. ++—до-стоверные отличия по сравнению с контролем, ● —по сравнению с предидущим сроком обследования. По оси ординат—содержание опиоидных пептидов в % от контроля, принятого за 100%.

вышение концентрации Leu-Э в стриатуме, Met-Э в среднем мозгу, а также β -Э в гипоталамусе, среднем и продолговатом мозгу (рис. 3, А, б). После ИММ у десимпатизированных крыс уровень содержания опиоидов в среднем и продолговатом мозгу оставался повышенным, содержание энкефалинов в гипофизе и Met-Э в гипоталамусе возрастало, а концентрация Leu-Э в стриатуме и β -Э в гипоталамусе снижалась до контрольных величин (рис. 3, А, в). Таким образом, нарушение периферической адренергической иннервации приводило к изменениям содержания опиоидных пептидов в головном мозгу; при этом менялся также характер стрессорной

реакции. в частности наблюдали активацию опионидов ствсла мозга, не обнаруживаемую при ИММ у обычных животных.

При внутрижелудочковом введении 6-ОН-ДА ИММ у животных, которым предварительно вводили изотонический раствор, приводила к повышению содержания энкефалинов в гипоталамусе и Leu-Э в гипофизе (рис. 3, Б, а), то есть в отличие от данных предыдущей серии экспериментов (рис. 3, А, а) у них не обнаруживались изменения в эндорфинергиче-

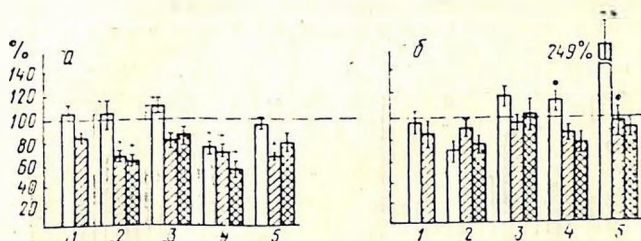


Рис. 2. Содержание опионидных пептидов (в % от контроля) при адаптированном контроле (а) и 40×150-минутной (б) иммобилизации. Обозначения те же, что и на рис. 1

ской системе гипоталамуса и гипофиза, что, по-видимому, является следствием хирургического (стереотаксического) вмешательства. Введение 6-ОН-ДА не сопровождалось изменениями содержания опионидных пептидов в исследованных структурах мозга, за исключением повышения концентрации Met-Э в гипоталамусе (рис. 3, Б, б). После ИММ у десимпатизированных животных было обнаружено снижение содержания β-Э в гипоталамусе, среднем и продолговатом мозгу, повышение содержания Leu-Э в стриатуме и особенно (в 2.9 раза) Met-Э в гипоталамусе (рис. 3, Б, в). Таким образом, при катехоламинергической депривации головного мозга изменения опионидов при стрессе имели иную, чем у обычных животных, направленность, особенно выраженную в каудальных отделах головного мозга.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что изменения содержания иммунореактивных опионидных пептидов при ИММ особенно выражены в эмоциогенных структурах головного мозга (гипоталамус и средний мозг) и в гипофизе и зависят от длительности воздействия. Наблюдаемые колебания количества опионидов свидетельствуют об определенных адаптационных перестройках в системах синтеза и утилизации этих пептидов, а также о внутринейрональном перераспределении опионидов по мере продолжения ИММ. Кратковременное повышение концентрации β-Э и Leu-Э в структурах мозга, содержащих окончания пептидергических нейронов, сменяется к 30-й мин ИММ снижением количества опионидов. Понижение концентрации опионидов в гипоталамусе согласуется с данными других авторов, применявших 30—60-минутные стрессорные воздействия [18—20]. Оно может быть вызвано усиленным высвобожде-

нием пептидов из секреторных гранул и/или оттоком их в другие отделы мозга. Резкое повышение содержания опиоидов в гипоталамусе на 150-й мин ИММ свидетельствует об активации синтезирующей функции опиатных нейронов при стрессе, длительность которого сравнима с временем процессинга β -Э из преформы проопиомеланокортина [21]. Следует отметить, что выявленная нами волнообразная динамика изменений содержания опиоидов в течение стрессорного воздействия может являться одной из причин расхождения данных литературы, так как разные авторы применяли стрессорные стимулы неодинаковой интенсивности и длительности.

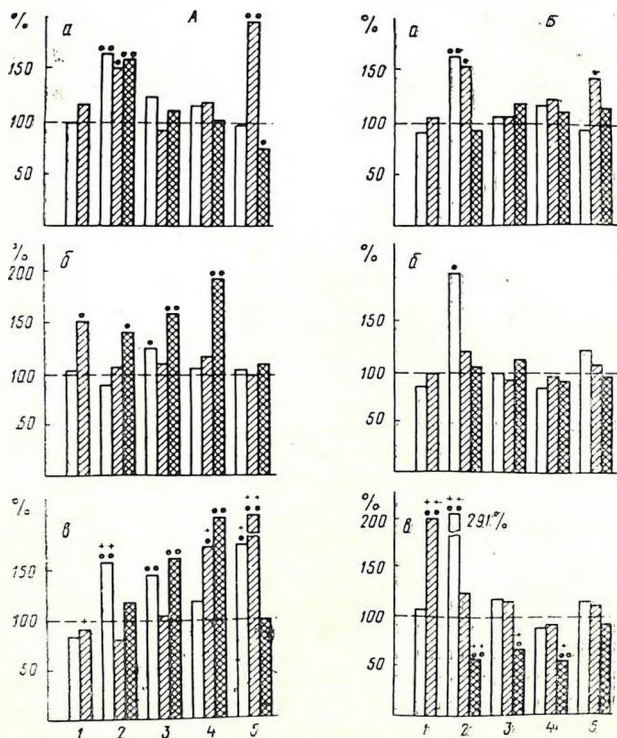


Рис. 3. Содержание опиоидных пептидов (в % от контроля) у иммобилизованных крыс при внутрибрюшинном (А) и желудочковом (Б) введении 6-оксидофамина (6-ОН-ДА); а—изотонический раствор+иммобилизация, б—6-ОН-ДА, в—6-ОН-ДА+иммобилизация. *—достоверные отличия по сравнению с контролем, ++—по сравнению с десимпатизированными животными. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1

Значительный интерес вызывает снижение содержания Leu-Э и $\beta\text{-Э}$ в отделах мозга хронически стрессированных крыс (рис. 2, а). Вследствие того, что активация энкефалиназ в нервной ткани при хронических болевых воздействиях маловероятна [22], можно предположить, что при длительно повторяемом стрессе уменьшается продукция опионидных пептидов. Данное предположение согласуется с результатами работы McGivern и соавт. [23], в которой на 21-й день электроболевого стресса концентрация энкефалинов в головном мозгу крыс была снижена на 40—50%.

Опионидная система относится к системам, обеспечивающим резистентность организма к стрессу [1—4]. Достаточно хорошо известна и роль катехоламинов в разворачивании стрессорной реакции и в патогенезе стресса [5, 6]. Опионидные пептиды замедляют метаболизм и выброс норадреналина [10] и уменьшают пресинаптическую норадренергическую активность [24]. По-видимому, выявленное нами на 150-й минуте ИММ усиление синтеза опионидов направлено на торможение чрезмерной активности катехоламинергических нейронов и нормализацию (в определенной степени) количества катехоламинов в мозгу при стрессе. Это предположение согласуется с гипотезой [10, 25] об ослаблении опиоидами эмоциональных проявлений стресса путем уменьшения индуцированного при стрессе метаболизма норадреналина в эмоциогенных отделах мозга. В свою очередь, снижение концентрации опионидов при многократно повторяемой ИММ (рис. 2), наряду с увеличением при этом синтеза катехоламинов [5], может быть причиной возникновения состояния нервного истощения при хронических стрессах.

Содержание опионидов в мозгу животных зависело от состояния симпатической нервной системы—блокада нейроэффекторной передачи (при периферическом введении 6-ОН-ДА) приводила к выраженным изменениям уровня содержания пептидов в мозгу, которые могли быть вызваны увеличением содержания адреналина в крови у десимпатизированных крыс при 150-минутной ИММ [13].

Результаты серии наших опытов с интравентрикулярной инфузией 6-ОН-ДА позволяют заключить, что в норме влияние катехоламинергических нейронов на опионидную систему мозга незначительно. Повышение же количества опионидов у крыс при стрессе наступает в ответ на возбуждение катехоламинергических нейронов и не имеет места при блокаде катехоламинергических терминалей.

Таким образом, результаты проведенных исследований дают основание полагать, что фактором, обуславливающим повышение концентрации опионидов в мозгу, является активация катехоламинергической системы мозга. Анализ собственных и литературных [5, 10, 25] данных позволяет предположить, что вызванные стрессом количественные изменения опионидов направлены на защиту катехоламинергических систем мозга от перенапряжения в экстремальных условиях. Снижение содержания опионидов при многократно повторяемой ИММ может быть важным фактором нарушения функциональной устойчивости нервной системы животных при длительно действующих стрессорах.

REACTION OF BRAIN OPIOID SYSTEM ON STRESS AND ITS DEPENDENCE FROM STATE OF CATECHOLAMINERGIC SYSTEM

TIGRANIAN R. A.

Institute for Standardization and Control of Drugs, USSR
Ministry of Health, Moscow

The content of β -endorphin met-and leu-enkephalin was measured in various brain parts (hypothalamus, midbrain, medulla oblongata, hypophysis, striatum) of rats exposed to single and repeated immobilization. The reaction of the opiate system to immobilization was very distinct in the emotiogenic brain structures (hypothalamus and midbrain) and hypophysis. The content of opioid peptides varied as a function of the immobilization time, with the most pronounced changes occurring at the 150th min. After daily immobilization repeated 40 times adaptation to the chronic stress stimulus developed. 6-Hydroxydopamine (6-HODA) i. p. resulted in increase in the opioid content in the majority of brain regions; 6-HODA i. v. did not affect essentially the level of opioid peptides in the tissues investigated, but changed the pattern of the opioid system reaction to immobilization stress.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Amir S., Brown Z. W., Amit Z. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, v. 4, p. 77-86, 1980.
2. Millan M. J., Enrich H. M. *Psychother. Psychosomat.*, v. 36, p. 43-56, 1981.
3. Amir S., Bernstein M. *Physiol. and Behav.*, v. 28, p. 575-579, 1982.
4. Lim A. T. W., Funder J. W. *Neuroendocrinology*, v. 36, p. 225-234, 1983.
5. Kvetnansky R., Mitro A., Palkovits M., Brownstein M., Torda T., Vigaš M., Mikulaj L. — In: *Catecholamines and stress* (eds. E. Usdin, R. Kvetnansky, I. Kopin), p. 39-50, Pergamon Press, Oxford, 1976.
6. Axelrod J. — In: *Stress: The role of catecholamines and other neurotransmitters* (eds. E. Usdin, R. Kvetnansky, J. Axelrod), v. 1, p. 3-13, Gordon and Breach Science Publishers, N. Y., 1984.
7. Watson S. J., Richard C. W., Ciaranello R. D., Barchas J. D. *Peptides*, v. 1, p. 23-30, 1980.
8. Palmer M. R., Seiger A., Hoffer B. J., Olson L. *Federat. Proc.*, v. 42, p. 2934-2938, 1983.
9. Charnay Y., Leger L., Drag F., Dubois P. M. *Ann. Endocrinol.*, v. 45, p. 201-206, 1984.
10. Tanaka T. M., Tsuda A., Ida Y., Ishigama I., Tsuginury Sh., Nagasaki N. *Jap. J. Pharmacol.*, v. 37, p. 117-119, 1985.
11. Van Loon G. R. — In: *Stress: The role of catecholamines and other neurotransmitters* (eds. E. Usdin, R. Kvetnansky, J. Axelrod), v. 2, p. 617-635, Gordon and Breach Science Publishers, N. Y., 1984.
12. Kvetnansky R., Mikulaj L. *Endocrinology*, v. 87, p. 738-743, 1970.
13. Kvetnansky R., Weise V. K., Thoa N., Kopin I. J. *J. Pharmacol. and. Exp. Ther.*, v. 209, p. 287-291, 1979.
14. Kostrzewa R. M., Jacobowitz D. M. *Pharmacol. Rev.*, v. 26, p. 200-288, 1974.
15. Wesche D. L., Frederickson R. *Life Sci.*, v. 24, p. 1861-1868, 1979.
16. Miller R. J., Chang K. J., Cooper B., Cuatrecasas P. *J. Biol. Chem.*, v. 253, p. 531-538, 1978.

17. Тигранян Р. А., Вахулина О. П., Панченко Л. Д. Космич. биология и авиакосмич. медицина, т. 18, № 4, с. 63—66, 1984.
18. Fratta W., Yung H.—Y. T., Hong J., Costa E. Nature, v. 268, p. 452—453, 1977.
19. Rossier J., Guillemin R., Bloom F. Eur. J. Pharmacol., v. 48, p. 465—466, 1978.
20. Akil H., Shiom H., Walner J. M., Watson S. G. — In: Adv. in Biochem. Pharmacol., v. 3, p. 61—67, 1982.
21. Chretien M., Seidah N. Mol. and Cell. Biochem., v. 34, p. 101—127, 1981.
22. Verdhoven P. V., Carton H. FEBS Lett., v. 138, p. 76—78, 1982.
23. McGivern R. F., Mousa S., Couri D., Berntson G. G. Life Sci., v. 33, p. 47—54, 1983.
24. Swann A. C., Elsworth J. D., Charney D. S. Eur. J. Pharmacol., v. 86, p. 167—175, 1983.
25. Kohno Y., Tanaka M., Hoaki Y., Ida Y., Nagasaki M. Eur. J. Pharmacol., v. 92, p. 265—268, 1983.

Поступила 10. IX 1986

УДК 547.965

РОЛЬ N-АЦЕТИЛ-L-АСПАРАГИНОВОЙ КИСЛОТЫ В МЕХАНИЗМЕ ДЕЙСТВИЯ НЕЙРОМЕДИАТОРНЫХ АМИНОКИСЛОТ

АГРИКЯН Г. В., КНАРЯН В. А., ШАГИНЯН В. А., АХВЕРДЯН Э. С.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Исследовано влияние N-ацетил-L-аспарагиновой кислоты (НААК) на высокоаффинный захват нейромедиаторных аминокислот (аспарагиновой, глутаминовой и ГАМК) обогащенными фракциями нейронов, глии и синапсом головного мозга крысы. Показано, что НААК заметно подавляла захват дикарбоновых аминокислот указанными фракциями, но не влияла на захват ГАМК. Ингибирование захвата аспарагиновой кислоты синаптической фракцией под действием НААК носила конкурентный характер. Полученные результаты свидетельствуют о том, что НААК является природным ингибитором захвата возбуждающих нейромедиаторных аминокислот.

N-ацетил-L-аспарагиновая кислота (НААК) была обнаружена в головном мозгу животных Tallan и соавт. в 1956 г. [1]. Количество этого нейроспецифического соединения в мозгу птиц и млекопитающих составляет 80—110 мг%, у рыб и черепах—11—16 мг%, в мозгу лягушек и в нервной ткани беспозвоночных содержание НААК незначительно [2]. Самое высокое содержание НААК было установлено в сером веществе головного мозга—124 мг%, а самое низкое—в корешках спинного мозга—48 мг% [2]. Количество НААК в сером веществе мозга в 2 раза больше, чем в белом; в спинномозговой жидкости не обнаружена.

При фракционировании мозговой ткани 59% глутаминовой кислоты (ГК), 47% аспарагиновой кислоты (АК) и 52% НААК обнаруживалось

в растворимой фракции и соответственно 23, 39 и 39%—в грубой митохондриальной фракции. Субфракционирование последней показало аналогичное с возбуждающими нейромедиаторами распределение NAAK с преимущественной локализацией в синаптосомах. Распределение ГК, АК и NAAK в процентах в очищенных митохондриях соответственно составляло 27, 7 и 23%, а в синаптосомах—50, 85 и 61% [3]. Преимущественное распределение NAAK в синаптосомах по сравнению с митохондриями указывает на ее непосредственное отношение к передаче нервного импульса.

Goldstein [4] выделил из головного мозга и частично очистил фермент аспартикоацетилазу, ацетилирующую исключительно АК. Примечательно, что задолго до открытия NAAK Birnbaum и соавт. [5] установили, что в почках ацилазой I подвергаются гидролизу ацетилапроизводные всех аминокислот, кроме NAAK, а ацилазой II из всех ацетилапроизводных аминокислот подвергается гидролизу только NAAK.

Роль NAAK в организме животных остается окончательно невыясненной. По мнению Tallan [2], она принимает определенное участие в сохранении ионного равновесия в НС как источник анионов. Хотя меченые предшественники (глюкоза, ацетат) слабо включаются в NAAK, тем не менее, в определенных экспериментальных условиях было показано значительное включение метки в молекулу NAAK [6]. Период полужизни NAAK составляет 12 ч [7]. По данным Оганесяна [8], NAAK является эффективным источником ацетата для синтеза ацетилхолина. Следует также отметить, что NAAK активирует глутаминазу I головного мозга [9].

При возбуждении, вызванном кофеином (2,5—7,5 мг/100 г живой массы), количество NAAK в мозгу белых мышей заметно снижалось [10]. Введение ганглиоблокатора—ганглерона (4 мг/100 г живой массы) вызывало аналогичный эффект. Отмечено также заметное снижение количества NAAK в мозгу белых мышей после возбужденного плавания [10] и у агрессивных мышей [11]. Возможно, при возбуждении ЦНС NAAK подвергается усиленному гидролизу, а образовавшиеся АК и ацетат, окисляясь, могут служить дополнительным источником энергии для деятельности мозга. В пользу этого заключения свидетельствуют данные о том, что при инкубации срезов коры больших полушарий головного мозга добавление NAAK приводило к заметному усилению поглощения O_2 этими срезами [12].

Имеются сведения о том, что гистамин, норадреналин, серотонин и дофамин уменьшают количество NAAK в срезах головного мозга. Учитывая, что гистамин, норадреналин и серотонин (но не дофамин) увеличивали содержание 3',5'-сАМР в срезах коры больших полушарий морских свинок [13, 14], Reichelt и соавт. [15] исследовали вероятную роль сАМР в снижении содержания NAAK. Ингибирование фосфодиэстеразы сАМР кофеином приводило к некоторому уменьшению количества NAAK. Активирующий аденилатциклазу NaF в препаратах мозга крыс с разрушенными клетками [16] не изменял концентрацию NAAK [15]. Хотя аденозин является наиболее эффективным стимулятором образования сАМР [17, 18], Reichelt и соавт. наблюдали лишь слабое увеличение со-

держания НААК под его действием. Эти авторы пришли к выводу, что действие нуклеотидов на НААК не прямое [15].

Недавно было показано, что наряду с АК и ГК НААК в условиях *in vitro* значительно повышала количество сАМР в коре больших полушарий [19]. Имеются сведения также о том, что НААК является антагонистом возбуждающих нейромедиаторов—АК и ГК [20]. Ингибирующий эффект НААК на связывание АК с постсинаптическими рецепторами [21] является дополнительным свидетельством синаптической активности НААК.

Материалы и методы

Объектом исследований служил головной мозг половозрелых белых крыс, содержащихся на обычном пищевом рационе вивария. Обогащенные фракции нейронов и глии получали по ранее описанному методу [22]. Синапсомы выделяли по Hajos [23]. Конечный осадок обогащенных фракций нейронов и глии и синапсомы суспендировали в 0,32 М сахарозе. Состав среды поглощения (конечные концентрации в ммоль): трис-НСl буфер, рН 7,4—25; NaCl—127,2; KCl—5; CaCl₂—2,7; MgSO₄—1,3; глюкоза—11,1.

Захват аминокислот изучали инкубированием проб в атмосфере воздуха при постоянном встряхивании и температуре 37° в течение 20 мин. Пробы содержали 0,9 мл среды поглощения, 0,1 мл соответствующей фракции, содержащей 100 мкг белка, меченые аминокислоты в конечной концентрации 10⁻⁵М, аминоксиуксусную кислоту (АОУК) в той же концентрации для подавления трансаминирования и 0,05 мКи/мл соответствующих меченых ¹⁴С-аминокислот; НААК добавляли в конечной концентрации 10⁻³М. Реакцию останавливали добавлением 1 мл холодной среды поглощения. Фракции осаждали центрифугированием при 4000 об/мин в течение 15 мин при 4°, надосадочную жидкость декантировали, осадок растворяли протозолом или диметилсульфоксидом. Радиоактивность измеряли, используя сцинтилляционную жидкость Брэя, на жидкостном сцинтилляционном счетчике «Intertechnique SL-4221» (Франция). Степень захвата аминокислот выражали величиной распад/мин/мг осадка, деленной на величину распад/мин/мкл среды. Белок определяли по методу Lowry и соавт. [24] в модификации Hess и Lewin [25].

В опытах использовали НААК, АК, ГК, ГАМК и АОУК „Sigma“, США (чистота НААК составляла 99,32%), радиоактивные ¹⁴С-АК (140 мКи ммоль) (ЧССР), ¹⁴С-ГК (200 мКи ммоль) (ЧССР), ¹⁴С-ГАМК (11,8 мКи ммоль) (Венгрия).

Результаты и обсуждение

В течение ряда лет в нашей лаборатории изучается роль НААК в передаче первого импульса в ЦНС животных. Первые работы были выполнены на обогащенных фракциях нейронов и глии головного мозга белых крыс. Полученные результаты показали, что НААК в концентрации 1 мМ ингибировала высокоаффинный захват ¹⁴С-АК фракцией нейронов (рис. 1, а) и фракцией глии (рис. 1, б) на 25,8 и 37% соответственно. Вызывает интерес то, что неприродное соединение N-ацетил-L-аспарагин в той же концентрации оказалось неэффективным, в то время как аспарагин проявил ингибирующее действие в обеих фракциях (на 27%). Изучение действия НААК на захват ¹⁴С-АК синапсомной фракцией (рис. 1, в) показало, что НААК в той же концентрации ингибировала

процесс захвата еще сильнее (на 46,8%). В указанных экспериментальных условиях NAAK ингибировала захват синапсоматами ^{14}C -ГК несколько интенсивнее, чем ^{14}C -АК (на 54%), но не оказывала заметного влияния на захват тормозного медиатора ГАМК. Таким образом, нами установлено, что NAAK является природным ингибитором захвата возбуждающих нейромедиаторных аминокислот—АК и ГК. Используемая величина концентрации NAAK является физиологической, так как расчеты по данным Reichell и соавт. [3] показали, что содержание NAAK в синапсоматной фракции составляет 1,3 мМ.

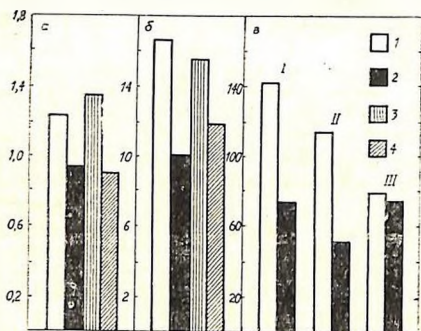


Рис. 1. Высокоаффинный захват ^{14}C -АК обогащенными фракциями нейронов (а) и глии (б) головного мозга белых крыс: контроль (1), под действием 1 мМ NAAK (2), N-ацетил-L-аспарагина (3) и аспарагина (4); захват ^{14}C -АК (I), ^{14}C -ГК (II) и ^{14}C -ГАМК (III) синапсоматной фракцией (в) под действием 1 мМ NAAK. По оси ординат—отношение захвата в распад/мин/мг осадка к величине распад/мин/мкл среды

В следующей серии экспериментов было установлено (рис. 2), что по мере увеличения концентрации NAAK в среде инкубации синапсомат ингибирующий эффект возрастал. При концентрации NAAK 5 мМ захват ^{14}C -АК оказался почти полностью ингибированным. Величины IC_{50} , полученные для захвата ^{14}C -АК и ^{14}C -ГК синапсоматной фракцией головного мозга белых крыс, имели близкие значения, равняясь соответственно 3,0 и 2,4 мМ. Кинетический анализ захвата ^{14}C -АК синапсоматной фракцией показал (рис. 3), что ингибирование захвата под действием NAAK носило конкурентный характер. Так, K_m захвата ^{14}C -АК в контроле составляла 10 мМ, а в присутствии NAAK—20 мМ. Максимальная скорость захвата при этом не менялась и была равной 11,1 нмоль/мг белка/5 мин. Таким образом, сродство ^{14}C -АК в присутствии NAAK снижалось вдвое.

Было проверено также влияние фторпроизводного NAAK—фторацетиласпарагиновой кислоты—FNAAK* на захват ^{14}C -АК и ^{14}C -ГК. FNAAK оказывала аналогичное с NAAK действие, но несколько превос-

ходившее эффект последней; FNAAK также не оказывала влияния на захват ^{14}C -ГАМК.

Таким образом, в настоящее время можно считать доказанным, что NAAK является регулятором содержания сАМР, ингибитором связы-

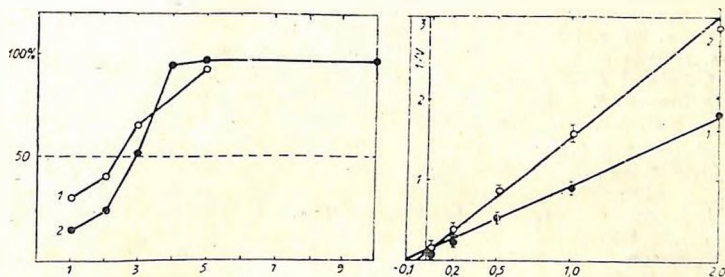


Рис. 2. Величины IC_{50} захвата ^{14}C -ГК (1) и ^{14}C -АК (2) синапсомной фракцией головного мозга белых крыс под действием NAAK в возрастающей концентрации; IC_{50} (1) = 2,4 мМ; IC_{50} (2) = 3 мМ. По оси абсцисс — концентрация NAAK, в мМ; по оси ординат — ингибирование захвата, в %.

Рис. 3. Кинетика захвата ^{14}C -АК синапсомной фракцией головного мозга белых крыс по Лайнуиверу-Берку в отсутствие (1) и в присутствии (2) NAAK (3 мМ). По оси абсцисс — величины $1/[AK]$, $(\text{мМ})^{-1}$; по оси ординат — количество ^{14}C -АК (нмоль/мг белка/5 мин) $^{-1}$. K_m (1) = 10 мМ; K_m (2) = 20 мМ; $V = 11,1$ нмоль/мг белка/5 мин

вания ^{14}C -АК с соответствующими постсинаптическими рецепторами [19, 21], а также природным ингибитором захвата возбуждающих нейромедиаторных аминокислот — АК и ГК.

ROLE OF N-ACETYL-L-ASPARTIC ACID IN THE MECHANISM OF ACTION OF NEUROTRANSMITTER AMINO ACIDS

APRIKIAN G. V., KNARIAN V. A., SHAHINIAN V. A., AKHVERDIAN E. S.

Institute of Biochemistry Arm. SSR Academy of Sciences, Yerevan

A new effect of N-acetyl-L-aspartic acid (NAA) is established: it depresses the high affinity uptake of Asp and Glu in enriched neuronal and glial fractions, and especially in synaptosomes. NAA does not affect the uptake of GABA. It was found that NAA inhibited competitively the uptake of Asp by synaptosomes. N-acetyl-L-asparagine does not affect the uptake of neurotransmitter amino acids.

* FNAAK синтезировал сотрудник нашего института Я. В. Возный

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Tallan H. H., Moore S., Stein W. H. J. Biol. Chem., v. 219, p. 257—264, 1956.
2. Tallan H. H. J. Biol. Chem., v. 224, p. 41—45, 1957.
3. Reichelt K. L., Fonnum F. J. Neurochem., v. 16, p. 1409—1416, 1969.
4. Goldstein F. B. J. Biol. Chem., v. 234, p. 2702—2706, 1959.
5. Birnbaum S. M., Levintov L., Kingsley R. B., Greenstein G. P. J. Biol. Chem., v. 194, p. 455—470, 1952.
6. Jacobson K. B. J. Gen. Physiol., v. 43, p. 323—333, 1959.
7. McIntosh J. C., Cooper J. R. J. Neurochem., v. 12, p. 825—835, 1965.
8. Оганесян В. С. Докл. АН АрмССР, т. 32, с. 37—41, 1961.
9. Оганесян В. С., Бунятыян Г. Х., Бадалян А. А., Микуртумова К. С. Вопр. биохимии мозга, т. 5, с. 5—16, Изд-во АН АрмССР, 1969.
10. Бунятыян Г. Х., Априкян Г. В. Вспр. биохимии мозга, т. 2, с. 5—15, Изд-во АН АрмССР, 1961.
11. Marcucci F., Mussini E., Valzelli L., Gerattini S. J. Neurochem., v. 15, p. 53—54, 1968.
12. Бунятыян Г. Х., Априкян Г. В., Паронян й. А. Вспр. биохимии мозга, т. 1, с. 139—144, Изд-во АН АрмССР, 1964.
13. Kakiuchi S., Rall T. W. Mol. Pharmacol., v. 4, p. 367—373, 1963.
14. Forn J., Krishna G. Fed. proc. Amer. Soc. Exp. Biol., v. 29, p. 480—482, 1970.
15. Reichelt K. L., Wedege E., Kvamme E. J. Neurochem., v. 18, p. 2129—2136, 1971.
16. Perkins J. P., Moore M. M. J. Biol. Chem., v. 245, p. 62—68, 1971.
17. Kakiuchi S., Rall T. W. Mol. Pharmacol., v. 4, p. 379—384, 1968.
18. Sattin A., Rall T. W. Mol. Pharmacol., v. 6, p. 13—17, 1970.
19. Burgal M., Jorda A., Grisolia S. J. Neurochem., v. 38, p. 1498—1500, 1982.
20. Curatolo A., Marchetti M., Brancati A., Solleo A. Arch. Sci. Biol., v. 51, p. 98—103, 1967.
21. Burgal M., Lizondo J., Jorda A., Grisolia S. Neurochem., Res., v. 9, p. 219—224, 1984.
22. Априкян Г. В., Хамбергер А. Вопр. биохимии мозга, т. 12, с. 168—176, Изд-во АН АрмССР, 1977.
23. Hajos F. Brain Res., v. 93, p. 485—489, 1975.
24. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., v. 193, с. 265—275, 1951.
25. Hess H. H., Lewin E. J. Neurochem., v. 12, p. 205—211, 1965.

Поступила 9. IX 1986

СПЕЦИФИЧЕСКИЕ БЕЛКИ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ ФИЛАМЕНТОВ В НОРМАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ ТКАНИ И В ОПУХОЛЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА

БЕРЕЗИН В. А., ШЕВЧЕНКО Г. М., *БУНЯТЯН Г. Г.

**ХАЛАНСКИЙ А. С., НЕДЗВЕЦКИЙ В. С.

Кафедра биофизики и биохимии Днепропетровского государственного университета;

*Институт биохимии АН АрмССР, Ереван;

**Институт морфологии человека АМН СССР, Москва

В нормальной нервной ткани и в опухолях головного мозга изучали образующий промежуточные филаменты глимальный фибриллярный кислый белок (ГФКБ). Установлено, что в ткани мозга присутствуют по крайней мере две системы деградации ГФКБ— Ca^{2+} -активируемый путь и лизосомная система. Выявление деградации растворимой формы ГФКБ лизосомным катепсином D, приводящей к исчезновению иммунореактивности, указывает на то, что расщепление ГФКБ происходит в средней, коровой части его молекулы, где сосредоточены антигенные детерминанты. Содержание ГФКБ в разных перивисаемых опухолях мозга крысы, ведущих свое происхождение от одного первично индуцированного новообразования, сильно варьировало по величине от пассажа к пассажу. ГФКБ-положительные клетки были обнаружены как в самих опухолях, так и в прилегающей к ним пенетрирующей реактивной астроглии. Растворимость и степень деградации ГФКБ не находились в прямой зависимости. В опухолях мозга человека астроцитарного генеза в отличие от перивисаемых экспериментальных глиом были выявлены сильно деградированные полипептиды ГФКБ в области 37 кД и ниже.

Для различных типов клеток нервной ткани характерен особый образом организованный цитоскелет, который представлен структурами различного диаметра — микротрубочками (25 нм), микрофиламентами (5—6 нм) и промежуточными филаментами (10 нм). Если первые две микроструктуры образованы белками, присутствующими в основном во всех типах клеток животных, то для белков, которые формируют промежуточные филаменты, характерна тканеспецифичность. Различные типы клеток нервной ткани нейрозпителяльного генеза экспрессируют три разных белка, формирующих промежуточные филаменты—триплет белков нейрофиламентов, глимальный фибриллярный кислый белок (ГФКБ) и виментин [1]. К собственно нейроспецифическим компонентам относятся белки нейрофиламентов и ГФКБ. Виментин свойствен главным образом клеткам мезенхимного происхождения. В ранний период эмбрионального развития, когда еще отсутствуют астроциты, глиобласты и эмбриональная радиальная глия экспрессируют виментин. Созревание глии характеризуется заменой экспрессии виментина на синтез специфического ГФКБ, характерного для зрелых астроцитов [2]. Большинство нейронов содержат нейрофиламентные белки с величиной M_r 70, 160 и 210 кД. В периферической НС отростки реактивных шванновских клеток содержат как виментин (основной компонент), так и ГФКБ.

Функции промежуточных филаментов не совсем понятны. Предпо-

лагается, что в нейронах они участвуют в медленном аксональном токе, но при этом требует объяснения факт отсутствия промежуточных филаментов в гранулярных клетках. Промежуточные филаменты отсутствуют также в олигодендроглии. На этом основании некоторые авторы высказывают сомнение относительно главной их функции—цитоскелетной и предполагают, что белки промежуточных филаментов вовлечены в регуляцию генной экспрессии [2].

Хотя метаболизм белков промежуточных филаментов в клетках нервной ткани недостаточно изучен, известно, что они подвергаются быстрой специфической деградации под действием кальпаинов— Ca^{2+} -активируемых протеиназ мозга [3]. Возможно, что протеолиз белков промежуточных филаментов *in vivo* связан с регуляцией их функции в клетке. Наиболее интенсивно *in situ* протекает протеолиз ГФКБ, причем деградации подвергается N-концевой домен [4]. Нами была установлена деградация как интактного филаментного (49 кД), так и растворимого (с деградированным в результате автолиза N-концевым доменом) ГФКБ (М, 37 кД) очищенной внутриклеточной лизосомной протеиназой—катепсином D [5]. Поскольку регистрацию деградации проводили иммуноэлектрофоретически и при действии фермента на растворимый ГФКБ наблюдали значительное уменьшение площадей иммуопреципитатов, то можно заключить, что катепсин D расщепляет растворимый ГФКБ в средней, коровой части, где сосредоточено большинство антигенных детерминант. Оптимум pH такой деградации равен 3,0. С другой стороны, деградация филаментного ГФКБ при pH 3—4 приводила к солюбилизации специфического белка—появлению растворимой при pH 8,0 формы, обладающей иммунореактивностью. Следовательно, катепсин D способен расщеплять связи в филаментном белке не только в коровой области. Можно предположить, что катаболизм промежуточных филаментов *in vivo* протекает с участием лизосомного пути.

В последние 5—6 лет белки промежуточных филаментов привлекают пристальное внимание онкологов, поскольку при малигнизации клеток различного генеза сохраняется специфичность синтезируемых в них белков. Цитокератин синтезируется карциномами, десмин—рабдомиосаркомами, виментин—немышечными саркомами, лимфомами, нейрофиламентные белки—ганглионейробластомами, ГФКБ—глиомами [6]. Выявление ГФКБ как глиального маркера в опухолях мозга человека нашло достаточно широкое применение в нейроонкологической практике при гистологическом типировании биопсийных образцов. Однако проведенное нами сравнительное исследование различных нейроспецифических маркеров (в том числе и ГФКБ) показало, что в злокачественных опухолях—глиобластомах, медуллобластомах—ГФКБ часто отсутствовал, в то время как другие белки (например, гликопротеин D2) являются более специфическими маркерами нейроэпителиальных опухолей [7, 8].

Типирование с помощью глиоспецифических маркеров нервных клеток лабораторных животных имеет большое значение при испытании противоопухолевых химиопрепаратов. Представленные на рис. 1 данные

свидетельствуют о том, что распределение ГФКБ между разными опухолями, ведущими свое происхождение от одного первично индуцированного новообразования, сильно варьировало по величине от пассажа к пассажи. Опухоли, принадлежавшие к одному пассажи, но выросшие у разных животных, часто содержали близкое количество ГФКБ, тогда как у группы штаммов злокачественных глиом имели место резко выраженные колебания концентрации ГФКБ между соседними пассажами. Проведенное нами гистохимическое (методом непрямой иммунофлуоресценции) изучение распределения ГФКБ в глиомах крысы пока-

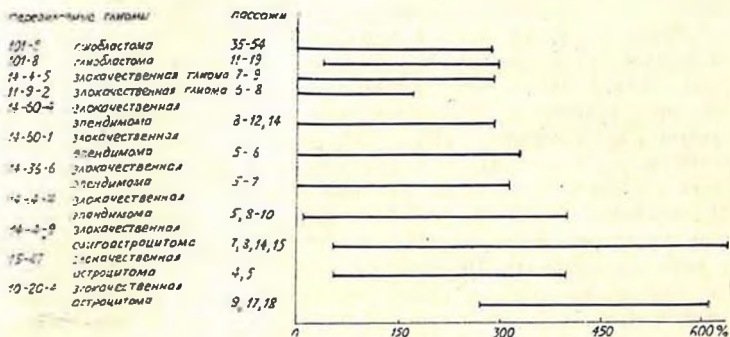


Рис. 1. Вариабельность содержания глиального фибриллярного кислого белка (ГФКБ) в отдельных перевиваемых глиомах крыс в зависимости от пассажа. По оси абсцисс—содержание ГФКБ в опухолях, выражено в % от концентрации этого белка в нормальной ткани мозга крысы

зало, что в большинстве своем ГФКБ-продуцирующие клетки находились на границе опухоли и здоровой ткани мозга. В более доброкачественных опухолях были видны россыпи отдельных клеток в паренхиме, значительное свечение вокруг сосудов. Основная трудность в решении вопроса о присутствии ГФКБ в перевиваемых глиомах заключается в невозможности в большинстве случаев точного различения нормальных реактивных и опухолевых астроцитов. Вероятнее всего, определяемый иммунохимическими методами в ткани опухоли ГФКБ можно отнести как к ГФКБ, экспрессируемому собственно клетками опухоли, так и к ГФКБ прилегающей и пенетрирующей реактивной астроглии (реактивный глиоз). Зоны с реактивным глиозом при иммунофлуоресцентной реакции светятся гораздо более интенсивно, чем клетки опухоли и даже нормальная ткань мозга. Возможно, это связано не только с различной концентрацией ГФКБ-положительных клеток, но и с особенностями организации ГФКБ-содержащих промежуточных филаментов в реактивных клетках астроглии и собственно глиомах.

В ряде работ было показано, что ГФКБ нормального мозга и его опухолей иммунологически идентичен [9]. На этом основании принято

считать, что изменения ГФКБ в опухолях касаются только нарушения его экспрессии. В то же время нами установлено, что отношения нерастворимой и растворимой в буфере с низкой ионной силой форм ГФКБ в мозгу и в его опухолях могут сильно отличаться. В опухолях эти величины крайне непостоянны. В некоторых астроцитах и анапластических астроцитах соотношение нерастворимой и растворимой форм может быть выше в 1000 и более раз, чем в белом веществе нормального взрослого мозга. В других случаях значительно превалировала растворимая форма. Для многих глиобластом характерным было практически полное отсутствие иммунологически определяемого ГФКБ [8].

Разделение филаментного и растворимого ГФКБ только на основе их различной растворимости в гипотоническом буфере при pH 8,0 не совсем точно отражает истинное отношение этих двух форм белка промежуточных филаментов. Нами было показано [10], что иммуноблоттинг препарата нерастворимого ГФКБ мозга человека выявляет серию полипептидов, среди которых есть деградированные формы филаментного белка в области 37 кД и выше и интактный, по-видимому, собственно филаментный ГФКБ с M_r 49 кД. Следовательно, растворимость и степень деградированности (определяемая по величине M_r) не находятся в прямой зависимости. Полипептиды в области 37—49 кД характерны как для растворимой, так и нерастворимой форм ГФКБ. Это связано, по-видимому, с тем, что автолиз ГФКБ протекает с участием нескольких протеолитических систем, различающихся по специфичности действия.

В связи с вышесказанным, интерес вызывают данные по изучению полипептидного состава ГФКБ в гистотипически различающихся опухолях мозга. На рис. 2 представлены результаты иммуноблоттинга экстрактов нормального головного мозга крысы, человека, быка, опухолей мозга человека и перевиваемых опухолей мозга крысы, содержащих растворимую и нерастворимую в буфере с низкой ионной силой формы ГФКБ. Обращает на себя внимание то, что экстракты мозга крысы и быка содержали значительно меньше деградированных полипептидов ГФКБ в области 37—49 кД по сравнению с экстрактом мозга человека и совсем не содержали полипептидов с M_r ниже 37 кД. Это связано, видимо, с тем, что пробы мозга человека подвергались автолизу в течение довольно значительного времени (6—8 ч).

Растворимые и нерастворимые препараты ГФКБ экспериментальных опухолей мозга крыс также представлены ограниченным числом полипептидов. В главном S_6 полипептид с M_r 49 кД при используемых концентрациях белка не выявляется.

Препараты нерастворимой в буфере с низкой ионной силой формы ГФКБ астроцитом и олигодендроастроцитом представлены серией полипептидов в области 37—49 кД, тогда как растворимая форма специфического белка, помимо главного полипептида с M_r 49 кД, содержала значительное количество сильно деградированных полипептидов с M_r ниже 37 кД. Нерастворимая форма ГФКБ глиобластомы содержала только



Рис. 2. Иммуноблоттинг ГФКВ проб опухолей мозга после разделения соответствующих экстрактов электрофорезом в ПААГ в присутствии ДДС-Na. 1—головной мозг быка (экстракция 2 М мочевиной); 2, 3—глиома С₆ (здесь и далее везде ГФКВ—соответственно нерастворимый и растворимый в буфере с низкой ионной силой); 4, 5—крысинная глиома № 223 в присутствии дексозона; 6, 7—крысинная глиома № 223; 8, 9—нормальный головной мозг крысы; 10, 11—нормальный головной мозг человека; 12, 20—астроцитома фибриллярно-протоплазматическая; 13, 21—астроцитома фибриллярно-протоплазматическая; 14, 22—олигодендроастроцитома; 15, 23—олигодендроастроцитома; 16, 24—астроцитома протоплазматическая; 17, 25—астроцитома протоплазматическая; 18, 26—астроцитома, близкая к глиобластому; 19, 27—нормальный головной мозг человека; длительность электрофореза белков в первом геле (пробы 1—11) больше, чем во втором (пробы 12—27)

главный полипептид (49 кД). Растворимый ГФКБ дополнительно также был представлен низкомолекулярными деградированными полипептидами. Наличие деградированных полипептидов ГФКБ в опухолях мозга человека нельзя объяснить активацией протеаз при приготовлении экстрактов в буфере с низкой ионной силой, поскольку аналогичные эффекты имели место и в случае использования одноразовой экстракции ГФКБ из ткани опухоли 2 М раствором мочевины, исключавшим активацию неспецифических протеаз [10].

Полученные результаты указывают на то, что в опухолевых клетках нарушен (изменен) процесс формирования нормальных промежуточных филаментов, вероятно, вследствие деградации интактной формы ГФКБ специфическими кальпаинами и лизосомным катепсином D. Однако возможно и альтернативное объяснение, на которое указывают данные иммунофлуоресцентного анализа экспериментальных опухолей мозга крыс. Наличие деградированных полипептидов ГФКБ отражает степень некротизации отдельных районов опухолей. В участках некроза *in vivo* могут быть активированы системы специфической и неспецифической деградации ГФКБ. На вероятность такого объяснения указывает то, что культура живых клеток глиомы C₅ содержала только по одному полипептиду ГФКБ в нерастворимой и растворимой в буфере с низкой ионной силой фракциях.

SPECIFIC PROTEIN OF INTERMEDIATE FILAMENTS IN NORMAL NERVOUS TISSUE AND IN BRAIN TUMOURS

BEREZIN V. A., SHEVCHENKO G. M., *BUNIAN G. H.,
**KHALANSKY A. S., NEDZVETSKI V. S.

State University, Dnepropetrovsk;

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

**Research Institute of Human Morphology, Academy of Medical
Sciences, Moscow

The results of investigation of specific for glial intermediate filaments glial fibrillary acidic protein (GFAP) are presented. There are at least two degradation systems for GFAP in brain tissue. Ca²⁺-activated and lysosomal. The degradation of soluble GFAP by lysosomal cathepsin D results in a disappearance of immunoreactivity pointing that breakdown takes place in the middle (core) part of GFAP containing antigenic determinants. GFAP content in transplanted rat gliomas is strongly variable among passages. GFAP-positive cells were found both in tumour tissue and glioma-brain boundaries, penetrating reactive astroglia (shown by immunofluorescence). The solubility is not linearly dependent from degree of GFAP degradation. Extensively degraded GFAP fragments-polipeptides with M_r 37 K and smaller are detected in astrocytic human brain tumours but not in transplanted rat gliomas.

ЛИТЕРАТУРА

1. Osborn M. J. Invest. Dermatol., v. 81, p. 104—109, 1983.
2. Dahl D., Bignami A. — In: Cell. and Muscle Motility, v. 6, 75—96, N. Y., London, 1985.
3. De Armond S. J., Fajardo M., Naughton S. A., Eng L. F. Brain Res., v. 262, p. 275—282, 1983.
4. Dahl D., Bignami A. — In: Handbook of Neurochemistry, v. 5, p. 127—151, N. Y., Plenum Press, 1983.
5. Шевченко Г. М., Буятыя Г. Г., Березин В. А. Нейрохимия, т. 3, с. 400—404, 1984.
6. Osborn M., Altmuunsberger M., Debus E., Weber K. J. Submicrosc. Cytol., v. 16, p. 149—150, 1984.
7. Березин В. А., Жмарева Е. Н., Бродская И. А., Шевченко Г. М., Зашки А. С., Понсидлок Н. В., Кулнцова А. В., Кулнцова Н. В., Кононова Л. И. Бюл. экперим. биол. и мед., т. 50, № 7, с. 68—70, 1985.
8. Березин В. А., Жмарева Е. Н., Рамоданов С. А., Шевченко Г. М., Бродская И. А. Вopr. экологии, т. 31, № 12, с. 7—17, 1985.
9. Dittmann L., Axelsen N., Norgaard-Pedersen B., Bock E. Brit. J. Cancer, v. 35, p. 135—141, 1977.
10. Недзвецкий В. С., Березин В. А., Оберняк Т. И., Жмарева Е. Н. Биохимия, т. 51, № 11, с. 1843—1850, 1986.

Поступила 9. IX 1986

УДК 577.112.5

СТРУКТУРА И ФУНКЦИЯ СПЕЦИФИЧЕСКОГО БЕЛКА СЕТЧАТКИ БЫКА—ИНГИБИТОРА 3', 5'-сGMP-ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ

ЛИПКИН В. М., МУРАДОВ Х. Г., *ДУМЛАЕР И. А., *ЭТИНГОФ Р. Н.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва;

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

Исследованы роль γ -субъединицы 3', 5'-сGMP-фосфодиэстеразы в первичных механизмах фоторецепции и специфичность γ -субъединицы для ткани сетчатки. Используя моноспецифические антитела к γ -субъединице, установили, что она присутствует только в фоторецепторных мембранах сетчатки разных животных и не обнаруживается в других тканях. Показана необходимость γ -субъединицы для фотониндуцированной активации фосфодиэстеразы. Определены аминокислотная последовательность γ -субъединицы и нуклеотидная последовательность соответствующей кДНК.

Поглощение квантов света родопсином, содержащимся в фоторецепторных мембранах сетчатки, обуславливает каскад реакций, обеспечивающих усиление сигнала и в результате изменение биоэлектрической активности фоторецепторной клетки. Одной из центральных реакций каскада является фотониндуцированная активация 3', 5'-сGMP-фосфодиэстеразы (ФДЭ), вследствие чего уменьшается содержание сGMP в фоторецепторе [1, 2]. Этому явлению ряд исследователей [3, 4] при-

даст решающее значение в процессе изменения ионной проницаемости наружной клеточной мембраны, обусловленного поглощением фотонов. В связи с центральной ролью ФДЭ в развитии фоторецепторного акта принципиальный интерес вызывает вопрос о природных регуляторах активности этого фермента.

Ранее нами [5, 6] во фракции термостабильных белков сетчатки быка был обнаружен белковый ингибитор ФДЭ, который понижал V и не влиял на K_m . Было также установлено [7], что белок, ингибирующий ФДЭ, содержится не только в сетчатке быка, но и в сетчатках всех изученных представителей позвоночных животных. В экспериментах по очистке ФДЭ и попытках отделения от нее ингибитора было выяснено, что последний тесно связан с ферментом и не отделяется от него при таких способах разделения белков, как ИЭФ в градиенте плотности сахарозы и в геле, при ИОХ и электрофорезе [5]. На основании этих фактов можно было предположить, что ингибитор является субъединицей фермента; в дальнейшем она получила название γ -субъединицы, поскольку сама ФДЭ состоит из двух субъединиц— α и β [8, 9]. При использовании методов гель-фильтрации на сефадексе ингибитор удалось полностью отделить от фермента, что сопровождалось резким увеличением его активности (рис. 1).

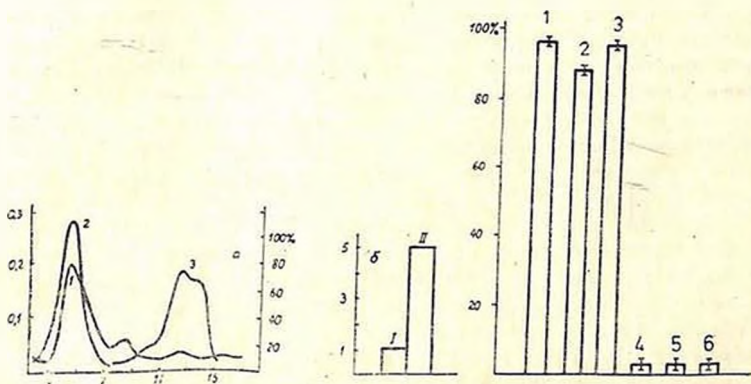


Рис. 1. Профиль элюции ФДЭ, экстрагированной из фоторецепторных мембран на колонке с сефадексом G-150. а: 1—выход белка, $\lambda = 280$ нм. 2—активность ФДЭ, $\lambda = 660$ нм; 3—степень ингибирования активности ФДЭ стандартного препарата фермента. б—общая активность ФДЭ до (I) и после (II) гель-фильтрации на сефадексе G-150. По оси ординат—активность фермента в усл. ед. По оси абсцисс— M_N фракций элюата; по осям ординат: слева—плотность, в усл. ед., справа—ингибирование, в %

Рис. 2. Влияние антител к белку-ингибитору на ФДЭ фоторецепторных мембран и других тканей: 1—сетчатка быка, 2—сетчатка крысы, 3—сетчатка лягушки, 4—мозг быка, 5—сердце быка, 6—матка крысы

В какой же мере ингибитор специфичен именно для ткани сетчатки, и не имеется ли подобный белок в других тканях? Для решения этого воп-

роса были использованы моноспецифические антитела, выработанные к ингибитору [10]. В результате блокады эндогенного ингибитора, связанного с ферментом, добавление в среду антител к нему приводило к активации ФДЭ [8]. Оказалось, что увеличение активности фермента имело место лишь в случае препаратов сетчаток и не происходило при использовании других тканей (рис. 2). Эти данные свидетельствуют в пользу специфичности ингибиторного белка для ткани сетчатки.

В какой же части фоторецепторной клетки сетчатки локализован ингибитор? Сопутствует ли он целиком ФДЭ, сосредоточенной в фоторецепторных мембранах, или же имеется и в других областях сетчатки? Эти вопросы изучали с помощью различных методических подходов. В одной из серий экспериментов сопоставляли содержание родопсина и ингибитора при субфракционировании фоторецепторных мембран, в других — исследовали наличие ингибитора в сетчатках, лишенных наружных сегментов механическим путем или же в сетчатках крыс, больных наследственной дистрофией сетчатки. У этих животных в процессе болезни наружные сегменты полностью разрушаются [9]. В результате этих опытов оказалось возможным однозначно заключить, что ингибитор сосредоточен непосредственно в фоторецепторных мембранах и может служить, подобно родопсину, маркером первичных акцепторов световых квантов.

Какова же функция ингибитора в этих структурах? Исследование этого вопроса нами [11] и другими авторами [12, 13] было проведено на реконструированных системах, состоявших из лишенных ФДЭ мембран наружных сегментов и препаратов фермента, очищенного разными способами — с отделением ингибитора и с сохранением его во фракции ФДЭ. Из данных, приведенных на рис. 3, очевидно, что фотониндуцированная актив-

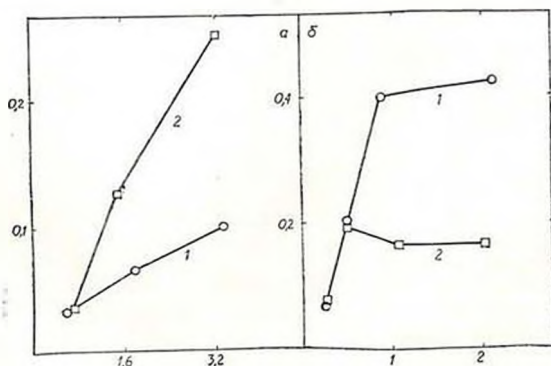


Рис. 3. Влияние GTP на ФДЭазную активность в реконструированных системах, а — реконструированная система, состоявшая из ФДЭ, связанной с ингибитором, и лишенных фермента фоторецепторных мембран; б — аналогичная система, содержащая ФДЭ, лишенную ингибитора. 1 — пробы без GTP, 2 — пробы с GTP. По оси абсцисс — содержание белка в мкг, по оси ординат — активность в усл. ед.

бация ФДЭ в присутствии ГТР, являющегося необходимым компонентом этого процесса, происходила только в случае использования ФДЭ, содержащей ингибитор (рис. 3. а). При использовании же лишенной ингибитора ФДЭ наблюдали, напротив, ингибирование фермента в присутствии ГТР (рис. 3. б). Эти данные свидетельствуют о необходимости ингибитора для активации ФДЭ при функциональной нагрузке. В предложенных другими авторами [14, 15] схемах активации ФДЭ при освещении ингибитору также отведена ключевая роль в этом процессе. Таким образом, в системе передачи сигнала от родопсина к ферменту взаимодействие ГТР-связывающих белков должно осуществляться не непосредственно с ферментом, а с его ингибитором. Механизм этого взаимодействия остается до настоящего момента неясным [16, 17].

Обсуждая функции ингибитора, следует отметить, что они, возможно, не ограничиваются влиянием его на каталитическую активность ФДЭ. Так, нами было установлено [18], что этот белок является мощным ингибитором метилирования ФДЭ—процесса, который также осуществляется в наружных сегментах [18, 19]. Функциональная значимость метилирования ФДЭ и взаимоотношения этого процесса с каталитической активностью данного фермента пока не изучены.

Что же представляет собой ингибитор по своей природе? Чтобы ответить на этот вопрос, мы определили аминокислотную последовательность ингибитора сGMP-фосфодиэстеразы— γ -субъединицы этого фермента. При этом, наряду с непосредственным исследованием структуры белка, была выделена соответствующая γ -субъединица кДНК и определена ее нуклеотидная последовательность.

Выделяли сGMP-фосфодиэстеразу по методике Baelg и соавт. [8]. γ -Субъединицу отделяли от α - и β -субъединиц высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) на колонке с обращенной фазой (носитель Synchropak C₄, градиент ацетонитрила в 0.1%-ной трифторуксусной кислоте). γ -Субъединица элюировалась при 45%-ной концентрации ацетонитрила, а α - и β -субъединицы при 56%-ной. Анализ N-концевых остатков субъединиц сGMP-ФДЭ показал, что их N-концевые аминокислотные группы блокированы. Для определения аминокислотной последовательности γ -субъединицы использовали гидролиз белка трипсином и протеазой из *St. aureus*, а также расщепление бромцианом (на белке, карбоксиметилированной [¹⁴C]-подуксусной кислотой).

Аминокислотная последовательность γ -субъединицы сGMP-фосфодиэстеразы приведена на рис. 4. В пептиде SP-1(1—9) N-концевая аминокислотная группа была блокирована, однако после расщепления его бромцианом удалось выяснить последовательность аминокислотных остатков с 2-го по 9-ый. Был снят масс-спектр пептида SP-1 и получен молекулярный ион $[M+H]^+$ с массовым числом 1112. Определение величины M_r пептида показало, что в нем N-концевой остаток метинина ацетилирован.

Для уточнения аминокислотной последовательности средней части молекулы γ -субъединицы после модификации ϵ -аминогрупп остатков лизина янтарным ангидридом гидролизвали трипсином по остаткам аргинина.

Из полученного гидролизата с помощью ВЭЖ на колонке TSK-2000 SW был выделен 51-членный С-концевой пептид (последовательность 37—38). Анализ этого пептида на секвенаторе позволил установить в γ -субъединице последовательность с 37-го по 60-й аминокислотный остаток и получить перекрытие между бромциановыми пептидами Вг-2 (18—57) и Вг-3 (58—87).

Для локализации в полипептидной цепи остатка триптофана, γ -субъединицу расщепляли BNPS-скатолом. Путем деградации по Эдману продуктов расщепления была определена последовательность 71—75 и выяс-

-54	6CGTGAGGGAGTCCAGAAGCTGAAGGTCACTGCGGGATCTCTGCCAACCTG6CC	-1
ATG AAC CTG GAG CCA CCC AAG GCC GAG ATC CGG TCG GCC ACC AGG	1-45	
ACMET-ASN-LEU-GLU-PRO-PRO-LYS-ALA-GLU-ILE-ARG-SER-ALA-THR-ARG-	1-15	
GTG ATG GGG GGA CCC GTC ACT CCC AGG AAA GGG CCC CCG AAA TTT	46-90	
VAL-MET-GLY-GLY-PRO-VAL-THR-PRO-ARG-LYS-GLY-PRO-PRO-LYS-PHE-	16-30	
AAG CAG CGG CAA ACC AGG CAG TTC AAG AGC AAG CCC CCC AAG AAA	91-135	
LYS-GLN-ARG-GLN-THR-ARG-GLN-PHE-LYS-SER-LYS-PRO-PRO-LYS-LYS-	31-45	
GGT GTC CAA GGG TTT GGT GAT GAC ATC CCT GGA ATG GAA GGC CTG	136-180	
GLY-VAL-GLN-GLY-PHE-GLY-ASP-ASP-ILE-PRO-GLY-MET-GLY-GLY-LEU-	46-60	
GGA ACA GAC ATC ACC GTC ATC TGC CCG TGG GAG GCC TTC AAC CAC	181-225	
GLY-THR-ASP-ILE-THR-VAL-ILE-CYS-PRO-TRP-GLU-ALA-PHE-ASN-HIS-	61-75	
CTG GAG CTG CAC GAG CTG GCC CAG TAC GGC ATC ATC TAG]CCCTGGA	226-271	
LEU-GLU-LEU-HIS-GLU-LEU-ALA-GLN-TYR-GLY-ILE-ILE-TER	76-87	
CCCCCGCCCTCAGCCCTCTACTCCGCTGCCACCCCTGACCCCTGCTCAAGATTCCTG	272-330	
TGAGGAGAGCIGTGCCCCGGGAGGTCCAGAGTGCTCGGATIGTGCTGGAGACCCAC	331-389	
AGGGCGGCAGCCTGGAGCCTCTGAATGCTAGTTACCAGGAGCCACCAGTTCCTTCA	390-448	
GGACACCCCTCTCGGGGCAGCCAGGCTCTGCTTAACCTCCAGAAACACTGGTCCACAGAC	449-507	
CCTCTCTCTCCCGAGGCTGGAAAGC]AGGGCAGGCTCCAGTGGTGCTGCCACACCCC	508-566	
GGCTCTCTGGGCTGACTGTCTGGGGTGAGAACGGGCTCCCTCTACTAGCCTTCCCGAGT	567-625	
TGAAGCCGTTGGGCCAGCAGGTGGATGCCAGGAGTCTGCAGGCGTCAGACAATGAGAA	626-684	
CCCCCTGGACCACTCACACCAGTAGGAAGCTTGTCCTTTCCAACGTGGCCCATGCTCGC	685-743	
GTCTCTGTTTCAATGAAGTTAGCCGCTGCTCCCA	744-779	

Рис. 4. Аминокислотная последовательность γ -субъединицы ФДЭ и нуклеотидная последовательность соответствующей cДНК

нено, что остаток триптофана расположен в положении 70. Аминокислотная последовательность пептида SP-6 (81—87) совпадала с С-концевой последовательностью γ -субъединицы (Gly-Ile-Ile), установленной путем гидролиза белка карбоксипептидазой А.

На основании аминокислотной последовательности пептидов γ -субъединицы были синтезированы два уникальных комплементарно перекрывающихся нуклеотидных зонда длиной в 48 оснований каждый:

5'-ATGAACCTGGAGCCCCCAAGGCCGAGATCCGTTCCGCCACCCCGCTG-3'
Met-Asn-Leu-Glu-Pro-Pro-Lys-Ala-Glu-Ile-Arg-Ser-Ala-Thr-Arg-Val

3'-AGGCGGTGGGCGCACTACCCCCCGGCCACTGGGGGGCATTCCCCGGG-5'

Ser-Ala-Thr-Arg-Val-Met-Gly-Gly-Pro-Val-Thr-Pro-Arg-Lys-Gly-Pro

При выведении нуклеотидных последовательностей зондов учитывали частоту встречаемости кодонов в структурных генах родопсина и трансдуцина [20—23]. Для первоначального скрининга кДНК библиотеки клонов сетчатки быка использовали зонд I. Были идентифицированы 3 клон—pγ12, pγ20 и pγ43, дающие положительный сигнал гибридизации. Эти же клоны гибридизовались, хотя и слабее, с зондом II. После определения последовательности кДНК γ-субъединицы было обнаружено, что структура зонда I отличается от истинной последовательности в 5 положениях, а структура зонда II—в 10, что, очевидно, и определяло разницу в интенсивности гибридизационного сигнала.

Рестрикционный анализ клонированных фрагментов ДНК, выделенных из трех полученных клонов, показал их близкую гомологию. Для определения нуклеотидной последовательности кДНК был выбран клон pγ12.

Полная нуклеотидная последовательность изученного фрагмента кДНК, содержащего 833 пары оснований, представлена на рис. 4. Сравнение выведенной с помощью компьютера аминокислотной последовательности белка с аминокислотной последовательностью γ-субъединицы cGMP-ФДЭ показало, что выведенный фрагмент кДНК содержит всю структурную часть гена этого белка, составляющую 261 пару оснований, а также 5'- и 3'-нетранслируемые области (положение оснований 54 и 518 соответственно). Терминирующий кодон TAG находится в положении 262—264, а 3'-нетранслируемая область в положении 756—761 содержит сигнал полиадезинирования—AATAAA.

Использование в работе параллельного анализа аминокислотной последовательности белка и нуклеотидной последовательности соответствующей кДНК гарантировало правильность полученных результатов. В частности, определение структуры кДНК подтвердило существование в γ-субъединице в положениях 35 и 63 остатков треонина и аспарагиновой кислоты, что не было однозначно установлено при исследовании аминокислотной последовательности белка. С другой стороны, знание аминокислотной последовательности пептидов помогло установлению нуклеотидной последовательности на отдельных участках фрагмента кДНК.

Полипептидная цепь γ-субъединицы состоит из 87 аминокислотных остатков, что соответствует M_r 9,7 кД. N-концевая аминогруппа ацетилирована. γ-Субъединица является основным белком, в котором на 9 остатков дикарбоновых аминокислот приходится 13 остатков основных. Примечательно, что 10 из этих основных аминокислотных остатков сконцентрированы на сравнительно небольшом участке полипептидной цепи γ-субъединицы (положение 24—45), где нет ни одного остатка дикарбоновой аминокислоты (рис. 4). Можно предположить, что именно этот участок γ-субъединицы является функционально важным. В пользу такого предположения свидетельствует и тот факт, что ингибиторное действие

γ -субъединицы на активность ФДЭ быстро снималось при обработке белка трипсином в низкой концентрации [6, 9].

Можно заключить, что в ткани сетчатки позвоночных животных в первичных акцепторах световых квантов имеется специфический низкомолекулярный белок своеобразной первичной структуры, играющий ключевую роль в первичных механизмах фоторецепторного акта. Вопросы о характере взаимодействия этого белка с GTP-связывающим белком фоторецепторных мембран, о биологическом значении такого варианта системы трансдукции информационного сигнала, как и о роли отдельных участков этого белка в осуществлении его различных функций (влияние на каталитическую активность и метилирование) является предметом дальнейших исследований.

STRUCTURE AND FUNCTION OF BOVINE RETINAL SPECIFIC PROTEIN-INHIBITOR OF 3',5'-cGMP PHOSPHODIESTERASE

LIPKIN V. M., MURADOV H. H., *DUMLER I. L., *ETINGOF R. N.
M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, USSR Academy of
Sciences, Moscow

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

The function of the γ -subunit of 3',5'-cGMP phosphodiesterase in primary mechanisms of photoreception and the specificity of this protein for the retina tissue were studied. Using the monospecific antibodies to the γ -subunit, it has been established the latter is present only in the retina photoreceptor membranes of different animals, and was not revealed in other tissues. It has been shown the necessity of the γ -subunit for the photoinduced activation of phosphodiesterase. The amino acid sequence of the γ -subunit and the nucleotide sequence of respective cDNA were determined.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Woodruff M. L., Bownds D. J. *Gen. Physiol.*, v. 73, № 5, p. 629—654, 1979.
2. Govardovskii V. I., Berman A. L. *Biophys. Struct. Mechan.*, v. 7, № 1, p. 125—130, 1981.
3. Miller W. H. *Adv. Cycl. Nucl. Res.*, v. 15, p. 497—511, 1983.
4. Fesenko E. E., Kolesnikov S. S., Lyubarsky A. L. *Nature*, v. 333, № 6000, p. 310—312, 1985.
5. Думлер И. Л., Этингوف Р. Н. Докл. АН СССР, т. 213, № 5, с. 1197—1209, 1973.
6. Dumler I. L., Etingof R. N. *Biochim. et biophys. acta*, v. 429, № 2, p. 476—484, 1976.
7. Etingof R. N., Furayev V. V., Dumler I. L. — In: FEBS 12th Meeting, Dresden, 1978; *Cyclic Nucleotides and Protein Phosphorylation in Cdl Regulation* (eds. E. S. Krause et al.), v. 54, p. 71—80, Pergamon Press, Oxford, 1979.
8. Baehr W., Devlin M. J., Applebury M. L. *J. Biol. Chem.*, v. 254, p. 11669—11677, 1979.
9. Hurley J. B., Stryer L. *J. Biol. Chem.*, v. 257, № 18, p. 11094—11099, 1982.
10. Думлер И. Л., Этингوف Р. Н. Биол. мемб., т. 1, № 6, с. 565—572, 1984.

11. Ашмар Н. А., Оураза В. В., Этингоф Р. Н. Докл. АН СССР, т. 253, № 6, с. 1504—1508, 1980.
12. Fung B. K., Hurley J. B., Stryer L. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 78, № 1, p. 152—156, 1980.
13. Hurley J. B., Barry B., Ebrey T. G. Biochim. et biophys. acta, v. 675, № 3/4, p. 359—365, 1981.
14. Bitensky M. W., Haliday K. R., Rasenick M., Sorbi R. T., Stein P. J., Uchida S., Wheeler G. L., Yamazaki A. — In: Molecular Processes in Vision. Benchmark Papers in Biochemistry (eds. E. W. Abrahamson, S. E. Ostroy), v. 3, p. 331—339, Hutchinson Ross Publ. Co., Stroudsburg, Pa. 1984.
15. Liebman P. A., Sitaramayya A., Parkes J. H., Buzdygon M. W. Trends Pharmac. Sci., v. 5, № 7, p. 293—296, 1984.
16. Bitensky M. W., Yamazaki A., Wheeler G. L., George J. S., Rasenick M. M. Adv. Cycl. Nucl. Res., v. 17, p. 227—238, 1984.
17. Kawamura S., Murakami M. Biochim. et biophys. acta, v. 870, № 2, p. 256—266, 1986.
18. Артемьев Н. О., Этингоф Р. Н. Биохимия, т. 52, № 1, с. 154—159, 1987.
19. Swanson R. J., Applebury M. L. J. Biol. Chem. v. 258, № 17, p. 16599—16605, 1983.
20. Nathans J., Hogness D. S. Cell., v. 34, p. 807—814, 1983.
21. Hurley J. B., Fung B. K., Teplow D. B., Dreger W. J., Simon M. I. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 81, p. 6948—6952, 1984.
22. Tanabe T., Nukada T., Nishikawa Y., Sugimoto K., Suzuki H., Takanashi H., Hoda M., Haga T., Ichigawa A., Kangawa K., Minamino N., Matsuo H., Numa S. Nature, v. 315, p. 242—245, 1985.
23. Sugimoto K., Nukada T., Tanabe T., Takanashi H., Noda M., Minamino N., Kangawa K., Matsuo H., Hirose T., Inayama S., Numa S. FEBS Lett., v. 191, p. 235—240, 1985.

Поступила 10. IX 1986

УДК 577.1+577.352

РЕЦЕПТОРЫ НЕЙРОЛЕПТИКОВ И ИХ СВЯЗЬ С ПРОТЕИНКИНАЗНЫМИ РЕАКЦИЯМИ

МИКЕЛАДЗЕ Д. Г., АБУТИДЗЕ К. Д., САРТАНИЯ Н. А.

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

Из синаптических мембран головного мозга белых крыс солиubilизированы D_2 -дофаминовый и σ -опиатные рецепторы. При хроматографировании полученного экстракта на сульфирил- и галоперидол-сепаразах были выделены белки с величиной M_r 60, 50, 30 и 20 кД. Первые два из них являлись субъединицами Ca^{2+} -кальмодулинзависимой протеинкиназы II. Гель-фильтрация очищенных фракций на колонках высокого давления показала наличие еще одного низкомолекулярного белкового фрагмента с M_r 9 кД. Данный пептид специфически связывал D_2 -дофаминовый и σ -опиатные лиганды, что свидетельствует о том, что за D_2 -дофаминовую и σ -опиатную рецепцию является ответственным один и тот же участок активного центра. Предполагается, что Ca^{2+} -кальмодулинзависимая протеинкиназа либо функционально связана с рецепторным белком, либо сама содержит активные домены, взаимодействующие со специфическими лигандами.

В настоящее время показано, что многие типы рецепторных белков связаны с протенинкиназами системами клетки, осуществляющими фосфорилирование мембран и цитоплазматических белков [1]. Внутриклеточный домен рецепторов многих гормонов и факторов роста является протенинкиназой, фосфорилирующей белки по тирозиновому остатку [2]. С протенинкиназами взаимодействуют также и β -адренорецептор [3], холинорецепторы мускаринового и никотинового типов [4, 5], некоторые субтипы опиатных рецепторов [6]. Ранее нами было показано, что D_2 -дофаминовый рецептор солюбилизируется и очищается совместно с Ca^{2+} -кальмодулинзависимой протенинкиназой, которая изменяет константы связывания 3H -нейролептиков с мембранами [7].

Наиболее близко по своим фармакологическим и физиологическим свойствам к D_2 -дофаминовому рецептору стоят σ -опиатные белки. σ -Опиатный рецептор специфически связывает кетощиклазолин и является нечувствительным к налоксону [8]. Агонисты этого рецептора вызывают психотомимические и дисфорические эффекты и влияют на поведенческую активность животных и человека. Там, Cook [9] показали, что σ -рецептор может связывать один из специфических лигандов D_2 -дофаминового рецептора— 3H -галоперидол, поэтому установление молекулярной организации σ -рецептора и идентификация его активных участков позволит выяснить механизмы действия как психотомимических, так и нейролептических средств. Целью настоящего исследования явилось выделение активных фрагментов σ -опиатного и D_2 -дофаминового рецепторов и сравнение их физико-химических свойств.

Солюбилизацию обоих рецепторов производили неионным детергентом ХАПС (3-[(3-холамидопропил)диметиламмоний]-1-пропан сульфат) и далее хроматографировали на аффинных колонках галоперидол-сефарозы и сульпирид-сефарозы. Элюаты, полученные с колонок, анализировали электрофорезом с ДДС-Na в ПААГ. Поскольку атипичный нейролептик сульпирид является высокоспецифичным антагонистом D_2 -дофаминового рецептора [10], а галоперидол, кроме D_2 , связывается и с другими белками, в том числе и с σ -опиатным рецептором, в элюатах с галоперидол-сефарозной колонки был обнаружен более широкий спектр белков (рис. 1, а). Около 5 фракций проявилось на электрофореграмме при окрашивании $AgNO_3$ геля элюатов с галоперидол-сефарозной колонки, и лишь 3 было найдено при электрофорезе элюатов, собранных с сульпирид-сефарозы. В обоих случаях главными оказались белки с величиной M_r 60 и 50 кД. Учитывая, что эти белки мигрировали аналогично очищенной и гомогенной Ca^{2+} -кальмодулинзависимой протенинкиназе, а также то, что элюаты с обоих аффинных сорбентов обладали подобной же ферментативной активностью, можно заключить, что они являются субъединицами Ca^{2+} -кальмодулинзависимой протенинкиназы.

Следует также отметить то, что эта протенинкиназа обнаруживается не только после хроматографирования на аффинных колонках со связанными нейролептиками, но и идентифицируется при гель-фильтрации солюбилизованного экстракта на TSK-gel HW-55 («Toyo Soda, MFG».

Япония) и сопутствует рецепторной активности (рис 1,б). Уменьшение специфического связывания ^3H -налоксона во фракциях сопровождалось понижением величины активности полос на электрофореграмме, соответствующих белкам с M_r 60 и 50 кД. Полученные данные могут свидетельствовать о том, что Ca^{2+} -кальмодулинзависимая протеинкиназа сопутствует как D_2 -дофаминовой, так и опиатной активности.

Как уже было сказано выше, с галоперидолом могут взаимодей-

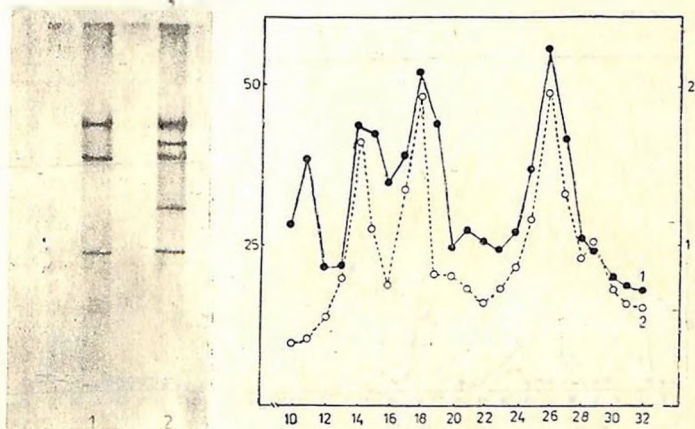


Рис. 1. а—электрофореграмма белков, полученных после хроматографирования солиubilизированного экстракта на сульфид-сефарозе (1) и галоперидол-сефарозе (2); б—хроматография солиubilизированных белков на TSK-gel HW-55. 1—протеинкиназная активность, 2—специфическое связывание ^3H -налоксона. По оси абсцисс—номера проб; по осям ординат слева—протеинкиназная активность в 10^3 имп/мин ^{32}P ; справа—связывание ^3H -налоксона в 10^3 имп/мин

вовать не только белки, проявляющие D_2 -дофаминовую активность, но и σ -опиатный рецептор [9]. Для выяснения того, какие из белков, связывающиеся с галоперидол-сефарозой, являются ответственными за σ -опиатную активность, проводили гель-фильтрацию на колонке высокого давления Protein Pak SW-300 („Millipore-Waters“, США) после предварительного инкубирования с ^3H -SKF 10047. Выяснилось, что из 5 белковых пиков, выходящих из колонки, 3 обладали σ -рецепторной активностью. Радиоактивный лиганд связывали белки, выходящие в свободном объеме колонки, и белки с M_r 60, 50 и 9 кД. Максимальной активностью характеризовался низкомолекулярный пик, который, по-видимому, соответствовал протеолитическому фрагменту рецепторного белка (рис. 2. а).

В процессе выделения и солиubilизации рецепторных белков в результате активности эндогенных протеаз происходит образование пептидных фрагментов. Некоторые из них, несмотря на небольшую величину

M_r , проявляют рецепторную активность и могут связывать специфические лиганды [11]. Однако, обладая активными участками связывания радиоактивных лигандов, из-за отсутствия пространственной ориентации и третичной структуры они теряют стереоспецифичность. Поскольку эти пептиды имеют сравнительно простую структуру, то их изучение является более удобным для идентификации активных участков рецепторного белка.

Полученный нами низкомолекулярный фрагмент с величиной M_r 9 кД

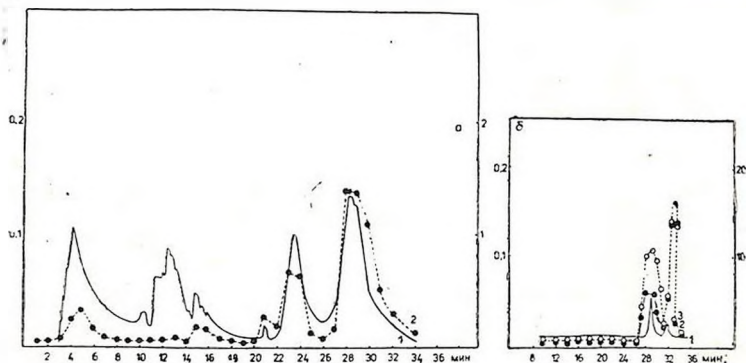


Рис. 2. Гель-фильтрация галоперидолсвязывающих белков на колонке SW-300 (а) и пептида с величиной M_r 9 кД на колонке SW-60 (б). 1—количество белка; 2—связывание 3H -SKF 10047; 3—связывание 3H -домперидона. По оси абсцисс—время в мин; по осям ординат: слева—поглощение при A_{214} в усл. ед., справа—связывание 3H -SKF 10047 и 3H -домперидона в 10^2 имп/мин

содержал активные рецепторные центры связывания 3H -домперидона и 3H -SKF 10047, причем связывание этих соединений было специфичным, ибо радиоактивные лиганды при инкубировании замещались нерадиоактивными. Гель-фильтрация высокого давления на колонке Protein Pak SW-60 („Millipore-Waters“, США) показала, что пик специфической радиоактивности соответствовал пептиду, выходящему в объеме M_r 9 кД (рис. 2, б).

Полученный с помощью аффинной хроматографии и двух гель-фильтрационных колонок чистый фрагмент рецептора подвергали протеолитическому перевариванию (рис. 3, а). С целью получения галоперидолсвязывающих аминокислотных последовательностей после обработки протеазами гидролизат повторно наносили на аффинную колонку галоперидол-сефарозы. Из всех использованных нами протеаз (трипсина, химотрипсина, проназы, колагеиназы и папаина) лишь проназа отсекала фрагмент, обладавший способностью связываться с аффинной колонкой (рис. 3, б). Папаин, химотрипсин и трипсин вызывали более сильное

расщепление белка и образовавшиеся пептиды, состоявшие из 10—15 аминокислот, не связывались с галоперидолом.

Связывавшийся с галоперидол-сефарозой отщепляемый проназой фрагмент имел величину M_r 3,5 кД; кроме 3H -галоперидола и 3H -домперидона он связывал также и 3H -SKF 10047. Предварительная инкубация пептида с этими соединениями с дальнейшей гель-фильтрацией смеси на SW-60 показала, что радиоактивность обнаруживалась в объеме M_r 3,5 кД; это свидетельствовало о том, что данный фрагмент содержит также и центр связывания, ответственный за σ -опиатную активность.

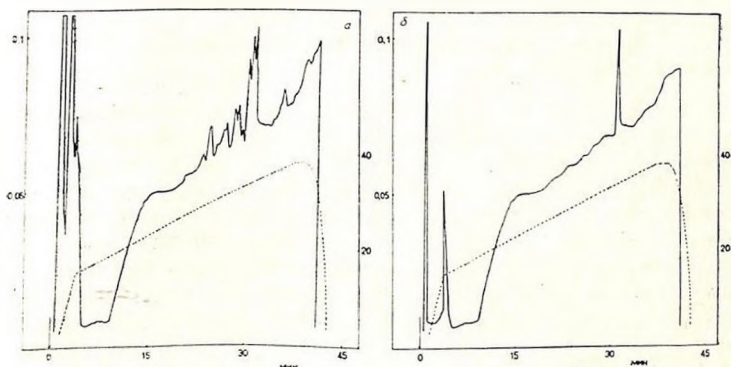


Рис. 3. Хроматография проназного гидролизата пептида с величиной M_r 9 кД на колонке С18 (RP) (а) и проназного гидролизата пептидов (б), связывающихся с галоперидол-сефарозой. 1—количество белка, 2—выделение CH_3CN . По оси абсцисс—время в мин; по осям ординат: слева—поглощение при A_{214} в усл. ед., справа—выделение CH_3CN , в %.

Таким образом, с помощью аффинной колонки и хроматографии высокого давления был получен минимальный фрагмент рецепторного белка, обладающий как σ -опиатной, так и D_2 -рецепторной активностями. O'Callaghan и соавт. [6] показали, что опиаты в зависимости от времени и дозы вызывают усиление фосфорилирования белков синаптических мембран с M_r 60 и 50 кД. Наши предыдущие [7] и вышеприведенные исследования также указывают на то, что белки с M_r 63 и 52 кД являются сопутствующими D_2 -дофаминовому и опиатным рецепторам. Эти белки являются субъединицами Ca^{2+} -кальмодулинзависимой протенинказы II, имеющей высокую величину M_r и обладающей самофосфорилирующей активностью [12]. Эта Ca^{2+} -кальмодулинзависимая протенинказа широко распространена в нейронах, образует специфическую пространственную структуру и связана со многими клеточными элементами нейрона, в том числе белками синаптических мембран и постсинаптических уплотнений [13, 14]. Полученные нами данные могут свидетельствовать о том, что либо Ca^{2+} -кальмодулинзависимая протенин-

наза функционально связана с D_2 - и опиатными рецепторами, либо сама имеет домены, ответственные за рецепцию нейролептиков и пептиклиндов.

Мы не можем в настоящее время сказать, являются ли полученные нами низкомолекулярные пептиды фрагментами белков с M_r 62 и 53 кД, или они являются продуктами протеолитического распада других белков. Однако ясно, что пептид с величиной M_r 9 кД является фрагментом белка, ответственного за σ -опиатную и D_2 -дофаминовую активность.

RECEPTORS OF NEUROLEPTICS AND THEIR CONNECTION WITH PROTEIN KINASE REACTIONS

MIKELADZE D. G., ABUTIDZE K. D., SARTANIJA N. A.,

I. S. Beritashvili Institute of Physiology Georgian SSR Acad. Sci, Tbilisi

D_2 -Dopamine and σ -opiate receptors have been solubilized from rat brain synaptic membranes. On chromatography on sulpyrid-and haloperidol-Sepharose 6B proteins with M_r 60,50,30 and 20 K have been resolved. The first two turned to be subunits of Ca^{2+} , calmodulin-dependent protein kinase II. HPLC Made it possible to identify one more low- M_r component with M_r 9K; this peptide specifically binds both with D_2 -dopamine and σ -opiate ligands pointing to the fact that one common site of the active center is responsible for D_2 -dopamine and σ -opiate reception. A suggestion is made that Ca^{2+} -calmodulin dependent protein kinase may be either functionally coupled with receptor proteins or itself contains active domains reacting with specific ligands.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Nestler E. J., Walacs S. I., Greengard P. Science, v. 225, p. 1357—1364, 1984.
2. Nairn A. C., Hemmings H. C., Greengard P. Annu. Rev. Biochem., v. 54, p. 931—976, 1985.
3. Nambi P., Peters Y. R., Sibley D. R., Lefcowitz R. L. J. Biol. Chem., v. 260, p. 2165—2171, 1985.
4. Burgoyne R. D. FEBS Lett., v. 122, p. 282—288, 1980.
5. Changeux Y.—P., Deviffers—Thierry A., Chemouiffi P. Science, v. 225, p. 1335—1345, 1984.
6. O'Callaghan J. P., Joskevich J. C., Lovenberg W. J. Pharmacol. Experim. Therap., v. 220, p. 696—702, 1982.
7. Mikeladze D. G., Dzeladze D. T. J. Neurochem., v. 44, suppl. p. 575, 1985.
8. Snyder S. H. Science, v. 224, p. 22—31, 1984.
9. Tam S. W., Cook L. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 81, p. 5618—5621, 1980.
10. Seem P. Pharmacol. Rev., v. 32, p. 229—313, 1980.
11. Howard A. D., de La Baume, Gioannini T. L., Hiller J. M., Simon E. J. Biol. Chem., v. 260, p. 10833—10839, 1985.
12. Lai Y., Nairn A. C., Greengard P. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 83, p. 4253—4257, 1985.
13. Goldenring J. R., McGuire J. S. Jr., DeLorenzo R. J. J. Neurochem., v. 42, p. 1077—1084, 1984.
14. Shieds S. M., Vernon P. J., Kelly T. J. Neurochem., v. 43, p. 1599—1609, 1984.

Поступила 9. IX 1986

КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ СДВИГИ БЕЛКОВ И РНК В КЛЕТКАХ ЯДЕР СТВОЛА ГОЛОВНОГО МОЗГА В ДИНАМИКЕ ЗИМНЕЙ СПЯЧКИ СУСЛИКОВ

ДЕМИН Н. Н., *ШОРТАНОВА Т. Х., *ГОЛОВИНА Т. Н.

Институт физиологии им. И. П. Павлова АН СССР, Ленинград;
Кабардино-Балкарский государственный университет, Нальчик

Зимняя спячка у сусликов сопровождается значительными количественными сдвигами, причем разными, белков и РНК в клетках супраоптического ядра гипоталамуса и дорзального ядра шва головного мозга. Эти сдвиги неординаковы в нейронах и в их глиальных клетках-сателлитах. Различия между метаболизмом исследованных структур особенно значительны в период подготовки к пробуждению. Тенденция к близким по направлению сдвигам отмечена и у животных, находившихся в течение холодного сезона в теплом помещении и не впадавших поэтому в спячку.

Состояние такого глубокого и длительного естественного гипобноза у некоторых млекопитающих, как зимняя спячка, привлекает внимание не только с общебиологической точки зрения, но вызывает все больший интерес и в практическом отношении, прежде всего в клиническом. В настоящее время изучены уже многие важные физиологические и эндокринологические процессы, протекающие в организме в динамике зимней спячки (ее начале, поддержании и выходе из нее) [1]. Эти процессы во многом принципиально отличаются от имеющих место при принудительной, искусственно вызываемой гипотермии. Состояния гипобноза и искусственной гипотермии различаются между собой прежде всего тем, что при зимней спячке сохраняется активная терморегуляция, но только на сниженном уровне, а также тем, что искусственная гипотермия представляет собой навязываемое организму выраженное стрессовое состояние с повышенной вначале теплопродукцией, противопоставляемой внешнему охлаждению, тогда как при зимней спячке торможение метаболизма и термогенеза является естественным, генетически обусловленным внутренним процессом, которому лишь содействует низкая температура окружающей среды [1, 2].

Несомненно, что особое внимание привлекает участие в организации зимней спячки различных центров головного мозга. В то же время фундаментальные биохимические процессы в них при этом состоянии известны еще очень мало.

В функционально-нейрохимических процессах ведущая роль принадлежит белково-нуклеиновому метаболизму, поэтому понятно, что А. В. Паладин, впервые в нейрохимии в 50-х годах обратившийся к изучению зимней спячки, начал со своими сотрудниками эту работу с изучения превращений белков и нуклеиновых кислот в гомогенатах нервной ткани [3]. При этом, учитывая чрезвычайно высокую морфологическую, физиологическую и биохимическую гетерогенность НС, особенно головного мозга, необходимо проводить исследования не гомогенатов, а на уровне отдельных клеток, отдельных систем нейрон—глиальные клетки-сателлиты.

Такое количественное определение общего содержания белков и нуклеиновых кислот оказалось возможным выполнять цитоспектрофотометрическим методом на срезах фиксированных и заключенных в парафин проб ткани, в частности окрашенных для выявления нуклеиновых кислот галлоцианин-хромовыми квасцами (определение при длине волны 546 нм), а в случае белков, окрашенных амидо-черным 10 Б (определение при длине волны 620 нм) [4, 5]. Результаты определений величин оптической плотности при этом соответствуют величинам концентрации исследуемых объектов. Получив также и данные о величинах объема тела целой клетки или в случае нейронов цитоплазмы и ядра в отдельности, можно вычислять также и величины содержания определяемых веществ на 1 клетку. Так как количество ДНК в отдельных клетках постоянно, то все количественные изменения нуклеиновых кислот при сдвигах функционального состояния клеток можно относить лишь за счет сдвигов количества одних РНК.

Впервые таким тонким цитохимическим методом при зимней спячке (на примере краснощеких сусликов) были определены концентрация и содержание на 1 клетку нуклеиновых кислот (сдвиги количества РНК) в отдельных клетках ряда структур ЦНС—передних рогов спинного мозга, гиппокампа и супраоптического ядра гипоталамуса [6].

Затем объектом уже наших подобных цитохимических исследований при зимней спячке послужили цитоплазма нейронов и их цельные ганглийные клетки-сателлиты супраоптического ядра и дорзального ядра шва. Мы изучали не только количественные сдвиги РНК, но и суммарных белков. Выбор дорзального ядра шва был связан с тем, что его функциональная активность осуществляется посредством серотонина, который играет особую роль в механизмах зимней спячки [7—9]. При этом казалось желательным для сопоставления именно у тех же подопытных животных провести такие же исследования клеток нейросекреторного супраоптического ядра, белково-нуклеиновый метаболизм в котором значительно активируется при действии стрессорных факторов, практически мало проявляющемся при спячке с ее выраженной сенсорной деафферентацией.

Работа была проведена на малых кавказских сусликах (*Citellus pygmaeus* Pall.), отловленных в августе в районе Чегемского ущелья Кабардино-Балкарской АССР на высоте 500—600 м над уровнем моря. При исследованиях в динамике зимней спячки—в глубоком ее периоде (в декабре) и в период подготовки к пробуждению (в марте), для контроля часть животных одновременно с сусликами, находившимися в спячке в холодном помещении, содержали в виварии при 21°. Эти контрольные животные в спячку не впадали и оставались вполне активными. Таких животных также исследовали в декабре и в марте одновременно со спавшими. Ректальная температура у сусликов, впавших в спячку в естественные сроки в холодном помещении в середине октября, при содержании их при 4—10° как в декабре, так и в марте, составляла 4—6°. У животных же, остававшихся в те же сроки активными, ректальная

температура была 36—37°, как и в августе. Общими контрольными данными служили результаты исследований, проведенных в августе вскоре после отлова сусликов.

Следует заметить, что генетическая обусловленность нейрохимических сдвигов в холодном сезоне проявлялась также и у контрольных сусликов, не находившихся в спячке в декабре—марте [10—12]. В таблице представлены результаты определений количества белков и РНК в клетках супраоптического ядра и дорзального ядра шва, произведенных у этой группы животных. Можно видеть, что полученные данные, представленные в процентах от величин, установленных в августе, отклонялись от последних. Эти изменения были разными в исследованных ядрах, а в общем по направлению близкими к обнаруженным у животных, которые находились в это время в спячке (см. ниже). Особенно это касается сдвигов количества белков как в нейронах, так и в глиоцитах: в клетках супраоптического ядра и у неспавших сусликов имело место снижение количества белков, а в клетках дорзального ядра шва их количество поднималось. Затем, если в глиоцитах супраоптического ядра количество

Таблица

Изменения количества белков и РНК в клетках супраоптического ядра и дорзального ядра головного мозга сусликов, не впадавших в зимнюю спячку в декабре—марте [10—12] (в % от данных, полученных в августе)

Время исследования	Б е л к и		Р Н К	
	Концентрация	Содержание на 1 клетку	Концентрация	Содержание на 1 клетку
<i>Цитоплазма нейронов</i>				
<i>Супраоптическое ядро</i>				
Декабрь	—8	—15	н д	н д
Март	—8	н д	н д	н д
<i>Дорзальное ядро шва</i>				
Декабрь	н д	н д	—10	н д
Март	8	14	10	25
<i>Глиоциты</i>				
<i>Супраоптическое ядро</i>				
Декабрь	—16	—17	н д	н д
Март	—17	—24	н д	н д
<i>Дорзальное ядро шва</i>				
Декабрь	—14	н д	—12	н д
Март	н д	16	н д	19

Примечание. н/д—разница статистически не достоверна.

РНК как в декабре, так и в марте не отличалось от августовских данных, то в глиоцитах дорзального ядра шва оно увеличивалось.

Средние данные содержания на 1 клетку и концентрации белков и РНК в цитоплазме нейронов супраоптического ядра и в их глиальных клетках-сателлитах в динамике развития зимней спячки у сусликов [10] в процентах от соответствующих контрольных величин (в декабре и в марте) приведены на рис. 1.

Эти данные показывают, что в период глубокой спячки (в декабре) имело место значительное падение абсолютного содержания белков в цитоплазме нейронов по сравнению с декабрьским же контролем: концентрация белков снижалась меньше (из-за одновременного сокращения

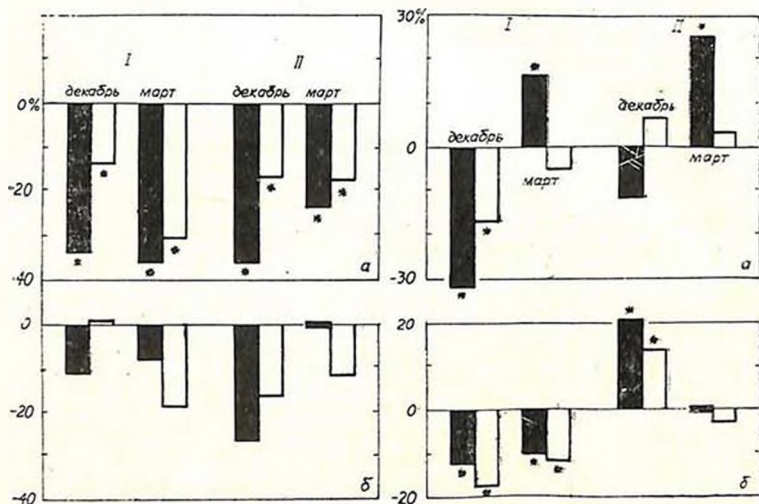


Рис. 1. Изменения содержания на 1 клетку и концентрации белков (I) и РНК (II) в цитоплазме нейронов (а) и в их глиальных клетках-сателлитах (б) супраоптического ядра гипоталамуса головного мозга сусликов при зимней спячке в декабре и в марте (по [10]). ■ — содержание на 1 клетку. □ — концентрация. По оси ординат — отклонение от контрольных данных в %. *отклонение статистически достоверно

Рис. 2. Изменения содержания на 1 клетку и концентрации белков (I) и РНК (II) в цитоплазме нейронов (а) и в их глиальных клетках-сателлитах (б) дорзального ядра шва головного мозга сусликов при зимней спячке в декабре и в марте (по [11]). Обозначения те же, что и на рис. 1

объема цитоплазмы). Отмеченное же при этом уменьшение абсолютного содержания белков в глиоцитах было значительно слабее, чем в нейронах. Концентрация белков в глиоцитах в декабре не отличалась от контроля.

В период, предшествующий выходу из спячки (в марте), содержание

белков на 1 клетку в нейронах продолжало оставаться на том же низком уровне, что и в декабре, причем на фоне существенного дополнительного падения их концентрации. Приблизительно такую же (но на более высоком уровне) картину наблюдали и в глиоцитах.

В случае РНК в декабре в нейронах были установлены количественные изменения, практически полностью аналогичные описанным в случае белков: в марте же происходило уже некоторое повышение содержания РНК на 1 клетку, а их концентрация не падала дополнительно вместе с концентрацией белков, оставаясь на уровне декабрьских величин. В глиоцитах в декабре снижалось не только абсолютное содержание РНК (приблизительно на столько же, на сколько и в нейронах), но снижалась и их концентрация. В марте же при относительной стабильности сниженной величины концентрации РНК абсолютное их содержание, поднявшись, достигало контроля; увеличивалась немного и величина концентрации РНК.

Итак, в период глубокой зимней спячки в супраоптическом ядре резкое падение абсолютного содержания как белков, так и РНК в нейронах четко коррелировало с такими же изменениями количественных характеристик РНК также и в глиоцитах, но на фоне близких к контролю количественных величин белков в глиоцитах. Такие отношения в системе нейрон—нейроглия могут указывать на угнетение белково-нуклеинового метаболизма в нейронах, несмотря на поддержание достаточно высокой концентрации белков в глиальных клетках-сателлитах. В марте же при все еще сниженном абсолютном содержании белков в нейронах и уменьшенной их концентрации в глиоцитах уже происходило накопление РНК как в нейронах, так (особенно) и в глиоцитах. Это может служить некоторым показателем подготовки к нормализации белково-нуклеинового метаболизма в супраоптическом ядре для выполнения его высокой нейросекреторной активности в условиях действия ряда стрессорных факторов вслед за выходом животных из зимней спячки.

Часть группы спавших сусликов в декабре была выведена из спячки путем переноса их в теплое помещение. Через 2,5 ч в результате саморазогревания они достигали активного нормотермического состояния с ректальной температурой 36—37°. Такое пробуждение как в нейронах, так и в глиоцитах супраоптического ядра сопровождалось фактической нормализацией и количества в них белков, достигавшего уровня августовских данных: количественные же характеристики РНК, поднимаясь, достигали лишь уровня декабрьского контроля, который был ниже августовского. Это может указывать на вероятность усиления белкового метаболизма при пробуждении в нейронах за счет глиоцитов.

Средние данные содержания на 1 клетку и концентрации белков и РНК в цитоплазме нейронов дорзального ядра шва и в их глиальных клетках-сателлитах в динамике развития зимней спячки у сусликов [11] в процентах от соответствующих контрольных величин (в декабре и в марте) приведены на рис. 2.

Эти данные показывают, что в период глубокой спячки (в декабре)

по сравнению с величинами у животных, неспавших в это время, имело место весьма значительное снижение содержания белков в расчете на цитоплазму одного нейрона при несколько меньшем снижении и концентрации белков. Что касается глиоцитов, то абсолютное содержание в них белков в этот период также снижалось, но существенно слабее, чем в цитоплазме нейронов, причем концентрация белков уменьшалась практически так же, как и абсолютное содержание. Количественные величины РНК в цитоплазме нейронов в данное время оказались такими же, как и в контроле, тогда как в глиоцитах при этом было обнаружено весьма значительное накопление РНК, превышавшее контрольные данные; повышалась и их концентрация.

В поздний же период спячки при подготовке организма животных к выходу из нее (в марте) была выявлена в дорзальном ядре шва иная картина. Этот период характеризовался резким накоплением как белков, так и РНК в цитоплазме нейронов, выше их содержания в контроле. В глиоцитах количество белков оставалось в марте на таком же немного пониженном уровне, что и в декабре; количество РНК в этих клетках к марту значительно снижалось, достигая контрольного уровня.

Можно предполагать, что такие данные, видимо, указывают на то, что в период глубокой спячки в системе нейрон—нейроглия дорзального ядра шва, так же как и в супраоптическом ядре, происходило торможение белково-нуклеинового метаболизма, но при своеобразном накоплении РНК в глиоцитах. В общем, о таком торможении свидетельствует снижение содержания на 1 клетку и концентрации белков в цитоплазме нейронов лишь при очень небольшом уменьшении количественных показателей белков в глиоцитах на фоне неизменности количества РНК в нейронах и отмеченного возрастания его в глиоцитах выше контроля. Накануне же выхода из спячки, в противоположность явлениям, которые наблюдали в супраоптическом ядре, видны значительные признаки активирования белково-нуклеинового метаболизма в системе нейрон—нейроглия дорзального ядра шва: существенное накопление белков, и особенно РНК, в нейронах, но на фоне уже недостоверно сниженного количества белков в глиоцитах с уменьшением в них количества РНК до контрольного уровня. Возможно допущение, что возрастание количества РНК в нейронах в марте обеспечивается переходом в них запасов РНК из глиоцитов, образовавшихся в них во время глубокой спячки со сниженными процессами биосинтеза белка в этом периоде.

Итак, зимняя спячка у сусликов, несмотря на резко сниженную температуру тела, сопровождается значительными количественными сдвигами белков и метаболически тесно связанных с ними РНК в динамике этого состояния как в клетках нейросекреторного, участвующего в осуществлении стрессовых процессов супраоптического ядра, так и дорзального ядра шва, имеющего прямое отношение к организации зимней спячки. В разные периоды такие сдвиги неодинаковы в этих структурах как в случае белков, так и РНК, как в нейронах, так и в их глиальных клетках-сателлитах, особенно в период подготовки к пробуждению.

QUANTITATIVE PROTEIN AND RNA CHANGES IN BRAIN STEM NUCLEI CELLS IN DYNAMICS OF GROUND SQUIRREL HIBERNATION

DOEMIN N. D., *SHORTANOVA T. KH., *GOLOVINA T. N.

I. P. Pavlov Institute of Physiology, USSR Academy of Sciences, Leningrad; *Kabardino-Balkarsk State University, Nalchik

It has been shown the hibernation in ground squirrels is accompanied by considerable quantitative not identical changes of protein and RNA in nn. supraopticus et raphé dorsalis. These changes were not equal as well in neurons and in their glial cells-satellites. The differences between metabolism in structures studied was revealed to be particularly significant at the period of preparation to the termination of hibernation. A tendency to the shifts in similar directions was noted as well in animals kept during the cold season in a warm housing and, therefore, did not hibernate.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Калябухов Н. Н. Спячка млекопитающих, М., Наука, 1985.
2. Тимофеев Н. Н. Искусственный гипобноз, М., Медицина, 1983.
3. Палладин А. В.—В кн.: Избранные труды, с. 374—384, Киев, Наукова Думка, 1975.
4. Певзнер Л. Э. Функциональная биохимия нейроглии, Л., Наука, 1972.
5. Демин Н. Н., Козан А. Б., Моисеева Н. И. Нейрофизиология и нейрохимия с. л. Л., Наука, 1978.
6. Семшина Т. М., Певзнер Л. Э. Цитология, т. 17, с. 354—358, 1975.
7. Попова Н. К.—В кн.: Механизмы зимней спячки млекопитающих, Владивосток, ДВНЦ АН СССР, с. 91—97, 1977.
8. Попова Н. К., Науменко Е. В., Колмаков В. Г. Серотонин и поведение, Новосибирск, Наука, 1978.
9. Кудрявцева Н. Н.—В кн.: Механизмы зимней спячки млекопитающих, Владивосток, ДВНЦ АН СССР, с. 118—124, 1977.
10. Демин Н. Н., Головина Т. Н., Шортанова Т. Х., Рубинская Н. А. Нейрохимия, т. 5, с. 149—159, 1986.
11. Головина Т. Н., Маликов У. М., Шортанова Т. Х., Демин Н. Н. Физиол. журн. СССР, т. 71, с. 945—951, 1985.
12. Головина Т. Н., Маликов У. М., Рубинская Н. А. Нейрохимия, т. 4, с. 185—189, 1985.

Поступила 9. IX 1986

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГАНГЛИОЗИДОВ С ФЕРМЕНТАМИ ГОЛОВНОГО МОЗГА НА ПРИМЕРЕ ЦИТОЗОЛЬНОЙ СИАЛИДАЗЫ

ТЕТТАМАНГИ Г., ФИОРИЛЛИ А., ВЕНЕРАНДО Б.

Кафедра медицинской химии и биохимии медицинского факультета
Миланского университета, Италия

Показано, что цитозольная сиалидаза головного мозга свиньи взаимодействует с мицеллярными ганглиозидами (например, с GTIb) с образованием до двух стабильных белок-ганглиозидных комплексов с разной величиной M_r . Низкомолекулярный комплекс является комбинацией одной ганглиозидной мицеллы с двумя молекулами ферментного белка. Комплекс с большой молекулярной массой, по-видимому, представляет собой димер. Связанный в комплексе фермент каталитически неактивен. Обработка низкомолекулярного комплекса такими детергентами, как тритон X-100 и лизолецитин вызывает существенные модификации структуры комплекса с высвобождением части фермента в активной форме и с реорганизацией оставшегося комплекса, приобретающего некоторую ферментативную активность. Способность к образованию комплексов с ферментом с его последующей инактивацией проявляют только гомогенные мицеллы ганглиозида; в случае смешанных мицелл (третон X-100-ганглиозид с высоким содержанием детергента) комплексы с ферментом не образуются, а мицеллы ведут себя как хорошие ферментные субстраты. Обратимая инактивация белков при взаимодействии с мицеллами ганглиозидов рассматривается как возможный модуляторный механизм, способствующий образованию и распаду ганглиозидных кластеров в плазматических мембранах.

Ганглиозиды, содержащие остатки сиаловой кислоты (гликосфинголипиды), обладая сильно выраженными амфифильными свойствами, ассоциируются в водных растворах с образованием мицелл с большой величиной M_r [1]. Они являются нормальной составной частью плазматической мембраны клеток позвоночных и располагаются асимметрично в ее наружном слое, образуя в нем различные специфические рецепторные участки. Было показано [2, 3], что как в искусственных, так и в естественных мембранах ганглиозиды отделяются по латеральной фазе с образованием скоплений, внутри которых межмолекулярная организация ганглиозидов подобна внутримицеллярной.

Концентрация ганглиозидов—один из факторов, способствующий образованию кластеров, поэтому в мембранах клеток нервной ткани, в которых содержание ганглиозидов весьма велико [1], можно предвидеть не только само образование богатых ганглиозидами микродоменов, но и их потенциальную функциональную значимость. В самом деле, если образование кластеров имеет место вблизи активных белков (ферментов, рецепторов, носителей, каналов), то ганглиозиды могут вызывать конформационные функциональные изменения в этих белках. Это может служить частью молекулярной основы постулируемой «трансдукторной» роли ганглиозидов [4]. Для подтверждения этой гипотезы необходимо прямое изучение взаимодействий ганглиозидов с белками в мембранах, что в настоящее время является трудной задачей. Поэтому простые модели

взаимодействий белков с мицеллярными ганглиозидами представляются исключительно полезными.

В данной работе представлены результаты исследований взаимодействий между растворимой цитозольной синапсидазой головного мозга свиньи и мицеллами ганглиозида GT1b, являющегося потенциальным субстратом синапсидазы. Получены доказательства образования комплекса фермента с мицеллами GT1b, в котором фермент неактивен, но из которого он может быть переведен в полностью активную форму.

Материалы и методы

В работе использовали следующие реактивы: N-ацетилсериаминовая кислота (NeuAc), кристаллический бычий сывороточный альбумин, холат и ДОХ-Na, тауро-холевая кислота, (3-коламино-пропандиметилламино) 1-пропансульфонат (КПДМАПС), октил- β -глюкопиранозид („Sigma“, США); 4-метилумбеллиферил- α -D-N-ацетилсериаминовая кислота (MU-NeuAc) и метилумбеллиферон (MU) фирмы „Koch Light“, Англия; ультрагель AcA-34 („LKB“, Швеция); тритон X-100 („Rohm. Haas“, США); сульфобетани („Serva“, ФРГ); аннелецитин (DL- γ -пальмитоил- α -аннелецитин) фирмы „Fluka“, Швейцария. Головной мозг свиней получали на бойню сразу после забоя животных и обрабатывали, как указано ранее [5].

Получение ганглиозидов. Ганглиозиды GT1a, GD1a, GD1b, GM1 (согласно классификации Svennerholm [6]) были получены по методу Venerando и соавт. [7] со степенью чистоты более 90%. Средняя величина M_r мицелл GT1b, определенная по методу Corti и соавт. [8], составляла 350 ± 35 кД. Ганглиозид GD1a, меченный 3H , получали по методу Ghidoni и соавт. [9]; радиохимическая чистота—более 99%, удельная радиоактивность—0,96 Ки/ммоль.

Получение и определение активности цитозольной синапсидазы из головного мозга (изофермент А). Фермент экстрагировали и выделяли из головного мозга свиньи по методу Venerando и соавт. [5, 7] с очисткой в 2000 раз. Очищенный фермент элюировался с колонки с ультрагелем AcA-34 одним пиком с величиной M_r 420 кД. Его активность определяли колориметрически, используя в качестве субстрата GT1b (по измерению высвобождающейся NeuAc) или флуориметрически с использованием MU-NeuAc (по высвобождению MU) по методу, описанному Venerando и соавт. [7], при оптимальных условиях реакции, предложенных теми же авторами. Активность выражали в международных единицах—в микромолях высвобождающегося MU или NeuAc в мин при 37°.

Образование и разделение комплексов синапсидазы с мицеллярным GT1b проводили согласно описанной процедуре [7]; комплексы получали инкубацией 0,80 мкг/мл препарата фермента с 0,5 мМ GT1b в течение 30 мин при 37° [7].

Другие аналитические методы. Количество NeuAc, связанной с ганглиозидами, определяли по методу Svennerholm [10], используя в качестве стандарта чистую NeuAc; содержание белка определяли по методу Lowry и соавт. [11], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин. Величины M_r определяли как описано ранее, используя набор маркерных белков [7]; измерения радиоактивности проводили с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика [7].

Результаты и обсуждение

Ранее нами было показано [7], что цитозольная синапсидаза головного мозга свиньи способна высвобождать синаповую кислоту из низкомолекулярных синаподериватов (в том числе из MU-NeuAc); при этом кривая зависимости скорости реакции от концентрации субстрата представляла

классическую гиперболу. Фермент атаковал также такие ганглиозиды, как GT1b, GD1b и GD1a, однако зависимость скорости реакции от величины концентрации субстрата и ферментного белка в этом случае имела двуфазную и сигмоидную форму (рис. 1). В частности, при определенном соотношении фермент/ганглиозид ферментативная активность практически была равна нулю. Необходимо учесть, что при использованных условиях определения ганглиозиды находили в виде мицелл. Причиной таких кинетических аномалий может быть образование одного или двух комплексов

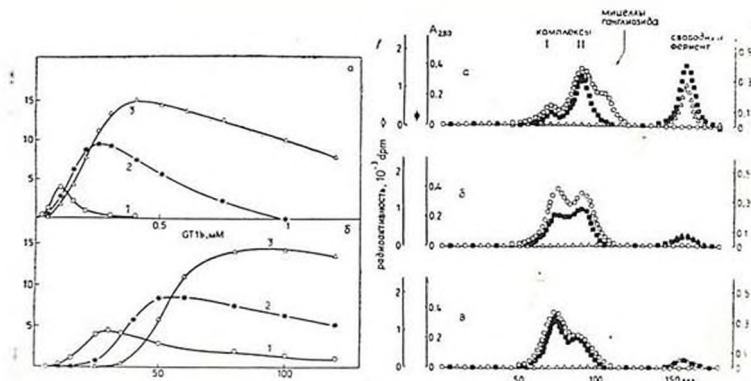


Рис. 1. Кажущаяся кинетика взаимодействия цитозольной сиалидазы головного мозга синьки с ганглиозидом GT1b в мицеллярной форме. Изучали зависимость скорости реакции (V) от концентрации субстрата при различной концентрации фермента; зависимость скорости реакции (V) от концентрации фермента изучали при различной концентрации ганглиозидов.

Рис. 2. Образование комплексов сиалидаза-GT1b в условиях, применяемых при определениях активности фермента. Эффект хранения при 37° на образование комплексов I и II (A—15 мин; B—45 мин; C—90 мин). Хроматографию на колесике с ультрагелем AcA-34 проводили, как описано в разделе «Материалы и методы»; фермент—0,25 мг/мл; GT1b (с добавлением $0,15 K_2 H_2 P_4$ —0,1 мМ. За элюцией ганглиозидов следили, измеряя радиоактивность; за элюцией белка—по прохождению УФ-поглощения при 280 нм. Активность сиалидазы определяли флуориметрически

фермент-ганглиозид (рис. 2) [7]. Выделение и частичная характеристика таких комплексов показали [7], что они не обладали сиалидазной активностью в отношении использованных субстратов. Были подобраны условия, при которых после взаимодействия с GT1b не оставалось свободного белка ферментного препарата и, следовательно, в образовании комплексов с ганглиозидом участвовал весь белок. Таким образом, в образовании таких комплексов включается сам ферментный белок независимо от степени гомогенности препаратов фермента. Так как были использованы водные растворы GT1b с его концентрацией всегда выше 10^{-5} М, этот ганглиозид находился в них и взаимодействовал с ферментом в виде ми-

целл. С другой стороны, подобные комплексы не образовывались с углеводной, олигосахаридной частью GT1b, которая не образует мицеллы и не ингибирует фермент. Более того, цитозольная сналидаза образовывала комплексы (и инактивировалась) не только с ганглиозидами GD1a и GD1b, являющимися ее потенциальными субстратами, но также и с GM1, не гидролизующимся ферментом. Таким образом, комплексы представляют собой сочетание фермента с мицеллами ганглиозида, что ведет к полной инактивации фермента.

Величина M_r комплекса II, меньшего из двух комплексов сналидаза-GT1b, составляла около 420 кД, а комплекса I—порядка 1000 кД. Соотношение ганглиозид/белок (по массе) составляло 4:1 и 3,6:1 для комплексов II и I соответственно. Полученные данные подтверждают гипотезу о том, что комплекс II образуется при ассоциации одной мицеллы ганглиозида с двумя молекулами ферментного белка, а в комплексе I—при ассоциации двух комплексов II (по аналогии с комплексами, которые образует с ганглиозидом GM1 бычий сывороточный альбумин) [12]. Эти комплексы легко атакуются свободной цитозольной сналидазой с освобождением NeuAc, что указывает на то, что олигосахаридная часть GT1b вполне доступна и расположена на поверхности комплекса. Длительное хранение препаратов комплексов или их обработка мицеллами ганглиозидов не приводило к отделению или к замене стартовых компонентов. Поэтому такие комплексы можно рассматривать как стабильные смешанные ганглиозид-белковые мицеллы, в которых белковая часть по большей части расположена во внутреннем гидрофобном ядре, а каталитический участок или стерически экранирован, или не выходит на поверхность.

Были сделаны попытки вызвать диссоциацию комплекса сналидаза-GT1b с помощью детергентов для восстановления фермента в активной форме. Предварительные исследования показали, что из различных использованных детергентов (тритон X-100, лизолецитин, КПДМАПС, октил- β -пиранозид, холат и ДОХ-Na, таурохолевая кислота, сульфобетанин) только тритон X-100 и лизолецитин полностью восстанавливали активность цитозольной сналидазы и не влияли на нее независимо от их концентрации. Поэтому эти детергенты и использовали в дальнейших опытах.

Фермент преникубировали с GT1b в условиях, ведущих к образованию комплекса II, до полной инактивации (рис. 3). Добавление возрастающих концентраций тритона X-100 или лизолецитина в возрастающей концентрации (до 20 мМ $\approx$ 1,5%) при 2-часовой инкубации приводило к восстановлению активности фермента приблизительно на 50%, свидетельствуя об обратимом характере инактивации фермента при образовании комплекса. На основании этих данных был получен и выделен комплекс II с последующей инкубацией его с 1,5%-ным тритоном X-100 (37°, 2 ч). Как видно из рис. 4, при последующей хроматографии на колонке с ультрагелем AcA-34 белок комплекса элюировался двумя пиками, один из которых представлял свободный белок, а другой—комплекс белка с ганглиозидом; эти пики содержали соответственно 35 и 65% белка. От общего

количества белка весь ганглиозид комплекса элюировался в пике, содержащем комплекс белков без следов мицеллярного GT1b. Пик, содержащий свободный белок, по свойствам соответствовал свободной цитозольной сиалидазе, активность его составляла 45% от исходной. Пик, содержащий белок и ганглиозид, также проявлял хотя и малую, но измеримую ферментативную активность (около 5% от исходной). Все это означает, что обработка детергентом сильно действовала на комплекс II с высвобождением части захваченного фермента и образованием из ос-

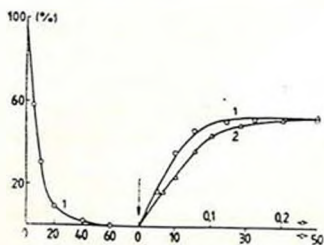


Рис. 3

Рис. 3. Обработка каталитически неактивного комплекса сиалидазы-GT1b тритоном X-100 и лизолецитином: восстановление активной формы фермента как функция концентрации детергента. Активность сиалидазы определяли флуориметрически и выражали в % от исходной (примененной для формирования комплекса)

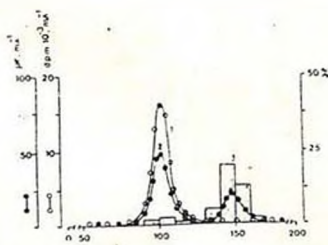


Рис. 4

Рис. 4. Эффект тритона X-100 на комплексе сиалидазы-GT1b II: получение высвобожденного и активного фермента с помощью хроматографии на колонке с ультрагелем AcA-34. Активность сиалидазы определяли флуориметрически и выражали в % от исходной активности, использованной для образования комплекса II. За элюцией ганглиозидов и белка следили, как описано в подписи к рис. 2

тавшегося белка и ганглиозидов нового комплекса, в котором активный участок фермента, по крайней мере частично, оказывался на поверхности и поэтому становился способным связывать субстрат.

Для выявления механизма образования комплексов сиалидазы-GT1b и их перестройки под влиянием детергентов, цитозольную сиалидазу преинкубировали (1 ч, 37°) со смесью GT1b и тритона X-100 в различных молярных соотношениях (смешанные мицеллы ганглиозид-детергент) и затем определяли количество МУ-NeuAc и GT1b. Как видно из рис. 5, активность фермента оказалась зависимой от состава смешанных мицелл: она не была обнаружена в случае мицелл с препакированием ганглиозидов (соотношение 0,2—0,3); мицеллы же, богатые детергентом (соотношение выше 15) проявляли полную активность. Это свидетельствует о том, что способность образовывать неактивные комплексы свойственна мицеллам ганглиозидов. Если в мицеллах, содержащих много детергента, присутствует также ганглиозид, то последний ведет себя уже не как

ингибитор, а как прекрасный субстрат для фермента. Можно предположить [13], что размер смешанных детергент-ганглиозидных мицелл уменьшается с увеличением доли детергента в них, что затрудняет связывание ими фермента с образованием комплексов. С другой стороны, в смешанных мицеллах (ганглиозид-детергент) с высоким содержанием детергента молекулы ганглиозида располагаются менее компактно, что создает более благоприятные условия для функционирования их в ка-

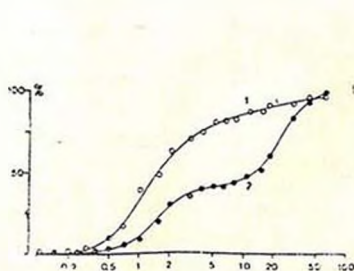


Рис. 5.

Рис. 5. Эффект 1-часовой преинкубации при 37° со смешанными тритон X-100-GT1b мицеллами (при различных молярных соотношениях) на активность цитозольной сиалидазы. Активность фермента определяли флуориметрически и колориметрически при постоянной концентрации GT1b



Рис. 6

Рис. 6. Кинетика действия цитозольной сиалидазы на гомогенные мицеллы GT1b и смешанные мицеллы тритон X-100-GT1b с различным молярным соотношением компонентов. Высвобождение NeuAc регистрировали колориметрически

честве субстрата для фермента, как это было показано на примере сиалидазы холерного вибриона [14].

На рис. 6 представлены кривые скорость/субстрат активности цитозольной сиалидазы мозга на гомогенных мицеллах GT1b и на мицеллах комплекса тритона X-100-GT1b при высоком молярном отношении. В случае мицелл, богатых детергентом (соотношение—15) взаимодействие подчинялось кинетике Михаэлиса-Ментен (классическая гипербола) в противоположность бифазной сигмоидной кривой, полученной в случае гомогенных мицелл GT1b. Более того, кажущиеся значения V_{max} в случае мицелл, богатых тритоном X-100, были значительно выше, чем в случае гомогенных мицелл GT1b. Эти данные в добавление к наблюдению [7], что связанный в комплексе GT1b может служить в качестве субстрата для свободной цитозольной сиалидазы, объясняют аномальности кинетики действия этого фермента на мицеллярный GT1b. В самом деле, при инкубации фермент образовывал комплексы GT1b-неактивные формы фермента. В то же время оставшийся несвязанным фермент мог отщеплять NeuAc из образовавшегося комплекса GT1b-фермент. Поэтому высвобождение NeuAc не зависело ни от количества фермента, ни от исходной концентрации ганглиозида, а только от количества «свобод-

ного» фермента и образовавшегося комплекса GT1b-фермент. В случае смешанных мицелл с преобладающим содержанием детергента выявляется лишь взаимодействие с активным участком фермента, и образование фермент-субстратного комплекса протекает по классической кинетике Михаэлиса-Ментен. Таким образом, проведенные исследования иллюстрируют новый аспект связывающих свойств ганглиозидов—инактивирование фермента (цитозольной салидазы мозга) после связывания ганглиозидных мицелл. Диссоциация или перестройка таких мицелл приводит к полному восстановлению активности фермента. Важность этого феномена для оценки вклада ганглиозидов в функции плазматических мембран становится очевидной при рассмотрении образования ганглиозидных кластеров в мембране как обратимого и регулируемого явления. Условия, способствующие образованию кластера, могут вызывать сопутствующий захват белка в мицеллоподобном микродомене кластера, и наоборот, при диссоциации кластера «демаскируется» захваченный белок. Захват и высвобождение белка в богатом ганглиозидами окружении может приводить к обратимым изменениям в конформации белка, что, по-видимому, служит потенциальным обратимым механизмом активации-инактивации белка. Исследования в этом направлении уже ведутся.

ENZYME—GANGLIOSIDE INTERACTIONS IN THE BRAIN: THE EXAMPLE OF CYTOSOLIC SIALIDASE

TETTAMANTI G., FIORILLI A., VENERANDO B.

Department of Medical Chemistry and Biochemistry, The Medical School,
University of Milan, Milan, Italy

Cytosolic sialidase from pig brain interacts with micellar gangliosides (for instance GT1b) giving rise to two stable protein-ganglioside complexes of different molecular weight. The complex of lower molecular weight is a combination of one ganglioside micelle and two enzyme molecules; the complex of higher molecular weight is likely a dimer of the former complex. The complexlinked enzyme is catalytically inactive. Treatment of the low molecular weight complex with detergents, like Triton X-100 and lysolecithin causes dramatic modifications of the complex structure, resulting in liberation of part of the enzyme in a fully active form, and in rearrangement of the remainder complex, which acquires some enzymatic activity. The ability to form complexes with resulting enzyme inactivation is possessed by homogeneous micelles of ganglioside; mixed Triton X-100—ganglioside micelles, with a high detergent content, do not form complexes with the enzyme and behave as excellent substrates for the enzyme. Reversible inactivation of protein by interaction with ganglioside micelles is discussed as a potential modulatory mechanism of membrane-bound active proteins concomitantly to the formation or dissolution of ganglioside clusters at the plasma membrane level.

1. *Wiegandt H.* — In: *New Comprehensive Biochemistry* (eds. A. Neuberger, L. L. M. Van Deenen), v. 10, p. 199—260, Elsevier, Amsterdam, 1985.
2. *Sharom F. J., Grant C. W. M.* *Biochim. et. biophys. acta*, v. 507, p. 280—293, 1978.
3. *Masserini M., Freire F.* *Biochemistry*, v. 25, p. 1043—1049, 1986.
4. *Brady R. O., Fishman P. H.* *Adv. Enzymol.*, v. 50, p. 303—323, 1979.
5. *Venerando B., Tettamanti G., Cestaro B., Zambotti V.* *Biochim. et biophys. acta*, v. 493, p. 461—472, 1975.
6. *Svennerholm L.* — In: *Handbook of Neurochemistry* (ed. A. Lajtha.), v. 111, p. 425—452, Plenum Press, N. Y. 1970.
7. *Venerando B., Fiorilli A., Masserini M., Giuliani A., Tettamanti G.* *Biochim. et. biophys. acta*, v. 833, p. 82—92, 1985.
8. *Corti M., Degiorgio V., Ghidoni R., Sonnino S., Tettamanti G.* *Chem. Phys. Lipids*, v. 26, p. 225—238, 1980.
9. *Ghidoni R., Sonnino S., Masserini M., Orlando P., Tettamanti G.* *J. Lipid Res.*, v. 22, p. 1286—1295, 1981.
10. *Svennerholm L.* *Biochim. et. biophys. acta*, v. 24, p. 604—611, 1957.
11. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265—275, 1951.
12. *Tomas M., Roda L. G., Ausiello C., D'Agno G., Venerando B., Ghidoni R., Sonnino S., Tettamanti G.* *Eur. J. Biochem.*, v. 111, p. 315—324, 1980.
13. *Corti M., Degiorgio V., Sonnino S., Ghidoni R., Masserini M., Tettamanti G.* *Chem. Phys. Lipids*, v. 28, p. 197—214, 1981.
14. *Venerando B., Cestaro B., Fiorilli A., Ghidoni R., Preti A., Tettamanti G.* *Biochem. J.*, v. 203, p. 735—742, 1982.

Поступила 9. IX 1986

УДК 577.112

СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ГЛИКОПРОТЕИНЫ ГИПОТАЛАМУСА

СРАПИОНИЯ Р. М.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Из гипоталамической области мозга получены в электрофоретически гомогенном виде четыре гликопротеина. Три из них (M_r 39, 24 и 20 кД) являются носителями ранее обнаруженных кардиотропных нейрогормонов «К», «Г», «С», образуя с ними соответственно нековалентно связанные комплексы. Исследование основных физико-химических свойств и некоторых структурно-функциональных особенностей указанных гликопротеинов позволяет заключить о существовании новых специфических для нервной ткани гликопротеинов, а использование метода радиационно-иммунологического анализа — однозначно утверждать о наличии в мозгу группы кардиактивных белок-гормональных комплексов.

В последнее десятилетие в нейробиологии наблюдается тенденция рассматривать сложные интегративные функции НС с помощью системного подхода, включающего в себя основные положения молекулярной

биологии. В этой связи следует отметить, прежде всего, всестороннее изучение нейроспецифических белков и их функциональных превращений. Однако, несмотря на экспоненциальный рост числа работ, посвященных этим важнейшим биополимерам, в литературе отсутствуют конкретные и обоснованные положения об их физиологической роли в осуществлении специфических функций. Интегративные процессы в головном мозгу столь многогранны, что ограничить участие в них лишь уже известных нейроспецифических белков, по-видимому, невозможно. В этом отношении поиск неидентифицированных еще белков, связанных с определенными функциями и структурами мозга, весьма оправдан и является одной из актуальных задач нейробиологии.

Со времени выделения в 1964 г. Галояном [1] из гипоталамической области мозга специфического белка, обладающего коронарорасширяющей активностью, и, по мнению автора, являющегося носителем кардиотропных нейрогормонов «К» и «С» [2], прошло более 20 лет. За этот период обнаружены еще три белка, разработаны модифицированные схемы выделения и очистки последних, объединяющие уже ставшими традиционными методы гель-фильтрации через сефадексы, ИОХ на ДЭАЭ-ц, изоэлектрофокусирование в градиенте амфолинов и электрофореза в ПААГ, позволяющие получать дифференцированно в электрофоретически гомогенном виде четыре кардиоактивных белка [3, 4]. Три из них находятся в комплексе с нейрогормонами «К», «С», «Г», а четвертый—с еще неидентифицированным соединением (X). Соответственно, по принципу родства с нейрогормонами, эти белок-гормональные комплексы обозначены как «БНК», «БНС», «БНГ» и «БНХ». Их суммарный выход из ткани гипоталамуса составляет 12 мг/кг сырой массы. Наименьшим содержанием в гипоталамусе отличается «БНХ»—около 1,2 мг/кг, при этом оно варьирует в зависимости от условий экстракции. С понижением температуры выход «БНХ» резко уменьшается, с применением же неионных детергентов выход повышается. Это позволяет рассматривать «БНХ» как специфическую мембраносвязанную форму кардиоактивных белков.

Связь между нейрогормонами и белками достаточно слаба и, по-видимому, имеет гидрофобный характер; она разрушается при кислых значениях рН (ниже 3) и температуре, равной -20° и $+65^{\circ}$. Подобная связь при физиологических значениях рН и обеспечивает структурное интегрирование. Диссоциация же комплекса после его выхода в кровь дает возможность целенаправленного транспорта гормонов в различные висцеральные органы. В литературе описаны аналогичные примеры, демонстративными из которых являются нейрофизины. Это семья родственных белков, основная функция которых—транспортная [5, 6]. Нейрофизины являются носителями нейрогипофизарных гормонов—вазопрессина и окситоцина, с которыми они находятся в нековалентно связанном комплексе. Широко распространено мнение о том, что такое связывание является результатом компартиментализации во время биосинтеза нейрогипофизарных гормонов и нейрофизинов [7].

Коронароактивные белок-гормональные комплексы были выделены нами из гипоталамусов ряда животных (крыса, кролик, кошка, свинья, овца, крупный рогатый скот) [8]. Лучшей экспериментальной моделью среди таких комплексов являлись препараты, полученные из гипоталамусов крыс, их коронарорасширяющая эффективность гораздо выше по сравнению с другими. Однако ввиду их малого содержания и с целью получения в препаративных количествах в работе использовали гипоталамус крупного рогатого скота.

Исследование ряда физико-химических свойств выделенных из комплекса белков, лишенных коронароактивности (так называемых апоформ), позволяет отнести их к группе слабокислых с величинами M_r , равными для «БНС», «БНГ» и «БНК», по данным электрофореза в ПААГ с ДДС-Na—20, 24 и 39 кД соответственно. Их изоточки также находились в узком диапазоне рН, присущем слабокислым соединениям (5,9—6,3). Данные об аминокислотном составе этих белков подтвердили их слабокислый характер: количество в них основных и кислых аминокислотных остатков оказалось примерно одинаковым. Из полярных аминокислот во всех исследованных белках доминировали остатки серина, глицина, аланина, глутаминовой кислоты, в сумме составлявшие 43—50%. Обращает на себя внимание отсутствие в «БНС» и незначительное содержание в «БНК» ароматических аминокислот. Величины M_r , рассчитанные по данным аминокислотного анализа, оказались, в основном, ниже по сравнению с данными электрофореза в ПААГ с ДДС-Na. Такую разноречивость мы объясняли частично наличием небелковых компонентов в молекулах исследуемых соединений. Окрашивание электрофореграмм этих белков после электрофореза в ПААГ специфическими реагентами, обнаруживающими нуклеотиды, липиды и углеводы, так же, как и биохимические определения, выявили наличие лишь углеводных компонентов.

В дальнейших исследованиях с помощью современного арсенала приемов для расщепления гликозидных связей, в частности метанолиза и последующего анализа триметилсилильных производных, была сделана попытка расшифровать моносакхаридный состав углеводного компонента. При этом были обнаружены из аминокислот—N-ацетилглюкозамин, N-ацетилгалактозамин, из нейтральных сахаров—манноза и галактоза, была также найдена сиаловая кислота. В общем, входящие в кардиоактивные комплексы белки можно отнести к типу N-гликозидосвязанных, маннозосодержащих гликопротеинов.

Своеобразие аминокислотного состава и наличие углеводного компонента обусловили нетипичный для белков УФ-спектр. Особенно это касается «БНС», характеризующегося слабым поглощением и не обнаруживающего максимума в области 270—280 нм. Спектры «БНГ» и «БНК» характеризовались максимумом поглощения при 270 нм, но сравнивая величины их оптической плотности и величины M_r , можно допустить, что в «БНК» триптофановых остатков содержится на моль вдвое больше, чем в «БНГ».

Итак, молекулы этих белков различаются по некоторым физическим

свойствам, что обусловлено различиями в их структурной организации. В частности, конформация «БНС» резко отличается от конформации других двух белков. Его спектр КД характерен для белковой молекулы с высоким содержанием неупорядоченной структуры, незначительным содержанием β -структуры и почти полным отсутствием α -спиральности. Содержание последней в «БНГ» и «БНК» примерно одинаково, однако доля неупорядоченного клубка выше в «БНК», что свидетельствует о более плотной упаковке ее молекулы.

Получение высокоспецифических (процент перекрестных реакций не превышает 0.1) антисывороток к бычьим «БНС», «БНГ» и «БНК» позволило альтернативно объяснить существование семьи родственных коронароактивных белок-гормональных комплексов. Помимо высокой специфичности эти антисыворотки характеризовались достаточной чувствительностью и позволяли уверенно определить до одного нг белка в пробе. Пригодность иммунных сывороток для радиоиммунологического определения содержания оценивалась по их способности конкурировать с соответствующим ^{125}I -белком за связывание со специфической антисывороткой [9]. Используя реакцию связывания комплемента, удалось установить специфичность кардиоактивных белок-гормональных комплексов для нервной ткани, поскольку их содержание в ней, по крайней мере, в тысячу раз превышает содержание в любом другом органе. Однако в разных отделах головного мозга они распределены неравномерно: высоким содержанием (мкг/г сырой массы) «БНС» и «БНГ», кроме гипоталамуса (1.5 и 1.4), отличаются мозжечок и кора больших полушарий мозга (0.8 и 1.0 соответственно). «БНК» же распределяется более равномерно; это не объясняется присутствием крови, так как, во-первых, у перфузированных животных выявлена аналогичная картина, а во-вторых, при пересчете на один мг белка содержание «БНК» в сыворотке крови существенно ниже, чем в мозгу.

Сопоставление величин иммунореактивности кардиоактивных комплексов в висцеральных органах свидетельствует об их выраженной органоспецифичности. Так, «БНС» в значительных количествах (в нг/г сырой массы) обнаруживается в сердечной (0.40) и скелетной (0.41) мышцах и надпочечниках (0.43), «БНГ» — в надпочечниках (0.38) и в панкреатической железе (0.30), а «БНК» — в печени (0.80). В остальных висцеральных органах (селезенке, легких, почках) активность была очень низкой, либо отсутствовала. Достаточное количество (в нг/мл) этих биополимеров обнаруживалось в сыворотке крови: «БНГ» — 25, «БНК» — 13, «БНС» — 10.

При интерпретации обнаружения иммунореактивных кардиоактивных комплексов гипоталамуса в нервных структурах мы допускаем несколько предположений. С одной стороны, возможно наличие в последних веществ, близких к обнаруженным в нервной ткани. С другой стороны, не исключена возможность наличия в этих органах нейронов типа ARUD, способных к синтезу соединений, идентичных белок-гормональным комплексам нервного происхождения.

Можно допустить, что, подобно белку S-100, обнаруженному в эпифизе, аденогипофизе и надпочечниках [10], нейроспецифической енолазе, выделенной из островковых клеток поджелудочной железы, С-клеток тиреоидной железы и хромоаффинных клеток надпочечников [11], или нейрофизинам, обнаруженным в эпифизе [12], кардиоактивные гликопротеины являются скорее маркерами определенного типа клеток нейроэктодермального происхождения.

И наконец, не исключается возможность выхода этих комплексов, аналогично нейрофизинам, в общую циркуляцию при условиях, стимулирующих выброс кардиотропных нейрогормонов «К», «С» и «Г». В пользу этого предположения свидетельствуют данные о наличии кардиоактивных белок-гормональных комплексов в нейросекреторных гранулах гипоталамо-нейрогипофизарной системы различных животных [13], весьма близких к «БНС», «БНГ» и «БНК», выделенных из целых гипоталамусов тех же видов.

Сравнение данных, полученных при изучении субклеточного распределения белок-гормональных комплексов в гипоталамусе, показало, что, за исключением синапсомной, в остальных исследованных субфракциях (ядерной, миелиновой, митохондриальной) они не были обнаружены [14].

Белковый спектр синапсомом отличается сложной гетерогенностью; в них было обнаружено более 20 белков, в том числе и гликопротеины с величиной M_r от 16 до 125 кД. Среди них выявлены нейроспецифические белки S-100 и 14-3-2 [15, 16], ряд гормонов (люлиберин, тиреолиберин, норadreналин) [17]. В последние годы появилось множество сообщений, в которых были сделаны попытки связать преимущественную локализацию нейроспецифических белков в синапсоме с участием этих белков в специфических функциях нервной ткани.

О функциях кардиоактивных гликопротеинов можно высказать следующее: прежде всего, они являются интрацеллюлярными транспортными молекулами. Это функциональное их значение давно уже установлено [1, 2] и доказана идентичность выделенных из комплексов низкомолекулярных кардиоактивных соединений по многим параметрам с кардиотропными нейрогормонами «К», «С» и «Г» [18]. Кроме того, мы попытались также связать преимущественную локализацию этих гликопротеинов в синапсомной фракции с процессами, происходящими в нервной ткани, в частности, на основании данных об участии выделенных из этих комплексов кардиоактивных нейрогормонов в пресинаптической регуляции высвобождения катехоламинов в гипоталамусе. И наконец, заслуживает особого внимания для выяснения функциональной роли исследуемых гликопротеинов обнаружение факта их существования в виде препрогормональной формы кардиотропных нейрогормонов [19, 20]. Доказательством явилось выделение в результате протеолиза специфических гликопротеинов шести кардиоактивных триптических доменов, явившихся, в свою очередь, прогормональными формами кардиотропных нейрогормонов «К», «С» и «Г». Обнаруженные домены являются гликопептидами с различной величиной M_r (от 6 до 10 кД); основные физико-химические,

биохимические и биологические свойства которых имели большое сходство с указанными нейрогормонами. Систематизация экспериментальных фактов позволила однозначно установить, что указанные гликопептиды являются предшественниками, кроме коронароактивных, ряда других биоактивных соединений (регулирующих внутриклеточный уровень содержания циклических нуклеотидов, участвующих в процессе гликолиза, гликогенолиза и пресинаптической регуляции высвобождения катехоламинов в гипоталамусе).

Поиск альтернативного объяснения биохимических превращений, предшествующих расслаблению гладкой мышцы коронарных сосудов под действием кардиоактивных гликопептидов, начинали с изучения активности фосфодиэстеразы сАМР мозга, исходя из ингибирующего действия этого фермента действия как ряда сердечных лекарственных препаратов, так и кардиотропного нейрогормона «С» [21]. Из триптических доменов специфических гликопротенинов, как оказалось, три ингибировали активность ФДЭ сАМР в достаточной степени (от 40 до 57%), остальные кардиоактивные домены никакого действия не оказывали [22]. Итак, под действием таких гликопептидов должно происходить накопление сАМР, этого уникального посредника, принимающего участие во многих биохимических превращениях, в том числе и в процессе гликогенолиза, в котором он участвует в активации гликоген-фосфорилазы и последующего перехода фосфорилазы α в β -форму. Аналогично действует и нейрогормон «С» [23]. Это послужило предпосылкой для проведения исследований по изучению изменений активности фосфорилазы под действием кардиоактивных доменов. Сопоставление полученных данных позволило заключить, что, в общем, они повышают активность фермента во всех органах, но особенно существенно в мозгу, сердечной и скелетной мышцах. При этом нельзя исключить органоспецифическое действие каждого из них. Триптический фрагмент «БНС», обозначенный как ТфБНС, интенсивно активирует сердечную фосфорилазу (на 170%), ТфБНГ—фосфорилазу скелетной мышцы (на 150%), а ТфБНК—мозговую фосфорилазу (на 100%). Поскольку из изученных форм фосфорилазы, как было установлено, повышалась активность фосфорилазы α , то можно допустить, что имело место классическое фосфорилирование с переходом формы α в β [22]. Можно полагать, что в критических ситуациях, вызываемых либо чрезмерными энергетическими затратами нервной ткани, либо, наоборот, недостаточным запасом в ней энергетических средств (ограниченного притока глюкозы или кислорода), они могут способствовать активации этого перехода.

Известно образование многих нейропептидов в результате ограниченного протеолиза физиологически неактивного предшественника [24]. Многочисленные примеры этого целесообразного принципа экономии в природе может представить ЦНС высших животных. Наиболее уникальным среди этих примеров является образование из проопиомеланокортина целой группы важнейших нейроактивных пептидов с различными физиологическими эффектами [25].

Исходя из всего сказанного, можно заключить, что кардиоактивные гликопротеины, безусловно, могут быть включены в особый класс предшественников. Класс этот, по общепринятому мнению, объединяет молекулы, «основной ролью которых является осуществление и регуляция функционального взаимодействия разных уровней системной и биологической организации» [26].

SPECIFIC PROTEINS OF HYPOTHALAMUS

SRAPIONIAN R. M.

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

Four glycoproteins have been isolated in electrophoretically homogeneous state from bovine hypothalamus: three of them with M_r 39,24 and 20 D turned to be the carriers of the earlier discovered cardiotropic, neurohormones „K“, „G“ and „C“ forming with the latter non-covalent complexes. Study of physico-chemical properties and structure-function relationships as well as RIA analysis of these glycoproteins makes it possible to claim existence of a new class of brain-specific glycoproteins—a family of cardioactive protein-hormonal complexes.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Галоян А. А., Докл. АН АрмССР, т. 38, с. 305—307, 1964.
2. Галоян А. А., Срапионян Р. М. Биол. журн. Армении, т. 20, с. 3—8, 1967.
3. Срапионян Р. М., Саакян С. А., Галоян А. А. Вопр. биохимии мозга, т. 11, с. 97—103, Ереван, АрмССР, 1976.
4. Срапионян Р. М., Саакян С. А., Саакян Д. М., Галоян А. А. Вопр. биохимии мозга, т. 13, с. 67—78, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1978.
5. Alvarez-Baylla R., Livett B., Uttenthal L., Hope D. B. Z. Zellforsch., v. 137, p. 435—450, 1973.
6. Sinding C., Robinson A. Metabolism, v. 26, p. 1355—1370, 1977.
7. Carlson J. D., Breslow E. Biochemistry, v. 20, p. 5062—5072, 1981.
8. Galoyan A., Srapiotian R. Neurochem. Res., v. 8, p. 1511—1532, 1983.
9. Срапионян Р. М., Абелян Ж. Г., Галоян А. А. Вопр. мед. химии, т. 31, с. 20—24, 1985.
10. Rende M., Zucco M., Cocchia D., Michetti F. —In: 8-th Meet. Intern. Soc. Neurochem., p. 70, Nottingham, Abstracts, 1981.
11. Schmechel D. E. Nature, v. 276, p. 834—836, 1978.
12. Vinores S. A., Marangos P. J. J. Neurochem., v. 39, p. 1748—1750, 1982.
13. Galoyan A., Srapiotian R., Sahakian F. Reprint form Neurosecretion Neuroendocrine Activity Evolution and Function, p. 190—193, Springer—Vorlag, Berlin, 1987.
14. Srapiotian R., Sahakian F., Galoyan A. Neurochem. Res., v. 6, p. 1259—1307, 1981.
15. Haglid K. G., Hamberger A., Hanson H. A., Hyden H., Persson L. Nature, v. 252, p. 532—534, 1974.
16. Grasso A. Exptl. Brain Res., v. 23, suppl. 79, 1975.
17. Parker C. R. Endocrinology, v. 102, p. 1167—1171, 1978.
18. Галоян А. А., Срапионян Р. М., Алексоян Р. А. Докл. АН АрмССР, т. 51, с. 125—128, 1970.

19. Срапионян Р. М., Саакян С. А., Галоян А. А. Нейрохимия, т. 2, с. 263—271, 1983.
20. Саакян С. А., Срапионян Р. М., Спакян Д. М., Попова Т. В., Галоян А. А. Нейрохимия, т. 3, с. 12—20, 1984.
21. Галоян А. А. Вopr. биохимии мозга, т. 13, с. 9—38, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1978.
22. Срапионян Р. М., Саакян С. А., Абелян Ж. Г., Галоян А. А. Нейрохимия, т. 1, с. 36—42, 1982.
23. Галоян А. А., Абелян Ж. Г., Александян С. С., Бархударян Н. А. Докл. АН АрмССР, т. 60, с. 117—120, 1975.
24. Seidah N. G., Chretien M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci., v. 78, p. 4236—4240, 1981.
25. Seidah N. G., Rochemont J., Hamrin J., Lis M., Chretien M. J. Biol. Chem., v. 256, p. 7977—7984, 1981.
26. Шерстнев В. В., Полстакс А. Б., Долнов О. Н. Успехи физиол. наук, т. 3, с. 66—86, 1979.

Поступила 10. IX 1985

УДК 612.82+577.152.344

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ВЕЩЕСТВА Р И АНГИОТЕНЗИНПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА

СИМС В. Э., ХЕДЕР Г., ЭМЕ Н.

Институт по исследованию лекарственных препаратов АН ГДР, Берлин

В течение последних лет появилось много данных о взаимодействиях вещества Р и ангиотензинпревращающего фермента (АТФФ) (КФ 3.4.15.1): ингибирование АТФФ с помощью вещества Р, деградация вещества Р посредством АТФФ и некоторые дополнительные результаты экспериментов *in vivo*. АТФФ—относительно неспецифическая дипептидилпептидгидролаза, отщепляющая от пептидной цепи С-концевой дипептид. Наиболее важными субстратами для нее являются вазоактивные пептиды—ангиотензин I и брадикинин.

Реакции между веществом Р и АТФФ несколько противоречат существующим концепциям о строении каталитического центра АТФФ. Согласно Cushman, Ondetti и Petrillo [1—3], ингибиторы АТФФ должны соответствовать следующим структурным критериям: содержать Zn^{2+} -связывающую группу; два гидрофобных участка, реагирующих с соответствующими гидрофобными карманами фермента (S_1 и S_2); водородную связь между двумя гидрофобными участками; С-концевую отрицательно заряженную группу (COO^-), взаимодействующую с катионным остатком аргинина фермента; расстояние между Zn^{2+} -связывающей группой и $COOH$ -группой должно соответствовать длине дипептидной цепочки.

Субстраты АТФФ (как минимум трипептиды) в их С-концевой части должны обладать такими же структурными особенностями. Кроме того, предпоследняя пептидная связь не должна быть замещена. Скорость гидролиза субстрата более всего зависит от боковых цепей пептида, особенно в его С-концевом отрезке [4].

Поскольку вещество Р является амидом, оно не должно было бы служить хорошим субстратом или ингибитором АТФФ. Более того, С-концевая аминокислотная последовательность вещества Р (Gly-Leu-MeI) не является благоприятной для взаимодействия с АТФФ. Несмотря на эти неблагоприятные условия, такие реакции между ними, как катаболизм вещества Р и торможение АТФФ в последние 6 лет были неоднократно описаны.

Взаимодействия между веществом Р и АТФФ могут вызывать интерес и в медицинском отношении, так как оба эти вещества участвуют во многих физиологических функциях, в том числе в регуляции кровяного давления [5—7], что дополнительно подчеркивает сложность систем регуляции последнего. Эти неожиданные реакции между веществом Р и АТФФ привлекли наше внимание главным образом в структурно-молекулярном отношении с целью новых ингибиторов АТФФ.

Материалы и методы

Вещество Р и его фрагменты, а также трипептид Нур-His-Leu были синтезированы в Отделе синтеза лекарственных препаратов (ГДР).

Активность АТФФ определяли флуориметрически микромодификацией метода Friedland, Silverstein [8,9]; субстратом служил Нур-His-Leu. Реакцию проводили в хлорид-фосфатном буфере, pH 8,3. Образующий дипептид His-Leu определяли флуориметрически с помощью реакции с офтальмидальдегидом при 355 nm (использовали препарат His-Leu для стандартизации фирмы „Serva“, ФРГ).

АТФФ выделяли из легких свиней по методу, близкому к методам Oshima и соавт. [10], Das, Soffer [11] и Lanzillo, Garburg [12]. Гомогенизированную ткань солюбилизировали ДОХ-На и наносили на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой, затем элюировали 0,02 M Na-фосфатным буфером (pH 8,3) и градиентом KCl (0—0,2 M). Полученные фракции разделяли на колонке с гидроксипатитом с элюцией фосфатным градиентом (0,01—0,05 M, pH 8,3) с последующей гель-фильтрацией на сефадексе G-200. Очищенный препарат имел величину У. А. 80000 нмоль His-Leu/мин/мл и давал одну полосу при гель-электрофорезе в ПААГ в присутствии ДДС-Na. В случае частично очищенного препарата исключалась стадия очистки на гидроксипатите. Такой препарат, помимо АТФФ, содержал примесь некоторых других ферментов, в частности с активностями, близкими к активности дипептид-аминопептидазы IV.

Идентификация гидролитических продуктов вещества Р с помощью ВЭЖХ. Инкубацию АТФФ с веществом Р проводили при 37° в течение 3,7 и 27 ч в 2 мл хлорид-фосфатного буфера, pH 8,3, содержавшем 0,5 мМ вещества Р и 1 мл раствора очищенного фермента. Реакцию останавливали нагреванием аликвот 5 мин при 95°. Продукты гидролиза идентифицировали с помощью ВЭЖХ в обратной фазе на колонке Lichrosorb RP-8 (250×4,6 мм, 10 мкм). После нанесения 100 мкМ пробы пептиды 40 мин элюировали градиентной элюцией следующими растворителями: А—10%-ным ацетонитрилом, 90%-ным 0,01 M NaH_2PO_4 и 0,15 M NaClO_4 (pH 2,2); В—70%-ным ацетонитрилом, 30%-ным 0,01 M NaH_2PO_4 и 0,5 M NaClO_4 (pH 2,2). Поглощение при 215 nm регистрировали с помощью УФ-детектора при комнатной температуре.

Радиоиммунный анализ. Определение вещества Р с помощью радиоиммунного анализа проводили по методу Rathsack и соавт. [13]: 0,5—50 мкМ вещества Р инкубировали 1 или 3 ч с очищенным препаратом АТПФ (190 нг/100 мкл) в хлорид-фосфатном буфере, рН 8,3. Реакцию останавливали нагреванием аликвот 5 мин при 55°.

Результаты и обсуждение

По нашему мнению, результаты экспериментов с торможением АТПФ необходимо разделить на полученные с использованием чистых и лишь частично очищенных препаратов АТПФ в связи с возможной примесью в последних других веществ Р-расщепляющих ферментов. Эти ферменты могут приводить к образованию фрагментов вещества Р с АТПФ-ингибирующими свойствами и тем самым усиливать тормозящий эффект вещества Р на АТПФ.

В наших исследованиях было установлено повышение величины IC_{50} для вещества Р, то есть снижение его тормозящего эффекта с увеличением степени очистки АТПФ (табл. 1). В сопоставимых условиях было обнаружено ингибирующее действие также и фрагментов вещества Р. С-концевой фрагмент вещества P_{5-11} не тормозил АТПФ, тогда как N-концевые фрагменты вещества P_{1-1} и вещества P_{3-4} тормозили АТПФ в той же мере, что и вещества P_{1-11} . Это свидетельствует о существенном вкладе этих N-концевых фрагментов вещества Р в его ингибирующее действие на нативный АТПФ; фрагменты вещества P_{1-4} и вещества P_{3-4} могут с легкостью образовываться при действии неочищенных препаратов фермента. На рис. 1 представлены некоторые возможные пути ферментативного образования N-концевых фрагментов вещества Р.

Литературные данные по ингибирующему действию вещества Р на активность АТПФ очень расходятся [14—20]. В большинстве случаев сообщали о высоких значениях IC_{50} и K_i для амидированного вещества Р и, как этого ожидали, данные величины оказались значительно ниже для неамидированного вещества Р. Значения же IC_{50} , приведенные в ра-

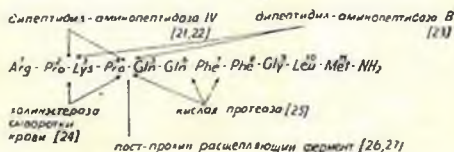


Рис. 1. Возможные пути ферментативного гидролиза N-концевого участка вещества Р.

боте Верма и соавт. [15, 16], совершенно неожиданны и до сих пор не получили подтверждения.

Главный вопрос в настоящее время состоит в следующем: можно ли данные по ингибированию АТПФ с помощью вещества Р, полученные

Таблица 1

Подавление ангиотензинпревращающего фермента (АПФ)
веществом Р и его фрагментами

Вещество Р	1 Arg — Pro —	2 Lys —	3 Pro —	4 Gln —	5 Gln —	6 Phe —	7 Phe —	8 Gly —	9 Leu —	10 Met — NH ₂	11
	нативная АПФ (сыво- ротка крови человека)		частично очи- щенная ACE (легкие свиньи)		очищенная АПФ (легкие свиньи)		источник АПФ				
Вещество Р1-11 (амид)	31		95		150						
	50		9,1		1,25		мозг крысы [14], легкие собаки [15,16]				
					40		мозг крысы [17]				
					260		легкие кролика [18]				
					290 (метидовый эфир)						
					32 (свободная кислота)		почки человека [19]				
					25						
Фрагменты вещества Р					2 (свободная кислота)		почки свиньи [20]				
					74						
	1-4 29		—		33						
	5-11 ≥100		≥100		≥100						
	1-2 (Arg-Pro) 100		—		≥100						
	2-4 (Lys-Pro) 20		—		15						

in vitro, экстраполировать на условия *in vivo*, то есть имеет ли значение этот феномен для регуляции кровяного давления. Ведет ли ингибирование АТПФ к значительному подавлению распада ангиотензина I и брадикинина в организме? В 1983 г. Ryan широко обсуждал аналогичный вопрос значимости установленных *in vitro* величин торможения протеаз для условий *in vivo*. На основе простых кинетических соображений он подтвердил, что для существенного ингибирования какого-либо фермента *in vivo* концентрация его ингибитора должна значительно превышать величину K_i . Это означает, что в случае вещества Р и продуктов его распада их концентрации в организме должны быть значительно больше, чем 20—200 мкМ. Концентрация же вещества Р в периферических органах существенно ниже, а максимальная концентрация вещества Р в мозгу, в черной субстанции составляет всего 15 мкМ/кг [7]. Мало вероятно, чтобы в такой концентрации в ткани мозга вещество Р могло влиять на активность АТПФ и соответственно на кровяное давление. Как было уже сказано, субстраты АТПФ по своей структуре должны быть близкими к ингибиторам этого фермента. Поскольку же С-конец вещества Р амидирован, оно должно быть весьма неподходящим субстратом для АТПФ, тем более, что С-концевая аминокислотная последовательность также не особенно подходит для реакции с АТПФ. Тем не менее, результаты ряда исследований свидетельствуют, что вещество Р гидролизуетсЯ при инкубации с АТПФ (табл. 2).

Наши исследования подтверждают эти данные. Деградация вещества Р вначале была количественно установлена с помощью радиоиммунного анализа и была вычислена величина K_m , составлявшая 33 мкМ; это совпадает с данными Skidgel и соавт. [19], согласно которым $K_m = 25$ мкМ. Затем продукты деградации вещества Р были идентифицированы с помощью ВЭЖХ (рис. 2). Было подтверждено, что главным начальным этапом деградации вещества Р являлся гидролиз связи Phe-Gly с образованием трипептида Gly-Leu-Met-NH₂. Кроме того, в результате гидролиза связи Gly-Leu в очень малом количестве образуется и дипептид Leu-Met-NH₂. Затем, вслед за отщеплением С-концевого трипептида, последовательно отделяются два дипептида — Phe-Phe и Gln-Gln. Но даже после длительной инкубации с АТПФ можно было обнаружить оставшийся неразложившимся тетрапептид Arg-Pro-Lys-Pro (вещество Р₁₋₄). Каптоприл в концентрации 1 мкМ полностью подавлял гидролиз вещества Р с помощью АТПФ.

Другой путь образования С-концевых трипептидов под действием АТПФ был описан Inokuchi, Nagamatsu [31] и Neels и соавт. [32] в случае субстратов с модифицированными пептидными связями между аминокислотными остатками в положении 2 и 3. Это свидетельствует о том, что в случае определенных субстратов АТПФ может проявлять эндопептидную активность. С другой стороны, образование С-концевого тетрапептида под влиянием АТПФ, как предложили Yokosawa и соавт. [29], не нашло подтверждения. По данным Skidgel и соавт. [19] и Erdős, Skidgel [33], вещество Р со свободной COOH-группой гидро-

Таблица 2

Катаболизм вещества Р (вР) при действии ангиотензинпревращающего фермента (АПФ)

Источник АСЕ	Метод определения Р	Основные продукты распада	Ингибиторы реакции	Концентрация АСЕ в иг/100мл	Концентрация вР в мкМ
Чистый фермент (мозг крысы) [29]	а) флуориметрически	$\text{вР}_1-6 \rightarrow \text{Gly-Leu-Met-NH}_2$			
	б) ВЭЖХ	$\text{вР}_1-7 \rightarrow \text{Phe-Gly-Leu-Met-NH}_2$	каптоприл	33	50
Чистый фермент (легкие кролика) [18]	а) биотест по секреции слюны	$\text{вР}_1-8 \rightarrow \text{Gly-Leu-Met-NH}_2$	каптоприл МК 422	4400*	800
	б) ВЭЖХ	$\text{вР}_1-9 \rightarrow \text{Leu-Met-NH}_2$	ЭДТА		
Чистый фермент (почки человека) [19]	а) биотест по реакции кишки морской свинки	$\text{вР}_1-8 \rightarrow \text{Gly-Leu-Met-NH}_2$	каптоприл	54	100
	б) ВЭЖХ				
Чистый фермент (легкие крысы) [30]	а) флуориметрически	$\text{вР}_1-8 \rightarrow \text{Gly-Leu-Met-NH}_2$	каптоприл МК 421	10-20	50
	б) ВЭЖХ		ЭДТА		

Примечание. * — вычисленная величина.

лизуетсЯ АТФФ в 7 раз быстрее, чем вещество Р-амид. Эти авторы постулировали слабое взаимодействие способного поляризоваться карбонилла первой пептидной связи с катионной группой остатка аргинина в каталитическом центре АТФФ. Несомненно, что реактивность COO^- -иона в неамидированном веществе Р намного сильнее, в связи с чем K_m и K_1/IC_{50} намного ниже, чем для вещества Р-амида или сложных эфиров (рис. 3).

Биологическая значимость неожиданвшегося гидролиза вещества Р при действии АТФФ до сих пор еще не ясна. Некоторые авторы сделали

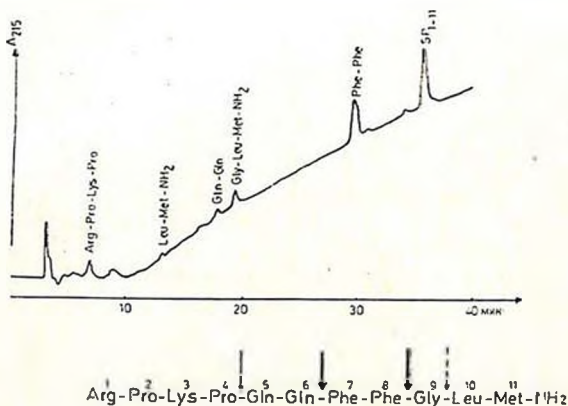


Рис. 2. Применение при исследовании вещества Р под влиянием ангиотензинпревращающего фермента ВЭЖХ; время инкубации 20 ч при 37°

недавно попытку пролить свет на этот вопрос. Так, Bunnell и соавт. [34] количественно охарактеризовали расщепление вещества Р при действии различных мембраносвязанных пептидаз неочищенного экстракта желудка свиньи. Вклад отдельных ферментов устанавливали применением их специфических ингибиторов. Было показано, что АТФФ не играет существенной роли в катаболизме вещества Р (ингибирование катоприлом и аналаприлом в кислотной форме составляло 5 и 13% соответственно). С другой стороны, фосфорамидон, ингибитор нейтральной эндопептидазы (КФ 3.4.24.11), называемой также энкефалиназой, ингибировал катаболизм вещества Р на 85%. Важность расщепления вещества Р энкефалиназой была признана Matsas и соавт. [35, 36] на основе результатов аналогичных опытов с препаратами мозга человека, а также опытов *in vitro*. Так, величины k_{cat} для обоих ферментов—АТФФ и энкефалиназы сопоставимы (33 и 31,9 мкМ соответственно), но определяющие скорость реакции величины k_{cat} для энкефалиназы значительно выше (5062 мин^{-1}), чем в случае АТФФ (225 мин^{-1}) [18, 33, 35]. Однако Lee и соавт. [37], Endo и соавт. [38] и Lauffer и соавт. [39] считают, что в условиях *in vivo* распад вещества Р, главным образом, обусловлен

действием неидентифицированной пока металлсодержащей протеазой, отличной от АТФФ и энкефалиназы. С другой стороны, есть некоторые указания и на участие АТФФ в катаболизме вещества Р в условиях *in vivo*. Так, Hanson и Lovenberg [40] сообщили об увеличении содержания вещества Р у животных после торможения АТФФ путем внутрижелудочкового введения каптоприла. Мы также обнаружили значительное увеличение содержания вещества Р в сыворотке крови у 5 из 7 больных со стойкой гипертонией в результате успешной пероральной терапии каптоприлом. В ряде других экспериментов было обнаружено повышение

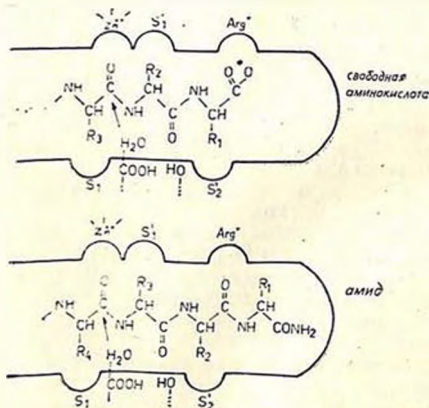


Рис. 3. Предполагаемое связывание пептидов со свободным и амидированным С-концом с активным центром ангиотензинпревращающего фермента. Модель активного центра по Skidgel и соавт. [19]

содержания вещества Р в сыворотке и в других тканях при лечении каптоприлом [41], но все эти результаты могут быть следствием и неспецифических эффектов каптоприла, который может ингибировать кроме АТФФ и некоторые другие протеазы.

Прийти к окончательному заключению по поводу деградации вещества Р, вызываемой АТФФ, до сих пор затруднительно. По-видимому, АТФФ не является ни единственным, ни главным ферментом, ответственным за катаболизм вещества Р, но это мнение требует дальнейшего подтверждения. Полное выяснение путей катаболизма вещества Р и других родственных пептидов поможет уяснить некоторые нежелательные побочные эффекты ингибиторов АТФФ при лечении гипертонии и определенных нарушений сердечной деятельности.

Мы благодарим д-ра Ragna Rathsack и Uve Kartscher, за проведение радиоиммунного анализа и ВЭЖХ, а также полезное обсуждение результатов.

1. Petrillo E. W., Ondetti M. A. *Med. Res. Rev.*, v. 2, №1, 1982.
2. Wyvratt M. J., Patchett A. A. *Med. Res. Rev.*, v. 5, p. 483, 1985.
3. Ondetti M. A., Cushman D. W. *Ann. Rev. Biochem.*, v. 51, p. 283, 1982.
4. Cheung H. S., Wang F.-L., Ondetti M. A., Sabo E. F., Cushman D. W. *J. Biol. Chem.*, v. 255, 401, 1980.
5. Siems W. — E., Halle W. *Pharmazie*, v. 37, 539, 1982.
6. Studdy P. R., Lapworth R., Bird R. J. *Clin. Pathol.*, v. 36, 938, 1983.
7. Oehme P., Bienert M., Hecht K., Bergmann J. — In: Substanz P. P. Oehme H.-L. W. Gores (Eds.), *Berlin-Friedrichsfelde*, 1981.
8. Friedland H., Silverstein E. *Amer. J. Clin. Pathol.*, v. 66, 416, 1976.
9. Siems W. — E., Heder G., Komissarowa N. W. *Z. med. Labor. — Diagn.*, v. 26, 232, 1985.
10. Oshima G., Geese A., Erdös E. C. *Biochim. et biophys. acta*, v. 350, 26, 1974.
11. Das M., Soffer R. L. *J. Biol. Chem.*, v. 250, 6762, 1975.
12. Lanzillo J. L., Fanburg B. L. *Biochemistry*, v. 16, 5491, 1977.
13. Rathsack R., Wein A. N., Hecht K., Oehme P. *Dtsch. Gesundh.-Wesen*, v. 37, 563, 1982.
14. McGeer E. G., Singh E. A. *Neurosci Lett.*, v. 14, 105, 1979.
15. Verma P. S., Sander G., Miller R. L., Taylor R. E., O'Doonuc T. O., Adams R. C. *Federat. Proc.*, v. 41, 1531, 1987.
16. Verma P. S., Adams R. G., Miller R. L. *Europ. J. Pharmacol.*, v. 86, 275, 1982.
17. Yokosawa H., Ogura Y., Ishii S. *J. Neurochem.*, v. 41, 403, 1983.
18. Cascieri M. A., Bull H. G., Mumford R. A., Patchett A. A., Thornberry N. A., Liang T. *Med. Pharmacol.*, v. 25, 287, 1984.
19. Skidgel R. A., Engelbrecht S., Johnson A. R., Erdös E. G. *Peptides*, v. 5, 769, 1984.
20. Ody C. E., Wilgis F. P., Vavrek R. J., Stewart J. M. *Biochem. Pharmacol.*, v. 32, 3839, 1983.
21. Kato T., Nagatsu T., Fukasawa K., Harada M., Nagatsu I., Sakakibara S. *Biochim. et biophys. acta*, v. 525, 417, 1978.
22. Heymann E., Mentlen R. *FEBS Lett.*, v. 91, 360, 1978.
23. Kato T., Hama T., Nagatsu T. *J. Neurochem.*, v. 34, 602, 1980.
24. Lockridge O. J. *Neurochem.*, v. 39, 106, 1982.
25. Akopyan T. N., Arutunyan A. A., Lajtha A., Galoyan A. A. *Neurochem. Res.*, v. 3, 83, 1978.
26. Blumberg S., Teichberg V. I. *Biochim. and Biophys. Res. Commun.*, v. 90, 347, 1979.
27. Blumberg S., Teichberg V. I., Charl J. L., Hersh L., Mekelvy J. *Brain Res.*, v. 192, 477, 1980.
28. Ryan J. W. *Biochem. Pharmacol.*, v. 32, 2127, 1983.
29. Yokosawa H., Endo S., Ogura Y., Ishii S. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, v. 116, 735, 1983.
30. Yokosawa H., Endo S., Ohgaki Y., Mueyama H., Ishii S. *J. Biochem.*, v. 98, 1293, 1985.
31. Inokuchi J. I., Nagamatsu A. *Biochim. et biophys. acta [Amsterdam]*, v. 662, 300, 1981.
32. Neels H., Inokuchi J. I., Nagamatsu A., van Sande M., Scharpe S. *J. Clin. Pathol.*, v. 35, 835, 1983.
33. Erdös E. G., Skidgel R. A. *Biochem. Soc. Trans.*, v. 13, 42, 1985.
34. Bunnnett N. W., Konayashi R., Orloff M. S., Reeve J. R., Turner A. J. *Walsh J. H. Peptides*, v. 6, 277, 1985.
35. Matsuz R., Kenny A. J., Turner A. J. *Biochem. J.*, v. 223, 433, 1984.
36. Matsuz R., Ratray M., Kenny A. J., Turner A. J. *Biochem. J.*, v. 228, 487, 1985.

37. Lee C. — M., Sandberg B. E. B., Hanley M. R., Iversen L. L. *Europ. J. Biochem.*, v. 114, 315, 1981.
38. Endo S., Yokosawa H., Ishii S. I. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, v. 129, 694, 1985.
39. Laufer R., Ewenson A., Gilon Ch., Chorev M., Selinger Z. *Europ. J. Biochem.*, v. 150, 135, 1985.
40. Hanson G. R., Lovenberg W. J. *Neurochem.*, v. 35, 1370, 1980.
41. Cauture R., Regoli D. *Can. J. Physiol Pharmacol.*, v. 59, 621, 1981.

Поступила 9. IX 1986

УДК 612.82.015.13:577.2

ИЗУЧЕНИЕ ЭКЗОПЕПТИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ КАТЕПСИНА В И СПЕЦИФИЧНОСТИ КАТЕПСИНА D И ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНОЙ АСПАРТИЛЬНОЙ ПРОТЕИНАЗЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА С ПОМОЩЬЮ ХРОМОФОРНЫХ И ВАЗОАКТИВНЫХ ПЕПТИДОВ

АЗАРЯН А. В., ГАЛОЯН А. А.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Изучено действие катепсина В (КФ 3.4.22.1), катепсина D (КФ 3.4.23.5) и высокомолекулярной аспартильной протеиназы (КФ 3.4.23.—) головного мозга человека и быка на вазоактивные пептиды (ангиотензины I и II, вещество P, ренин субстрат тетрадекапептид) и хромофорные пептиды, содержащие остаток п-нитро-L-фенилаланила: Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Phe(NO₂)-Ala-Leu-OH (I), Gly-Gly-His-Phe(NO₂)-Phe-Ala-Leu-NH₂ (II), Pro-Glu-Ala-Phe(NO₂)-Gly (III). Обе аспартильные протеиназы расщепляли пептидную связь Phe₇-Phe₈ в веществе P, Leu₁₀-Leu₁₁ — в ренин субстрате тетрадекапептиде, Phe-Phe(NO₂) — в субстрате I и Phe(NO₂)-Phe — в субстрате II; катепсин D гидролизует связь Phe-Phe(NO₂) в субстрате I с K_m 0,4 мМ и k_{cat} 18,3 с⁻¹, а субстрат II — по связи Phe(NO₂)-Phe с K_m 0,88 мМ и k_{cat} 0,08 с⁻¹. Сопоставление кинетических констант гидролиза исследованных хромофорных пептидов катепсином D с таковыми для высокомолекулярной аспартильной протеиназы подтверждает наше предположение, что высокомолекулярная аспартильная протеиназа является комплексом катепсина D с эндогенным ингибитором. Изучение расщепления хромофорных пептидов катепсином В и определение кинетических констант ферментативного гидролиза субстратов I, III и Z-Arg-Arg-NNaOMe выявило факторы, способствующие проявлению дипептидилкарбоксипептидазной активности этой цистеиновой протеиназы.

Становится очевидным, что протеолитическая деградация нейропептидов и пептидных гормонов является принципиально важным механизмом, регулирующим активную концентрацию этих соединений и длительность их физиологических эффектов. Осознание роли протеиназ в процессе и инактивации нейропептидов и пептидных гормонов и в генерации олигопептидных фрагментов, обладающих более мощным или специфическим центральным действием, вызвало большой интерес к изучению протеиназ ткани головного мозга.

Ранее были описаны очистка, физико-химические свойства и субстратная специфичность аспартильных и цистеиновых протеиназ головного

мозга человека и быка: катепсина D (КФ 3.4.23.5) [1, 2], высокомолекулярной аспартильной протеиназы (ВАП) (КФ 3.4.23.—) [3—5], катепсина В (КФ 3.4.22.1) [2, 6], катепсина L (КФ 3.4.22.15) и катепсина Н (КФ 3.4.22.16) [7—10]. В настоящем сообщении представлены данные по изучению субстратной специфичности катепсина В, катепсина D и ВАП с помощью регуляторных пептидов вазоактивного ряда и хромофорных олигопептидов, содержащих остаток *p*-нитро-L-фенилаланила (Nph). Целью настоящего исследования было выявление факторов, способствующих проявлению дипептидилкарбоксипептидазной активности катепсина В, сравнение субстратной специфичности катепсина D и ВАП для ответа на вопрос: является ли ВАП самостоятельным ферментом или комплексом катепсина D с эндогенным ингибитором, и получение информации о возможной физиологической роли этих протеиназ.

Материалы и методы

Катепсины В, D и ВАП выделяли из коры больших полушарий головного мозга человека и быка с помощью многоступенчатой процедуры, включающей биоэффигную хроматографию на пепстатин-, фенил- и конканавалин А-сефарозе, как описано в литературе [1, 3—6]. Активность аспартильных протеиназ определяли флуориметрически при pH 3,2 по гидролизу пиридексил-гемоглобина [1] и спектрофотометрически при pH 5,0 по гидролизу азоказина [5]. Активность катепсина В определяли в присутствии 2 мМ дитиотрептола и 2 мМ Na_2EDTA при pH 6,0 флуориметрически в реакции гидролиза Z-Arg-Arg-NHOMe и Z-Phe-Arg-NHMeс, а также по гидролизу азоказина при pH 5,0 [6, 8]. Индивидуальность полученных препаратов фермента доказана диск-электрофорезом в ПААГ и изоэлектрическим фокусированием.

Гидролиз нейрпептидов проводили при 37° при соотношении фермент/субстрат 1:10 или 1:20 в 0,1 М цитратном буфере, pH 3,2 для аспартильных протеиназ и в 0,1 М фосфатном буфере, pH 6,0 в присутствии 2 мМ дитиотрептола и 2 мМ Na_2EDTA для катепсина В в течение 3-х ч. Природу расщепляемой пептидной связи определяли дансильрованием [11, 12] и идентификацией продуктов протеолиза тонкослойной хроматографией с использованием аутентичных свидетелей.

Гидролиз пептидов, содержащих Nph, регистрировали по изменению оптической плотности при 308 нм в термостатируемых кюветках при 25° для катепсина В и при 25° и 37° для аспартильных протеиназ на спектрофотометре «Cary-118» (США). Кинетические константы гидролиза хромофорных пептидов катепсинами головного мозга рассчитывали из начальных скоростей реакции, построенных в координатах Лайнуивера-Берка, используя коэффициент молярной экстинкции $\epsilon_{308} = 100 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ [13].

Результаты и обсуждение

Гидролиз вазоактивных пептидов аспартильными протеиназами головного мозга. Существование ВАП в ткани головного мозга человека и быка было впервые показано в 1983 г. [3, 4]. Этот фермент был выделен в электрофоретически гомогенном виде из коры больших полушарий головного мозга человека и быка с помощью хроматографии на пепстатин-сефарозе; M_r фермента—90 кД, изоэлектрическая точка—5,6. При электрофорезе в ПААГ в присутствии ДДС-Na и β -меркаптоэтанола обнаружена одна полоса, соответствующая белкам с M_r 46—48 кД [5].

По ряду характеристик ВАП сходна с катепсином D из того же источника: 1) высокая чувствительность к пепстатину— $K_i 10^{-8}$ М; 2) рекомендуемые субстраты—пиридоксил-гемоглобин (оптимум рН гидролиза 3,2) и азосубстраты: азоказенин и азогемоглобин (оптимум рН гидролиза 5,0); 3) ВАП расщепляет бычий сывороточный альбумин и γ -глобулин, однако скорость гидролиза этих субстратов составляет 10 и 5% от скорости гидролиза гемоглобина соответственно; 4) добавление в инкубационную среду 3 М мочевины (рН 5,0) повышает величину У. А. ВАП в 3 и 5 раз в реакции гидролиза азогемоглобина и азоказенина соответственно. Фракция иммуноглобулина G, полученная из кроличьей моноспецифической антисыворотки к катепсину D головного мозга быка, дает одну линию преципитации как с катепсином D, так и с ВАП (реакция двойной иммунодиффузии по Оухтерлонни), но свидетельствует лишь о частичной иммунологической идентичности катепсина D и ВАП [5]. Обращает на себя внимание тот факт, что величина У. А. ВАП значительно ниже, чем катепсина D: в 10 раз—в случае пиридоксил-гемоглобина и в 7 раз—в случае азобелков [5].

Для сравнения субстратной специфичности катепсина D и ВАП мы применили вещество Р и ренин субстрат тетрадекапептид (РСТП). Выбор именно этих двух вазоактивных пептидов обусловлен следующими соображениями: 1) катепсин D из разных источников, в том числе из головного мозга крысы, гидролизует РСТП, являющийся N-концевым тетрадекапептидом ангиотензиногена, с образованием ангиотензина I [14, 15]; 2) в 1983 г. мы обнаружили [1], что катепсин D головного мозга человека гидролизует вещество Р по связи Phe₇-Phe₈. В настоящей работе показано, что катепсин D головного мозга человека и быка также обладает способностью образовывать ангиотензин I из РСТП. Более того, ВАП также расщепляет связь Leu₁₀-Leu₁₁ в РСТП с образованием ангиотензина I. Обе аспартильные протеиназы расщепляют связь Phe₇-Phe₈ в веществе Р. Ни ВАП, ни катепсин D не гидролизуют ангиотензины I и II [2]. Таким образом, приведенные данные свидетельствуют об одинаковой субстратной специфичности катепсина D и ВАП.

Вещество Р—хороший субстрат и для катепсина В ткани мозга: с помощью RIA показано, что 90% пептида подвергается гидролизу при 90 мин инкубации с ферментом: катепсин D головного мозга расщепляет 87% пептида в течение 30 мин, а 4-часовой инкубации каждой из указанных протеиназ с этим пептидом достаточно для его полного гидролиза (совместное исследование с д-ром Бергером Х., Ин-т лекарственных средств, Берлин, ГДР). Нам удалось показать, что катепсин В головного мозга первоначально расщепляет связь Gly₉-Leu₁₀ в веществе Р (1-часовая инкубация) с последующим гидролизом Gln₆-Phe₇.

Гидролиз хромофорных пептидов аспартильными протеиназами головного мозга. Так как, по данным рентгеноструктурного анализа, полость активного центра внеклеточных аспартильных протеиназ вмещает

по меньшей мере 7 аминокислотных остатков [16, 17], были разработаны и синтезированы олигопептидные субстраты, которые были достаточно велики для уникального однозначного заполнения активного центра, содержали остаток Nph, превращение которого в карбоксилатную форму при протеолизе сопровождается изменением оптической плотности при 300—310 нм, и удовлетворяли критериям специфичности той или иной аспартильной протениназы [13, 18]. Для изучения субстратной специфичности катепсина D и ВАП головного мозга использовали 2 хромофорных олигопептида указанного типа Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Nph-Ala-Leu-OH (I) — аналог субстратов пепсина [13, 18] и катионный гистидинсодержащий пептид Gly-Gly-His-Nph-Phe-Ala-Leu-NH₂ (II).

Ранее эти пептиды были апробированы в качестве субстратов для пепсина свиньи и цыпленка [19]. Обе аспартильные протениназы головного мозга расщепляли единственную связь между двумя остатками фенилаланина в субстратах I и II в интервале pH 3,0—6,0 с оптимумом pH гидролиза при 3,2 и вторым небольшим пиком активности при pH 4,0 для катепсина D. Аналогичная бимодальная кривая pH-активности была ранее описана для катепсина D головного мозга человека в реакции гидролиза пиридоксил-гемоглобина [1]. Величина У. А. ВАП оказалась в 10 раз ниже таковой катепсина D в случае обоих субстратов I и II. Определены кинетические параметры гидролиза субстратов I и II катепсином D и ВАП (табл. 1). Установлено, что константы специфичности k_{cat}/K_m для катепсина D существенно выше, чем для ВАП, в случае обоих субстратов. Это обусловлено лучшей каталитической эффективностью катепсина D (k_{cat}), поскольку величины K_m довольно близки (табл. 1).

Учитывая тот факт, что ВАП сходна с катепсином D по ряду свойств, проявляет такую же субстратную специфичность, частично иммунологически идентична катепсину D и, в то же время, величина У. А. ВАП в 7—10 раз ниже таковой катепсина D, полученные кинетические параметры свидетельствуют в пользу предположения, что ВАП является комплексом катепсина D с эндогенным ингибитором.

Изучение экзопептидазной активности катепсина В головного мозга. Катепсин В обладает как эндо-, так и экзопептидазной активностью, отщепляя дипептиды с С-конца полипептидной цепи глюкогона, альдостазы, нейротензина, ангиотензина I [20—22, 2]. Факторы, способствующие проявлению пептидилдипептидазной активности катепсина В, не ясны. Однако тот факт, что катепсин В головного мозга не гидролизует связь Phe-His в трипептиде Z-Phe-His-Leu, в то же время катализируя отщепление дипептида His₉-Leu₁₀ от ангиотензина I с образованием ангиотензина II [2], косвенным образом свидетельствует о важности связывания участка S₃ активного центра фермента для проявления его дипептидилкарбоксипептидазной активности. Это предположение было убедительно подтверждено работами Pohl и соавт. [23] для катепсина В селезенки быка с помощью модельных пептидов.

Для дальнейшего изучения дипептидилкарбоксипептидазной актив-

ности катепсина В головного мозга были использованы 3 хромофорных олигопептида, содержащих остаток Nph (рисунок). Как видно на рисунке, катепсин В отщеплял последовательно два дипептида от субстрата I и один — от субстрата III; в субстрате II первоначально гидролизовалась связь Ala-Leu, после чего отщеплялся С-концевой дипептид Phe-Ala. Были определены также кинетические константы гидролиза субстратов I, III и Z-Arg-Arg-NNaOMe катепсином В головного мозга (табл. 2).

Таблица 1

Кинетические параметры гидролиза хромофорных олигопептидов аспартильными протеиназами головного мозга;

I — Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Nph-Ala-Leu-OH,

II — Gly-Gly-His-Nph-Phe-Ala-Leu-NH₂.

Субстрат, мМ	Фермент, мМ	k_{cat}, c^{-1}	$K_m, мМ$	$k_{cat}/K_m, c^{-1} мМ^{-1}$
I (0,05—1,0)	Катепсин D (0,08)	18,3	0,4	45,7
(0,1—1,0)	ВАП (0,07)	2,8	0,42	6,6
II (0,1—1,0)	Катепсин D (0,06)	0,08	0,88	0,09
(0,1—1,1)	ВАП (0,05)	0,02	0,92	0,022

Примечание. Инкубацию протеиназ с субстратом I проводили в 0,1 М цитратном буфере, pH 3,5 при 37°; с субстратом II — в 0,1 М цитратном буфере, pH 3,0 при 25°.

$E_{280}^{1\%} = 10,5$ для обеих протеиназ; величина M_r катепсина D — 50 кД, ВАП — 90 кД.

Полученные нами данные свидетельствуют о существовании еще двух факторов, необходимых для проявления дипептидилкарбоксипептидазной активности катепсина В головного мозга:

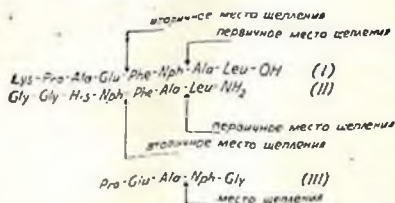


Рис. Гидролиз хромофорных олигопептидов катепсином В головного мозга при pH 5,0

1. Наличие в субстрате свободного С-конца. Так, на рисунке видно, что в гептапептиде с амидированным С-концом (субстрат II) сначала расщеплялась связь Ala-Leu и только после этого отщеплялся С-концевой дипептид Phe-Ala. В октапептиде же со свободным С-концом (суб-

страт 1) катепсин В отщеплял последовательно два дипептида с С-конца; 2. Специфичность взаимодействия отщепляемого дипептида $P'_1-P'_2$ с активным центром фермента. Экспериментальную основу признания важности этого фактора представляет сопоставление величин K_m гидролиза субстрата I (0,025 мМ) и диаргинилового субстрата — Z-Arg-Arg-NNaOMe (0,26 мМ), являющегося, наряду с Z-Phe-Arg-NHMeс, лучшим модельным субстратом катепсина В (табл. 2).

На основе имеющихся литературных данных трудно объяснить структурную основу дипептидилкарбоксипептидазной активности катепсина В: по мнению Takio и соавт. [24], определивших полную первичную

Таблица 2

Кинетические параметры гидролиза модельных пептидов катепсинов В головного мозга

S_6	S_5	S_4	S_3	S_2	S_1	S'_1, S'_2	k_{cat}, c^{-1}	$K_m, мМ$	$k_{cat}/K_m, c^{-1}мМ^{-1}$
Lys-	Pro-	Ala-	Glu-	Phe-Nph-	Ala-Leu		2,75	0,025	110,0
			Pro-	Glu-Ala-Nph-	Gly		1,20	0,18	6,7
				Z-Arg-Arg-	NNa		73,5	0,26	282,7

Примечание: Инкубацию катепсина В с субстратами проводили при 25° в присутствии 2 мМ дитиотрептола и 2 мМ Na_2 ЭДТА при pH 5,0 для Nph субстратов и при pH 6,0 для Z-Arg-Arg-NNaOMe.

структуру катепсина В из печени крыс, наличие остатка Arg-200 вблизи от остатка His-197 активного центра в молекуле фермента может быть существенным для связывания COOH-группы субстрата и проявления дипептидилкарбоксипептидазной активности катепсина В (представленные нами данные, свидетельствующие о важности свободного С-конца в субстрате для проявления экзопептидазной активности катепсина В головного мозга, подтверждают указанное мнение). Остаток Arg-200 обнаружен и в молекуле катепсина В из печени человека [25], тогда как в высокоомологичных катепсину В молекулах папаина и катепсина Н он замещен на остатки лейцина и аланина соответственно [24]. Селективная модификация остатка Arg-200 с помощью специфических реагентов (1,2-циклогександион, бутандион) позволит уточнить его функциональную значимость.

Наличие в ткани головного мозга двух протеназ, обладающих дипептидилкарбоксипептидазной активностью, представляет несомненный интерес, так как одна из них—катепсин В—активна полностью в присутствии тиолсодержащих соединений и при значениях pH 5,0—6,0, а другая—ангиотензинпревращающий фермент—активна при значениях pH около 8,0, ингибируется SH-соединениями и активируется Cl^- . Возможно, эти протеназы функционируют внутри разных компартментов клетки и дополняют друг друга в процессах, связанных с образованием и инактивацией нейропептидов (хотя катепсин В преимущественно лока-

лизован в лизосомах, он обнаруживается и в специфических гранулах, а также в связи с мембранной фракцией).

Трудно полностью исключить возможность участия аспартильных протеиназ головного мозга в локальном образовании ангиотензина I, хотя низкая активность катепсина D и ВАП при значениях pH выше 6.0 делает их неподходящими кандидатами для этой роли. Сопоставление ангиотензин I-генерирующей потенции ренина и катепсина D головного мозга представляется целесообразным.

Для детального изучения механизма ферментативных реакций необходимо наличие всесторонне охарактеризованных субстратов. Хотя эндогенные белки являются хорошими субстратами для многих протеиназ, они не пригодны для изучения механизма действия этих ферментов, так как, во-первых, конформация белковых субстратов существенно влияет на скорость протеолиза и, во-вторых, в белковых субстратах гидролизуются, как правило, не одна, а несколько пептидных связей. Для изучения механизма действия аспартильных протеиназ на первых порах использовали ди- и трипептиды. Обнаружение же протяженности полости активного центра внеклеточных аспартильных протеиназ, вмещающей по меньшей мере 7 аминокислотных остатков, свидетельствует о возможности многообразия связывания коротких пептидов в активном центре фермента, что затрудняет интерпретацию кинетических констант их гидролиза, рассчитываемых на основе измерения ферментативной активности. Проведенные нами исследования служат новым наглядным примером полезности и информативности использования специально разработанных хромофорных олигопептидов, уникально и однозначно заполняющих активный центр аспартильных протеиназ. С их помощью удалось не только получить новые данные о природе и механизме действия ВАП головного мозга, но и выявить факторы, способствующие проявлению дипептидилкарбоксипептидазной активности катепсина В из того же источника.

Выражаем благодарность д-ру J. Pohl (Институт органической химии и биохимии, г. Прага) за предоставление синтезированных им хромофорных олигопептидов, д-ру W. Siems за предоставление вещества Р и его фрагментов, синтезированных в Отделе синтеза лекарственных соединений Института лекарственных средств, Берлин, ГДР.

USE OF CHROMOPHORIC AND VASOACTIVE PEPTIDES FOR THE STUDY OF EXOPEPTIDASE ACTIVITY OF CATHEPSIN B AND SPECIFICITY OF CATHEPSIN D AND HIGH M_r ASPARTIC PROTEINASE FROM BRAIN TISSUE

AZARYAN A., GALOYAN A.

Institute of Biochemistry, Arm. SSR Acad. Sci., Yerevan

Substrate specificity of human and bovine brain cortex cathepsin B, cathepsin D and high M_r aspartic proteinases has been examined with angiotensins I & II, substance P, RSTP and model chromophoric oligopeptides containing Phe (NO₂) residue. The aspartic proteinases

exert identical specificity splitting Phe₇-Phe₈ bond in substance P, Leu₁₀-Leu₁₁ in RSTP and Phe-Phe - in chromophoric oligopeptides. Comparison of the kinetic constants k_{cat}/K_m of cathepsin D and high M_r aspartic proteinase-catalyzed hydrolysis of chromophoric oligopeptides supports our suggestion that high M_r aspartic proteinase may be a complex of cathepsin D with endogenous inhibitor. The cleavage pattern and kinetic constants of cathepsin B-catalyzed hydrolysis of regulatory and model peptides point to factors essential for manifestation of dipeptidylcarboxypeptidase activity of this proteinase: a) occupation of S₃ subsite, b) free C-terminus of substrate, c) specific interaction of dipeptide cleaved off with the active center of cathepsin B.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Azaryan A., Akopyan T., Buniatian H. *Biomed. biochim. acta*, v. 42, p. 1237-1246, 1983.
2. Azaryan A., Barkhudaryan N., Galoyan A., Lajtha A. *Neurochem. Res.*, v. 10, p. 1525-1532, 1985.
3. Азарян А., Бархударян Н. — В кн.: Труды IV Всесоюз. симпозиума медицинской анимологии (ред. С. С. Дебов), с. 10-11, Алма-Ата, 1983.
4. Бархударян Н., Азарян А. *Нейрохимия*, т. 2, с. 280-287, 1983.
5. Azaryan A., Wiederanders B., Barkhudaryan N., Galoyan A. — In: *Aspartic Proteinases and their Inhibitors* (ed. V. Kostka), p. 123-127, Walter de Gruyter, Berlin, 1985.
6. Azaryan A., Barkhudaryan N., Galoyan A. *Neurochem. Res.*, v. 10, p. 1511-1524, 1985.
7. Azaryan A., Galoyan A. — In: *Proceed. 6th Intern. Symp. Intracellular Protein-Catabolism* (eds. H. Kirschke et al.), p. 2-7, Wernigerode, DDR, 1986.
8. Azaryan A., Galoyan A. *Neurochem. Res.*, v. 12, p. 207-214, 1987.
9. Galoyan A., Azaryan A. — In: *Synaptic Transmitters and Receptors* (eds. S. Tucek et al.), p. 123-133, J. Wiley & Sons, 1986.
10. Азарян А., Галоян А. — В кн.: Труды III Всесоюз. симпозиума «Структура и функции лизосом» (ред. С. С. Дебов), с. 4-6, Москва, 1986.
11. Gros C., Labouesse B. *Eur. J. Biochem.*, v. 7, p. 463-470, 1969.
12. Hartley B. *Biochem. J.*, v. 119, p. 805-822, 1970.
13. Pohl J., Baudys M., Kostka V. *Anal. Biochem.*, v. 133, p. 104-109, 1983.
14. Hackenthal E., Hackenthal R., Hilgenfeldt U. *Biochim. et biophys. acta*, v. 522, p. 574-588, 1978.
15. Poe M., Wu J. K., Lin T., Y. Hoogsteen K., Bull H., Slater E. *Anal. Biochem.*, v. 140, p. 459-467, 1984.
16. Andreeva N., Zhdanov A., Gustchina A., Fedorov A. *J. Biol. Chem.*, v. 259, p. 11353-11365, 1984.
17. Hallett A., Jones D., Atrash B., Szelke M., Leckie B., Beattie S., Dunn B., Valler M., Rolph C., Kay J., Foundling S., Wood S., Pearl L., Watson F., & Blundell T. — In: *Aspartic Proteinases & their Inhibitors* (ed. V. Kostka), p. 467-478, Walter de Gruyter, Berlin, 1985.
18. Kay J., Dunn B. *Biochem. Soc. Trans.*, v. 13, p. 1041-1043, 1985.
19. Pohl J., Strop P., Pichova J., Blahu J., Kostka V. — In: *Aspartic Proteinases and their Inhibitors* (ed. V. Kostka), p. 245-264, Walter de Gruyter, Berlin 1985.
20. Aronson N., Barrett A. *J. Biochem. J.*, v. 171, p. 759-765, 1978.
21. Bond J., Barrett A. *J. Biochem. J.*, v. 189, p. 17-25, 1980.

22. Katunuma N., Towatari T., Kominami E., Heshida S., Takio K., Titani K. *Acta biol. med. Germ.*, v. 40, p. 1419–1425, 1981.
23. Pohl J., Davinic S., Blaha J., Strop P., Kostka V. — In: *Cysteine Proteinases and their Inhibitors* (ed. V. Turk), p. 33–43, Walter de Gruyter, Berlin, 1986.
24. Takio K., Towatari T., Katunuma N., Teller D., Titani K. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, v. 80, p. 3666–3671, 1983.
25. Ritonja A., Popovic T., Turk V., Wiedenmann K., Machleidt W. *FEBS Lett.*, v. 181, p. 169–172, 1985.

Поступила 9. IX 1986

УДК 577.352.354.46:577.113.3

ВЛИЯНИЕ АНАЛОГОВ NAD НА ЕГО СВЯЗЫВАНИЕ СИНАПТИЧЕСКИМИ МЕМБРАНАМИ КОРЫ БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

ХАЛМУРАДОВ А. Г., КУЧМЕРОВСКАЯ Т. М., ПАРХОМЕЦ П. К.,
КЛИМЕНКО А. П., АРУТЮНЯН А. В., *МОВСЕСЯН Н. О.

Институт биохимии им. А. В. Палладина АН УССР, Киев
*Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Было исследовано влияние ряда адениловых (аденозин, аденинтрифосфат) и никотинамидных (NADP, NADH, NADPH, дезамино- и дезамидо-NAD, N⁶-карбоксиметил-NAD, никотинамидмононуклеотид и 3'-ацетил-пиридин) аналогов NAD, а также антагонистов аденозина—метилксантинсв на процесс связывания ¹⁴C-NAD синаптическими мембранами мозга крыс. Установлено, что способность связываться с рецепторными участками мембран зависит от пространственной структуры исследуемых соединений. Показано, что в связывании синаптическими мембранами принимают участие как аденозинный, так и никотинамидный фрагменты молекулы NAD.

При исследовании синаптических мембран коры больших полушарий головного мозга [1, 2], а также гиппокампа [3] крыс ранее была выявлена специфическая система взаимодействия NAD с двумя участками связывания, характеризующимися высокой и низкой степенью сродства к радиоактивному лиганду [1, 2]. Данные о наличии на синаптических мембранах двух NAD-связывающих участков соответствуют представлениям о существовании разных типов пуринорецепторов, отличающихся селективностью в отношении действия агонистов и антагонистов P₁ и P₂, преимущественными лигандами которых являются соответственно аденозин и АТР [4].

Не исключено, что молекула NAD может взаимодействовать как с рецепторами синаптической мембраны обоих типов, так и исключительно с одним из них. С другой стороны, наличие никотинамидного кольца в молекуле NAD указывает на возможность его связывания с бензодиазепиновыми рецепторами, одним из возможных специфических лигандов которых является никотинамид [5].

Целью настоящего исследования явилось выяснение роли аденозинного и никотинамидного фрагмента молекулы NAD в рецепции этого динуклеотида синаптическими мембранами головного мозга.

Материалы и методы

Фракцию синаптических мембран из коры больших полушарий крыс получали методом Abita и соавт. [6]. В опытах по связыванию меченого NAD синаптическими мембранами использовали никотинамид [$U-^{14}C$]-аденидинуклеотид (^{14}C -NAD) ($9 \cdot 10^{-11}M$) с удельной радиоактивностью 287 мКи/ммоль («Amersham», Англия). Синаптические мембраны предварительно никубировали в течение 15 мин в присутствии 1000-кратного избытка по концентрации ($6 \cdot 10^{-7}M$) аналогов NAD в среде, состав которой, так же как и расчет общего, неспецифического и специфического связывания синаптическими мембранами, описан ранее [1].

Исследования по изучению влияния некоторых антагонистов аденозина (теофиллин, изоамилбутилксантин и изобутилметилксантин) были также проведены после 15-минутной преинкубации их в концентрации 4,9 мМ с синаптическими мембранами. Дегградацию NAD предотвращали путем добавления никотинамида (0,003 мМ), являющегося эффективным ингибитором гликогидролазного расщепления динуклеотида [7].

Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлены данные по влиянию адениловых (аденозин, AMP, ADP, ATP) аналогов на процесс связывания [^{14}C]NAD синаптическими мембранами. Полученные результаты свидетельствуют о том,

Таблица 1

Влияние адениловых аналогов и антагонистов аденозина на связывание [^{14}C] NAD синаптическими мембранами коры больших полушарий головного мозга крыс (n=8)

Исследуемые соединения	Специфическое связывание	
	в имп. мин./мг белка	% ингибирования
Контроль	1579 $\pm$ 129	—
<i>Адениловые аналоги</i>		
Аденозин	725 $\pm$ 51	54
AMP	521 $\pm$ 38	67
ADP	251 $\pm$ 22	84
ATP	229 $\pm$ 18	86
<i>Антагонисты аденозина</i>		
Теофиллин	363 $\pm$ 33	77
Изоамилбутилксантин	395 $\pm$ 35	75
Изобутилметилксантин	474 $\pm$ 45	70

что в присутствии адениловых аналогов связывание NAD синаптическими мембранами снижается. Относительная эффективность адениловых аналогов в отношении ингибирования связывания NAD может быть представлена в следующем порядке: ATP > ADP > AMP > аденозин. Что

же касается пуринорецепторов типа P_1 и P_2 , эффективность действия их агонистов представлена следующим образом: аденозин $\geq$ AMP $\geq$ ADP $\geq$ АТР и АТР $\geq$ ADP $\geq$ AMP $\geq$ аденозин соответственно [4]. Исходя из полученных нами данных, можно предположить, что NAD обладает большим сродством к рецепторам типа P_2 по сравнению с P_1 .

Однако перечисленных фактов недостаточно, чтобы исключить возможность связывания NAD пуринорецепторами типа P_1 или другим, до настоящего времени неизвестным типом рецепторов, специфичным, возможно, исключительно к NAD. В связи с этим следует отметить, что, по предварительным данным, NAD в условиях наших экспериментов приводил к ингибированию на 30—40% специфического связывания ^3H -аденозина синаптическими мембранами мозга.

Метилксантины, в том числе теофиллин, кофеин, изобутилметилксантин и другие сильно ингибируют действие аденозина на различные ткани [4, 8], не оказывая влияние на действие АТР, в частности, на вызванное им расширение сосудов в почках и сердце [9]. Теофиллин же и другие метилксантины являются ингибиторами рецепции аденозина срезами коры мозга морских свинок [10]. В этой связи представляло интерес выяснить, какое влияние оказывают некоторые из антагонистов аденозина метилксантинового ряда на процесс связывания NAD синаптическими мембранами. Как видно из данных, представленных в табл. 1, исследуемые соединения конкурируют за места связывания NAD синаптическими мембранами. Ингибирование связывания NAD теофиллином, изоамилбутилксантином и изобутилметилксантином составляло соответственно 77, 75 и 70%. Проведенные с антагонистами аденозина эксперименты подтверждают значение аденозиновой части молекулы NAD для его рецепции синаптическими мембранами.

Для выяснения роли никотинамидного фрагмента NAD в связывании синаптическими мембранами в следующей серии опытов исследовали влияние на этот процесс различных его никотинамидных аналогов.

Из приведенных в табл. 2 данных видно, что в присутствии никоти-

Таблица 2

Влияние никотинамидных аналогов на связывание [^{14}C] NAD $^+$ синаптическими мембранами головного мозга крыс ($n=8$)

Исследуемые соединения	Специфическое связывание	
	в 1 мл мин. мг белка	% ингибирования
Контроль	1579 $\pm$ 129	—
NADH	125 $\pm$ 11	92,1
NADP $^+$	116 $\pm$ 10	92,7
NADPH	212 $\pm$ 16	86,6
N 6 -карбоксиметил-NAD	294 $\pm$ 28	81,4
Дезамино-NAD	330 $\pm$ 26	79,1
Дезамидо-NAD	130 $\pm$ 11	91,8
NMN	830 $\pm$ 66	47,5
3'-ацетилпиридин	1275 $\pm$ 79	19,5

намидных аналогов связывание NAD синаптическими мембранами заметно снижалось, причем в ряде случаев (NADH, NADP, дезамидо-NAD, NADPH) было более выражено по сравнению с адениновыми аналогами (табл. 1). Относительная эффективность никотинамидных аналогов как ингибиторов связывания NAD может быть расположена в следующем порядке: NADP > NADH > дезамидо-NAD > NADPH > N⁶-карбоксиметил-NAD > дезамино-NAD > NMN > 3'-ацетилпиридин. Очевидно, что ингибирующая способность исследуемых соединений зависит в большей степени от адениннуклеотидной части молекулы NAD, чем от никотинамидной. К такому выводу можно прийти на основании того, что NMN приводил к менее значительному, чем в случае динуклеотидных аналогов NAD, ингибированию его связывания синаптическими мембранами: 3'-ацетилпиридин — соединение, лишенное карбоксамидной группировки, почти не оказывал влияния на этот процесс. Эти данные согласуются с результатами исследований Richards и соавт. [3], установивших, что NAD, NADH и NADPH, в отличие от NMN, подавляли синаптическую передачу возбуждения в гиппокампе крыс. Полученные нами данные указывают также на то, что рецепция не связана с бензодиазепиновыми рецепторами, для которых характерна высокая чувствительность к никотинамиду [5].

Наряду с этим, можно заключить, что определенное значение в данном процессе имеет 6-аминогруппа аденинового кольца, так как соединения, в которых этот участок молекулы NAD модифицирован (N⁶-карбоксиметил-NAD, дезамино-NAD), обладают меньшим по сравнению с другими никотинамидными аналогами NAD ингибирующим действием на его связывание синаптическими мембранами.

При сопоставлении данных, приведенных в табл. 1 и 2, видно, что для проявления максимальной ингибирующей способности в отношении связывания NAD синаптическими мембранами необходимо сохранение цельности молекулы адениндинуклеотида и неизменности аденинового кольца. Этим требованиям отвечают такие соединения, как NADH, NAD⁺ и дезамидо-NAD.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что способность связываться с рецепторными участками мембран зависит от пространственной структуры исследуемых соединений и подчеркивают значение в этом процессе обоих фрагментов (аденинового и никотинамидного) молекулы NAD.

Ранее связывание NAD изучали в отношении различных дегидрогеназ [11]. Однако восстановленная форма NAD связывается цитоплазматическими дегидрогеназами со сродством, в 100 раз большим, чем окисленная [11, 12]. На основании наших исследований (табл. 2) можно предположить, что оба нуклеотида обладают почти одинаковой способностью связываться с синаптическими мембранами. Из этого следует, что рецепция NAD синаптическими мембранами имеет совершенно другую природу, чем связывание его как кофермента цитозольных белков.

Проведенными ранее исследованиями [13] было установлено, что

рецепторные участки синаптических мембран, связывающие NAD, представляют собой протеолипиды, окруженные олигосахаридной частью ганглиозидов, в структуру которых входят SH-группы. Взаимодействие NAD с синаптическими мембранами может иметь физиологическое значение, о чем свидетельствует тот факт, что он стимулирует опосредованное Ca^{2+} высвобождение дофамина и серотонина из нервных окончаний (неопубликованные данные).

В этом отношении значительный интерес представляют данные об ингибировании процесса связывания NAD синаптическими мембранами под влиянием дезаминно- и дезамидо-NAD. Ранее нами было обнаружено [14], что образование в ткани мозга упомянутых производных NAD приводило к изменению его коферментной активности. Исходя из этого, можно полагать, что в таких условиях изменяются и другие функциональные характеристики NAD, а это может отражаться на его нейромодуляторной функции.

Это предположение находит подтверждение в исследованиях Richards и соавт. [3], обнаруживших, что дезаминно-NAD, в отличие от NAD, не оказывает действия на синаптическую передачу возбуждения, что проявляется в различном эффекте этих соединений на биопотенциалы, вызванные электрическим раздражением гиппокампа.

EFFECT OF NAD-ANALOGS ON ITS BINDING WITH RAT BRAIN SYNAPTIC MEMBRANES

KHALMURATOV A. G., KUCHMEROVSKAYA T. M., PARKHOMETS P. K., KLIMENKO A. P., HARUTOUNYAN A. V., MOVSESYAN N. O.

A. V. Palladin Institute of Biochemistry, Ukr. SSR Acad. Sci, Kiev
*Institute of Biochemistry, Arm. SSR Acad. Sci, Yerevan

The effect of a number of NAD adenyl analogs (adenosine, adenine nucleotides) and NAD nicotinamide analogs (NADP^+ , NADH and NADPH , desamino and desamido-NAD, N^{α} -carboxymethyl-NAD, nicotinamide mononucleotide and 3-acetyl-pyridine) and antagonists of adenosine (methylxanthines) on binding of NAD with rat brain synaptic membranes has been investigated. Data obtained indicate that ability of the compounds mentioned to bind with receptor sites of membranes depends from their conformation. Both adenosine and nicotinamide moieties of NAD^+ molecule contribute to the binding with synaptic membranes.

ЛИТЕРАТУРА

1. Халмуратов А. Г., Пархомец П. К., Кучмеровская Т. М., Чичковская Г. В. Биохимия, т. 48, № 8, с. 1287—1292, 1983.
2. Snell C. R., Snell P. H., Richards D. J. Neurochem., v. 43, №6, p. 1610—1615, 1984.
3. Richards C. D., Snell C. R., Snell P. H. Brit. J. Pharmacol., v. 79, №2, p. 553—564, 1983.
4. Бернсток Ж.—В кн.: Рецепторы клеточных мембран для лекарств и гормонов (под ред. Р. Штрауба и А. Болле), с. 120—132, М., Медицина, 1983.
5. Воронина Т. А. Фармакология и токсикология, т. 41, № 6, с. 680—683, 1981.

6. Abita J., Chicheportliche R., Schvets H., Lazdunsky M. *Biochemistry*, v. 16, №9, p. 1838—1864, 1977.
7. Yost D. A., Anderson B. M. *J. Biol. Chem.*, v. 257, p. 767—777, 1982.
8. Oberdorster L., Lung R., Zimmer R. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 3¹, p. 197—204, 1975.
9. Haddy T. J., Scott J. B. *Physiol. Rev.*, v. 48, p. 688—707, 1968.
10. May H. D., Daly V. W. *Pharmacol. Rev.*, v. 8, p. 65—79, 1976.
11. Daziel K. — In: *Enzymes* (ed. Boyer P. P.), p. 166, Academic Press, N. Y., 1975.
12. Subramaniam S., Ross P. D. *Biochemistry*, v. 17, p. 2192—2197, 1978.
13. Кучмеровская Т. М., Пархомец П. К., Чичковская Г. В., Халимрадов А. Р., Романская О. П. *Нейрохимия*, т. 4, № 4, с. 373—378, 1985.
14. Арутюнян А. В., Мовсесян Н. О., Урианджян М. Г., Бирназян Л. Б. *Нейрохимия*, т. 3, № 1, с. 41—46, 1984.

Поступила 10. IX 1986

УДК 547.953+612.115+591.481+612+646

ЛИПИДЗАВИСИМОСТЬ ТРОМБОПЛАСТИНОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА, РЕГУЛИРУЮЩИХ ГЕМОКОАГУЛЯЦИЮ

КАРАГЕЗЯН К. Г., МКРТЧЯН М. Е., ОВАКИМЯН С. С.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Продemonстрирована зависимость гемокоагуляционной активности тромбопластинного тиса головного мозга развивающегося куриного эмбриона и мембран эритроцитов больных острым инфарктом миокарда от фосфолипидов, поддерживаемая эндогенным α -токоферолом в физиологической концентрации. Установлена также стабильность существующего в норме постоянства соотношений между нейтральными и кислыми фосфолипидами, оказывающими соответственно активирующее и ингибирующее воздействие на интенсивность свертывания крови.

Тромбопластины представляют собой сложные вещества липопротеидной природы, содержание которых в головном мозгу достигает значительных величин; их истинное биологическое значение до настоящего времени остается неразгаданным. Имея самое непосредственное отношение к процессу свертывания крови, тромбопластины, по всей вероятности, наделены и рядом других функциональных свойств, пока плохо изученных.

При возбужденных состояниях у собак методом определения артерио-венозной разницы показано повышение свертываемости крови, оттекающей от головного мозга, ее тромбопластической (ТП) активности [1, 2] и содержания в ней фосфолипидов (ФЛ) и холестерина [3—8] при соответствующих отклонениях в СМЖ [9, 10]. Аналогичные отклонения были обнаружены и при одностороннем удалении верхнего шейного симпатического ганглия [11, 12], экспериментально вызванных внут-

рисосудистых тромбозах [13—16], на различных стадиях эмбрионального развития организма [17], наряду с соответствующими расстройствами как в целом мозгу, так и в его отдельных частях [18, 19].

Цель настоящего исследования состояла в выявлении взаимозависимости между динамикой развития ТП-активности и количественными сдвигами функционально различных категорий ФЛ—нейтральных и кислых—в головном мозгу куриного эмбриона в предплодный и плодный периоды его становления, протективной роли α -токоферола (α -Т), направленной на поддержание нормального набора ФЛ, необходимого для обеспечения активности соответствующих липидзависимых ферментов, катализирующих начальные этапы процесса фосфатидогенеза.

Материалы и методы

Определение ТП-активности ткани мозга производили по модифицированной нами методике [20], основанной на измерении времени (в секундах протромбинового времени) образования сгустка тромбина *in vitro* в буферной (трис-НСI) среде при 37° и pH 7.4: укорочение времени тромбообразования расценивали как повышение ТП-активности. Экстракцию ФЛ производили по Folch [21], их фракционирование—методом одномерной восходящей хроматографии на бумаге Filtrak FN-11 (ГДР), пропитанной кремневой кислотой по Marinetti и Stulzy [22] в модификации Смирнова и соавт. [23] и Карагезяна [24]. Определение активности глицерокиназы, глицерофосфатдегидрогеназы в прямой и обратной реакциях осуществляли по методике Kennedy [25].

Результаты и обсуждение

Предплодный период развития куриного эмбриона (8—12-й дни эмбриогенеза) характеризуется образованием мозга на 8-й день при отсутствии в нем ТП-активности, незначительным увеличением (на 15—20%) суммарного количества ФЛ преимущественно за счет нейтральных (фосфатидилхоллинов, лизофосфатидилхоллинов, сфингомиелинов и фосфатидилэтаноламинов) при противоположно направленных сдвигах содержания кислых ФЛ (фосфатидилсеринов, фосфатидилинозитов, кардиолипидов, фосфатидных кислот). Слабое проявление ТП-активности в ткани мозга эмбриона (110 с протромбинового времени) обнаруживалось на 14-й день развития, то есть в самом начале плодного периода, охватывающего 14—19-е дни эмбриогенеза. Эти изменения совпадали с увеличением содержания кислых и, особенно, нейтральных ФЛ. Содержание последних к концу плодного периода по сравнению с 8-м днем развития возрастало более чем в 2,5 раза и это сопровождалось значительным увеличением ТП-активности (снижение протромбинового времени примерно до 45 с), в 2,4 раза превышавшей ее величину на 14-й день эмбрионального развития.

Если в конце предплодного периода отношение нейтральные ФЛ/кислые ФЛ возрастало по сравнению с его величиной в ткани мозга на 8-й день развития приблизительно на 20—25%, то на 18—19-й дни эмбриогенеза, то есть к концу внутриутробного периода развития оно оказыва-

лось в 2,5 раза больше, свидетельствуя тем самым о чувствительном повышении количества нейтральных ФЛ над содержанием кислых, выступающих в качестве ингибиторов ТП-активности.

Изменения в количественных соотношениях ФЛ сопровождались соответствующими колебаниями и в реакциях образования перекисей. Нами было показано, что после несколько повышенной интенсивности процесса свободнорадикального окисления липидов в предплодный период наступало его резкое падение в плодный период развития организма как в случае аскорбат-, так и NADPH-зависимой систем. Аналогичную картину наблюдали и на протяжении первых нескольких дней постнатального развития, также относящихся к периоду миелинизации. Начиная же с 7-го дня постнатальной жизни, интенсивность перекисного окисления липидов в обеих системах резко возрастала с последующим ее постепенным падением и установлением в пределах физиологически допустимых границ к 15-у дню постнатального развития. Примечательно, что описанные выше повышения и спады интенсивности перекисного окисления липидов в целом соответствовали обратонаправленным сдвигам содержания эндогенного α -Т, ответственного за нормальное состояние антиокислительной активности данной биологической системы.

На основании результатов проведенных исследований возникла необходимость в проведении специального исследования *in vivo* и *in vitro* эффектов α -Т как признанного антиоксиданта и изучения на этом фоне особенностей в сдвигах ТП-активности и соотношений ФЛ в срезах мозгах после их 2-часовой инкубации в среде трис-HCl буфера при 37°, рН 7,4 при наличии в ней α -Т в концентрации 10^{-5} — 10^{-2} мМ. В отсутствие антиоксиданта было констатировано падение ТП-активности приблизительно на 48—50%, параллельно развивавшееся уменьшение суммарного количества ФЛ примерно в тех же пределах и многократное возрастание выхода малонового диальдегида.

При добавлении же к среде α -Т в отмеченных выше концентрациях сколько-нибудь заметных отклонений в активности тромбопластинов и в количестве изученных нами показателей метаболизма липидов не происходило.

По-видимому, подобное протекторное действие α -Т носит общебиологический характер, поскольку оно прослеживается и при различных патологических состояниях. Так, например, при остром инфаркте миокарда это было обнаружено в случае мембран эритроцитов. Как явствует из данных, представленных на рис. 1, при ежедневной однократной пероральной даче больным с острым инфарктом миокарда в дополнение к обычно используемым при этом заболевании терапевтическим средствам α -Т в количестве 10 мг/кг массы тела, особенно в сочетании с синергистом—аскорбиновой кислотой в дозе 8—10 мг/кг массы тела, обнаруживалась отчетливо проявляющаяся тенденция к снижению высоких количеств малонового диальдегида уже на 7-й день после начала заболевания. Иначе говоря, эффект лимитирования интенсивности процесса перекисного окисления липидов наступал значительно раньше и был

более выражен по сравнению с теми позитивными изменениями, которые обычно обнаруживаются всего лишь на 21-й день после возникновения инфаркта при использовании терапевтических средств, не включающих антиоксиданты. Следует заметить, что эти сдвиги сопровождались также существенной нормализацией ТП-активности эритроцитарных мембран, что хорошо коррелировало с картиной постепенного упорядочения в них соотношений между фосфолипидами.

Полученные результаты позволяют заключить о мощном антиокси-

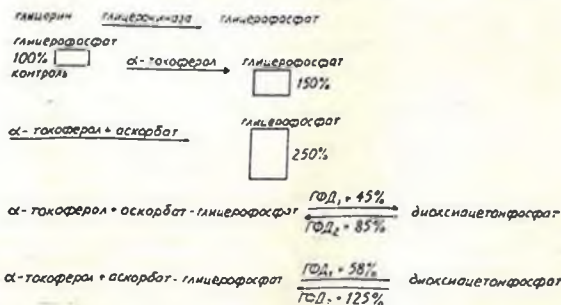


Рис. 1. Эффекты α -токоферола и его комбинаций с аскорбиновой кислотой на уровень глицерофосфата, активности глицерокиназы, а также глицерофосфатдегидрогеназы в прямой реакции (ГФД₁) превращения в диоксиацетонфосфат и в обратнонаправленной (ГФД₂)—по трансформации диоксиацетонфосфата в глицерофосфат в периферических отделах миокардиальной ткани коронаросклерозировавших белых крыс с острым инфарктом миокарда

дантном действии α -Т не только в процессе эмбриогенеза, но и в динамике формирования различных патологических состояний организма, в том числе и острого инфаркта миокарда. Однако, если антиоксидантные свойства α -Т изучены достаточно обстоятельно, этого нельзя сказать в отношении сведений о его роли в реакциях тканевого метаболизма. К этому имеются прямые предпосылки, вытекающие, в частности, из результатов проведенных нами исследований. Так, предпринятая нами антиоксидантная терапия при остром инфаркте миокарда способствовала предотвращению дальнейшего усугубления процесса образования перекисей и связанного с этим разрушения новых порций мембранных ФЛ. С другой стороны, она оказывала и стимулирующее воздействие на процессы репарации и восстановления морфо-функциональных свойств клеточных мембран, что возможно лишь в случае восполнения утраченных липидных компонентов мембранных структур. Достижение такого результата реально лишь при соответствующем стимулировании ферментных систем, катализирующих различные этапы процесса фосфатидогенеза.

В связи с этим мы сочли целесообразным изучение регуляторной роли α -Т в отношении ферментов, обеспечивающих высокий пул глицерофос-

фата—основного исходного соединения в реакциях биосинтеза ФЛ *de novo*: глицерокиназы, ГФД₁ и ГФД₂, катализирующих реакции взаимопревращения между глицерофосфатом и диоксиацетонфосфатом. Результаты этих исследований позволили осветить новые стороны биохимической характеристики α -Т как мощного стимулятора ферментов реакций фосфатидогенеза. Так, например, благодаря использованию α -Т, было установлено приблизительно 50%-ное увеличение выхода глицерофосфата; при сочетании же применения α -Т с аскорбиновой кислотой—увеличение выхода достигало 150%. С другой стороны, величины активности ГФД₁ и ГФД₂ под действием α -Т возрастали соответственно на 45 и 85%, а при комбинированной антиоксидантной терапии еще больше—на 58 и 125% (рис. 2). Иначе говоря, и в том и в другом случае возрастание

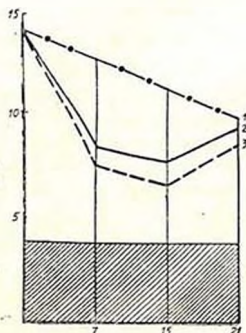


Рис. 2. Динамика интенсивности процесса ферментативного (NADPH-зависимого) перекисного окисления липидов (по выходу малонового диальдегида) в мембранах эритроцитов у больных острым инфарктом миокарда при различных формах терапевтического вмешательства. 1—обычный лечебный комплекс; 2—то же + α -токоферол; 3—то же + α -токоферол + аскорбиновая кислота. Заштрихованная часть—количество у доноров. Аналогичная картина имела место и в случае неферментативной (аскорбатзависимой) системы перекисного окисления липидов

активности ГФД₂ оказалось более наглядным, чем в случае ГФД₁, что указывает на имевшее место доминирование процесса трансформации диоксиацетонфосфата в глицерофосфат при несравненно менее выраженном темпе превращения последнего в диоксиацетонфосфат.

Все отмеченное выше является красноречивым доказательством важности роли α -Т и его синергиста—аскорбиновой кислоты в восполнении содержания мембранных ФЛ, а вместе с этим, и активности мембраносвязанных липидзависимых агентов, одним из важнейших представителей которых являются ТП мембран эритроцитов.

LIPID—DEPENDENCE OF BRAIN THROMBOPLASTINS REGULATING HAEMOCOAGULATION

KARAGOEZYAN K. G., MKRTCHYAN M. E., HOVAKIMYAN S.S.

Institute of Biochemistry, Armenian SSR Acad. Sci., Yerevan

Phospholipid-dependence of thromboplastic activity of chicken embryo brain tissue and erythrocyte membranes of patients suffering from acute heart infarction has been demonstrated. The role of endogenous

α -tocopherol in stabilization of qualitative and quantitative interrelation between neutral and acidic phospholipids that are natural stimulators and inhibitors, respectively of blood coagulation process is established.

ЛИТЕРАТУРА

1. Карагезян К. Г. Докл. АН СССР, т. 118, № 1, с. 142—145, 1958.
2. Карагезян К. Г., Урганджян М. Г. Физиол. журн. СССР, т. 48, № 11, с. 1377—1381, 1962.
3. Karageoslan K. G., Urgandzhian M. G. *Federat. Proc.*, part II, № 5, p. 1973—1975, 1963.
4. Karageoslan K. G. 6th International Congress of Biochemistry, N. Y., p. 580, VII—78, 1964.
5. Карагезян К. Г. Докл. АН СССР, т. 170, № 4, с. 985—988, 1966.
6. Карагезян К. Г. IV Всесоюзн. конф. по биохимии нервной системы (тезисы докл.), с. 52—53, Тарту, 1966.
7. Карагезян К. Г., Саакян С. С. Укр. біохім журн., т. 39, № 4, с. 424—429, 1967.
8. Карагезян К. Г. Биохимия, т. 33, № 5, с. 937—941, 1968.
9. Karageoslan K. G. 7th International Congress of Biochemistry (Abstracts), p. 743 E—89, Tokyo, abstr. IV, 1967.
10. Карагезян К. Г. Роль фосфолипидов в жизнедеятельности организма, Ереван, Айастан, 1972.
11. Карагезян К. Г., Овсепян А. М. Докл. АН СССР, т. 188, № 1, с. 253—255, 1969.
12. Карагезян К. Г., Овсепян А. М. III Всесоюзн. конф. по физиологии вегетативных функций (тезисы докл.), с. 90, Дилижан, 1971.
13. Карагезян К. Г., Овакимян С. С., Мирза-Авакян Г. А. Докл. АН СССР, т. 191, № 1, с. 250—252, 1970.
14. Карагезян К. Г., Овакимян С. С., Тевсянц А. В. Докл. АН СССР, т. 201, № 2, с. 486—489, 1971.
15. Карагезян К. Г., Амирханян О. М. Докл. АН СССР, т. 201, № 1, с. 238—241, 1971.
16. Карагезян К. Г., Овакимян С. С., Полюсбскова С. Д. Докл. АН СССР, т. 212, № 6, с. 1455—1457, 1971.
17. Karageoslan K. G. 12th World Congress of International Society for Fat Research (Abstracts), № 296, p. 156, Milan, 1974.
18. Карагезян К. Г., Овакимян С. С., Полюсбскова С. Д., Овсепян А. М. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 8, с. 6—8, 1975.
19. Karageoslan K. G., Merthcan M. E., Hovakimian S. S., Barsamyan A. G. *Proc. 16th ISF Congress (Fat Sci.)*, p. 915—921, Budapest, 1983.
20. Предтеченский В. Е. и др. Руководство по лабораторным методам исследования, изд. 4-е, М., Медгиз, 1950.
21. Folch J. *J. Biol. Chem.*, v. 174, p. 439—444, 1948.
22. Marinetti G. V., Stoltz E. *Biochim. et biophys. acta*, v. 168, p. 168, 1956.
23. Смирнов А. А., Чирковская Е. В., Манукян К. Г. Биохимия, т. 26, № 6, с. 1027—1033, 1961.
24. Карагезян К. Г. Лаб. дело, № 1, с. 23—26, 1969.
25. Kennedy P. *Methods in Enzymology*, N. Y.—L., Acad. Press, 1962.

Поступила 9. IX 1986

О БЕЛКОВОМ И ЛИПИДНОМ КОМПОНЕНТЕ ПРОТЕОЛИПИДОВ ИЗ РАЗНЫХ СУБКЛЕТОЧНЫХ ОБРАЗОВАНИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫ

МАНУКЯН К. Г., СТЕПАНЯН А. А., КАЗАРЯН Т. И.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Исследованы субклеточная локализация и белковый и липидный компоненты протеолипидов (ПЛ), выделенных из разных субклеточных структур головного мозга крысы: миелина, синапсом, митохондрий (несинаптических и синаптических), микросом. Выявлены определенные различия в белковом и аминокислотном составе ПЛ разных субклеточных образований, касающиеся в основном ПЛ миелина и митохондрий. Высказано предположение о существовании, по крайней мере, двух основных типов ПЛ в нервной ткани: миелинозного и митохондриального. Первый характерен для миелина и белого вещества; к нему приближаются по своему белковому компоненту также ПЛ микросом. Второй характерен как для несинаптических, так и синаптических митохондрий. ПЛ синапсом имеют свойства и того и другого.

Протеолипиды (ПЛ) представляют особую группу типично внутренних гидрофобных мембранных белков, связанных с липидами. Они являются необходимыми компонентами клеточных мембран нервной ткани (особенно миелина, богатого этими соединениями) и других органов, а также растительных и микробных клеток [1—3]. Полагают, что в зависимости от локализации ПЛ могут участвовать в выполнении ряда функций мембран, таких как модуляция жидкости липидного бислоя и регуляция через это активности ферментов, транспорт протонов и ионов, в том числе и фосфатных, следовательно, и синтез АТФ, связывание нейрорактивных веществ и т. д. [2—7].

В связи с различной локализацией и предполагаемой ролью ПЛ в мембранных образованиях клетки возникает вопрос о сходстве и отличиях ПЛ, входящих в состав разных субклеточных структур. В настоящем сообщении суммированы полученные нами данные относительно субклеточного распределения ПЛ в нервной ткани, а также белкового и липидного компонента ПЛ, выделенных в виде очищенных в разной степени от липидов липидно-белковых комплексов из разных субклеточных образований мозга крысы.

Выделение субклеточных образований из целого мозга белых крыс производили по схеме, представляющей комбинацию нескольких методов, предложенных различными авторами [8]. Фракции субсинаптических частиц коры больших полушарий мозга изолировали из подвергнутых шоку синапсом по De Robertis, Rodriguez de Lores Arnais [9].

ПЛ выделяли из промытых липидных экстрактов мозга и субклеточных образований методом эмульгирования-центрифугирования [10, 11]. Липолизированные осадки изолированных этим методом неочищенных ПЛ промывали для удаления менее прочно связанных липидов 300—600-кратным объемом смеси спирт-эфир 1:1 при -12 и $+23^{\circ}$, что способствовало, вероятно, последовательному удалению из

исочищенных ПЛ не только наименее прочно связанных липидов, но и части несколько более прочно связанных. Полученные в результате ПЛ обозначали как «очищенные».

Исследование содержания белка ПЛ в липидных экстрактах разных субклеточных образований целого мозга показало, что большая часть ПЛ локализована в миелине. Белок ПЛ двух миелиновых фракций, отличавшихся по размерам миелиновых фрагментов и обозначенных как «легкий» и «тяжелый» миелин, составлял около 70% от ПЛ общего гомогената (5,35 мг/г влажной массы), из которых 17,6% приходилось на долю ПЛ «тяжелого» миелина и 51,2% — «легкого». Белок ПЛ митохондрий и синапсом составлял 8,2 и 8,4, микросом — 4,9, а ядер — 1,9% от ПЛ общего гомогената.

Преобладающими в отношении белка ПЛ субфракциями синапсом коры больших полушарий мозга являются митохондрии, на долю которых приходилось около 59% белка всех ПЛ синапсом, составлявшего 0,35 мг/г влажной массы. 31,2% приходилось на долю ПЛ синаптических мембран и всего 1,7% — синаптических пузырьков. Содержание белка ПЛ синаптических митохондрий составляло 0,21 мг/г влажной массы коры мозга, почти вдвое ниже, чем несинаптических — 0,4 мг/г, однако его процентное содержание в суммарных белках того и другого типа митохондрий было почти одинаковым (3,24 и 3,94% соответственно).

ПЛ общего гомогената и разных субклеточных образований мозга оказались в общем сходными по своему аминокислотному составу, который характеризовался преобладанием неполярных аминокислот и относительно бедностью кислотными и основными аминокислотами (табл. 1). На фоне общего сходства имелись некоторые отличия, касающиеся в основном миелина и митохондрий. ПЛ митохондрий как несинаптических, так и синаптических отличались от ПЛ миелина более высоким содержанием аспарагиновой кислоты, метионина, лейцина, изолейцина, пролина и более низким — цистина, валина, треонина, тирозина. Различия были наиболее выражены в отношении серусодержащих аминокислот — метионина и цистина. ПЛ синапсом занимали промежуточное положение между ПЛ миелина и митохондрий. Как и митохондриальные ПЛ, они отличались более высоким содержанием пролина, изолейцина и более низким — тирозина. С другой стороны, по процентному содержанию серусодержащих аминокислот и лейцина они были ближе к ПЛ миелина. ПЛ несинаптических и синаптических митохондрий оказались очень сходными по аминокислотному составу.

Особенности аминокислотного состава ПЛ находят отражение в низком коэффициенте полярности этих белков, рассчитанном по Vandenkerkooi, Capaldi [12]. Для ПЛ, выделенных из общего гомогената и исследованных субклеточных образований мозга, он колебался в пределах 33,7—35,4 (табл. 1).

Определение с помощью электрофореза в ПААГ с ДДС-Na [13] белкового состава и величин M_r ПЛ, полученных из общего гомогената и разных субклеточных образований мозга, показало, что они несколько

отличались также по своему белковому составу, который был гетерогенен.

На рис. 1 представлены кривые сканирования диск-электрофореграмм ПЛ разных субклеточных образований мозга. При электрофоретическом разделении ПЛ, полученных из общего гомогената мозга крысы, как и из белого вещества мозга крупного рогатого скота [14], были обнаружены 4 основных полосы. Первая, наиболее интенсивно окрашенная, с M_r $28,9 \pm 0,57$ кД, соответствовала полосе ПЛ в миелине, вторая, тоже довольно интенсивная, с M_r $21 \pm 0,48$ кД—белку ДМ-20, который также имеет протеолипидную природу и, как показали последние исследования, отличается от основного ПЛ выпадением определенной внутренней ами-

Таблица 1

Аминокислотный состав очищенных протеолипидов из общего гомогената и разных субклеточных образований мозга (среднее из 2—4 определений)

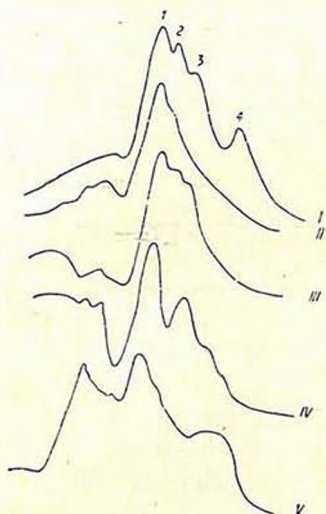
нокислотной последовательности [15]. Третья и особенно четвертая полосы с M_r $17,8 \pm 0,55$ и $13,2 \pm 0,65$ кД соответственно были менее выражены. Другие авторы также обнаружили несколько полос при изучении ПЛ из белого вещества мозга и других источников [2, 16], природа которых остается до сих пор неясной, тем более, что большинство этих ПЛ характеризуется присутствием только одной пары N- и C-концевых аминокислот.

Следует отметить, что и при исследовании белкового состава ПЛ основные различия выявились в отношении миелина и митохондрий.

При электрофоретическом разделении ПЛ, выделенных из миелина, были обнаружены две полосы: первая, интенсивно окрашенная, с M_r 26—30 кД соответствовала основной полосе ПЛ в белом веществе моз-

га и миелине, вторая, менее выраженная, с M_r 20—22 кД—белку ДМ-20. ПЛ митохондрий давали одну основную полосу с несколько более высокой M_r 29—35 кД и вторую тоже сравнительно хорошо выраженную низкомолекулярную полосу с M_r 13—17 кД. Кроме того, на диск-электрофореграммах ПЛ митохондрий обнаруживались две более высокомолекулярных полосы с M_r 44 и 55 кД, которые имелись и в ПЛ общего гомогената. Полосы, соответствующей белку ДМ-20, на диск-электрофореграммах ПЛ митохондрий практически не было. ПЛ микросом по своему белковому составу и величине M_r были в общем сходны с ПЛ миелина и белого вещества мозга.

Еще более отчетливо различия между двумя типами ПЛ и локали-



Кривые сканирования диск-электрофореграмм протеолипидов, изолированных из белого вещества головного мозга крупного рогатого скота (I) и субклеточных образований мозга крысы: «легкий» миелин (II), микросомы (III), общий гомогенат (IV), митохондрии несинаптические (V). 1—протеолипид, 2—белок ДМ-20. Гели окрашены амидо-черным 10В. А—620 нм. Движение слева направо

зация этих типов выявились при исследовании N- и C-концевых аминокислот ПЛ [17, 18], выделенных из разных отделов и разных субклеточных образований мозга. Как видно из табл. 2, N-концевой аминокислотой ПЛ миелина и белого вещества мозга является глицин, а C-концевой—фенилаланин. Соответствующими N- и C-концевыми аминокислотами ПЛ из несинаптических и синаптических митохондрий являются аспарагиновая кислота и лизин. В сером веществе больших полушарий, общем гомогенате мозга, где присутствуют и миелин и митохондрии, были найдены обе пары N- и C-концевых аминокислот. Ту же картину наблюдали в синапсомемах, где, по-видимому, присутствует миелиновый тип наряду с митохондриальным. N- и C-концевые аминокислоты микросомных ПЛ соответствовали миелиновому типу. Этого следовало ожидать, так как в этих субклеточных образованиях имеет в основном место синтез миелиновых ПЛ.

Таким образом, исследование белкового компонента выявило определенные различия между аминокислотным, белковым составом, а также

N- и C-концевыми аминокислотами ПЛ из разных субклеточных образований мозга, касающиеся главным образом ПЛ миелина и митохондрий.

Эти отличия четко проявились и при исследовании липидного компонента ПЛ, полученных из общего гомогената и разных субклеточных образований мозга. Был изучен фосфолипидный состав ПЛ, очищенных в разной степени от липидов [3]. Исследования показали, что фосфолипиды (ФЛ) составляют 30—50% массы неочищенных ПЛ из разных субклеточных образований и 8—25% от массы очищенных ПЛ в зависимости от условий очистки. Преобладающими ФЛ неочищенных ПЛ всех изученных субклеточных частиц оказались нейтральные ФЛ и главным образом фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин, составлявшие каждый 25—36% от суммы всех связанных ФЛ. На фоне этого сходства наметились различия в соотношениях кислых ФЛ, которые стано-

Таблица 2

N- и C-концевые аминокислоты белка ПЛ из разных отделов и субклеточных образований мозга

Животное, отделы и субклеточные образования мозга	N-концевая	C-концевая
Крупный рогатый скот		
Белое вещество больших полушарий	глицин	фенилаланин
Серое вещество больших полушарий	глицин, аспарагиновая	фенилаланин, лизин
Крыса		
Общий гомогенат	глицин, аспарагиновая	фенилаланин, лизин
Миелин МЛ	глицин	фенилаланин
Микросомы	глицин	фенилаланин
Митохондрии несинаптические	аспарагиновая	лизин
Митохондрии синаптические	аспарагиновая	лизин
Синапсомы	глицин, аспарагиновая	фенилаланин, лизин

вились все более явными по мере отмывки, приводившей к последовательному удалению менее прочно связанных нейтральных ФЛ и концентрации кислых, главным образом фосфатидилсерина, дифосфатидилглицерина и фосфатидилинозита. Как и в случае белкового компонента, различия касались в основном ПЛ миелина и митохондрий.

Для очищенных ПЛ обеих фракций миелина, как и белого вещества мозга, было характерно преобладание фосфатидилсерина, составлявшего 36% от суммы ФЛ в ПЛ, очищенных при—12°, и 62% в ПЛ, очищенных при 23°. В меньших количествах содержались фосфатидилинозит 8—14% и дифосфатидилглицерин—8—11%. В отличие от ПЛ миелина, в очищенных ПЛ из несинаптических, а также синаптических митохондрий основным ФЛ являлся типично митохондриальный липид—дифос-

фатидилглицерин, составлявший 34—30% соответственно в ФЛ ПЛ, очищенных при -12° , и 46—33% в ФЛ ПЛ, очищенных при 23° . Меньший процент приходился на долю фосфатидилсерина—10—15%, фосфатидилхолина—22—16% и фосфатидилинозита—13—9%. ПЛ синапсом, очищенные при -12° , характеризовались примерно одинаковым процентным содержанием фосфатидилсерина и дифосфатидилглицерина, которые были преобладающими ФЛ и составляли каждый около 23% от суммы ФЛ. В ПЛ синапсом, очищенных при 23° , доминировал дифосфатидилглицерин—33,8% от суммы ФЛ, а фосфатидилсерин составлял 23,8%.

Таким образом, различия в фосфолипидном составе ПЛ из разных субклеточных образований мозга обусловлены в основном разницей в содержании двух кислых ФЛ: фосфатидилсерина и дифосфатидилглицерина, первый из которых характерен для миелиновых, второй—митохондриальных ПЛ.

Сопоставляя данные относительно белкового и липидного компонента ПЛ разных субклеточных образований мозга, можно прийти к заключению о существовании двух основных типов ПЛ в нервной ткани: миелинового и митохондриального. К первому приближаются по своему белковому и липидному компоненту ПЛ микросом. Второй характерен для несинаптических и синаптических митохондрий, а также митохондрий клеток других органов, в частности сердца [19]. ПЛ синапсом имеют черты того и другого. Эти два типа являются, по-видимому, в основном, структурными компонентами мембран разных субклеточных образований нервной ткани, в которых, вероятно, играют и определенную функциональную роль. Однако не исключено присутствие в нервной ткани и других митохондрий ПЛ с иным белковым и липидным составом. Такие минорные низкомолекулярные ПЛ, выполняющие важные мембраносвязанные функции, выделены в настоящее время из различных животных тканей [2, 5, 6], а также из микробных клеток [2].

PROTEIN AND LIPID COMPONENT OF PROTEOLIPIDS FROM BRAIN DIFFERENT SUBCELLULAR STRUCTURES

MANUKYAN K. G., STEPANYAN A. A., KAZARYAN T. Y.

Institute of Biochemistry, Arm. SSR Acad. Sci, Yerevan

Data on subcellular localization, protein, lipid component of proteolipids (PL), isolated in the form of lipid-protein complexes free from lipid component to a different degree from total homogenate and different subcellular fractions of rat brain: myelin, synaptosomes, mitochondria (synaptic and non-synaptic), microsomes are presented. Differences in the protein and amino acid composition of myelin and mitochondrial PL are summarized. Data obtained point to the existence of at least 2 types of PL in nervous tissue—myelin and mitochondrial. The first type is characteristic for myelin and white matter, PL of mic-

rosomes is close to that type judged by the protein component. The 2nd type of PL is characteristic both for synaptic and nonsynaptic mitochondria. PL of synaptosomes shares the properties with both types of PL-s.

ЛИТЕРАТУРА

1. Folch—Pi J., Stoffyn P. J. Ann. N. Y., Acad. Sci., v. 195, p. 86—107, 1972.
2. Lees M. B., Sakura D. J., Sapirstein V. S., Curatolo W. Biochim. et biophys. acta, v. 559, p. 209—230, 1979.
3. Манукян К. Г. Нейрохимия, т. 1, с. 51—65, 1981.
4. Schlesinger M. J. Ann. Rev. Biochem., v. 50, p. 193—206, 1981.
5. Fosteson M. T., Sapirstein V. S. J. Membr. Biol., v. 63, p. 77—84, 1981.
6. Blondin J. A. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 87, p. 1087—1094, 1979.
7. Зайцева Г. Н., Яхнин А. В. Биохимия, т. 49, вып. 4, с. 577—584, 1984.
8. Манукян К. Г., Асвонян К. А., Степанян А. А., Киракосян А. Г., Казарян Т. Н.— В сб.: Вопросы биохимии мозга (под ред. Г. Х. Бунятыана), т. 12, с. 68—80. Изд-во АН АрмССР, Ереван, 1977.
9. De Robertis E., Rodrigues de Lores Arnais G. — In: Handbook of Neurochemistry (ed. A. Lajtha), New York—London, v. 2, p. 365, 1969.
10. Folch J., Webster C. R., Lees M. Feder. Proc., v. 18, part 1, p. 228, 1959.
11. Манукян К. Г., Киракосян А. Г., Асвонян К. А.—В сб.: Вопросы биохимии мозга (под ред. Г. Х. Бунятыана), т. 7, с. 140—149, Изд-во АН АрмССР, Ереван, 1972.
12. Vanderkooi G., Capaldi R. A. Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 195, p. 135—138, 1972.
13. Манукян К. Г., Киракосян А. Г., Асвонян К. А., Степанян А. А.—В сб.: Вопросы биохимии мозга (под ред. Г. Х. Бунятыана), т. 11, с. 116—128, Изд-во АН АрмССР, Ереван, 1976.
14. Манукян К. Г., Степанян А. А. Тезисы докл. Всесоюзн. симпозиума «Метаболизм белков центральной нервной системы», с. 89—90, Диспронетровск, 1978.
15. Triflitt E., Skulidis G., Helynk G., Lepage P., Sorokine O., Drosselaer A., Liu B. C. R. Acad. Sci., Paris, t. 300, s. 111. №7, p. 241—246, 1985.
16. Chan D. S., Lees M. B. Biochemistry, v. 13, p. 2704—2712, 1974.
17. Казарян Т. Н., Манукян К. Г. Биол. журн. Армении, т. 34, № 5, с. 502—505, 1981.
18. Казарян Т. Н., Асвонян К. А., Манукян К. Г. Биол. журн. Армении, т. 36, № 4, с. 322—325, 1984.
19. Асвонян К. А., Манукян К. Г., Казарян Т. Н. Тезисы докл. IV Всесоюзн. симпозиума по биохимии липидов, с. 68, Киев 1983.

Поступила 9. IX 1986

СОДЕРЖАНИЕ

Галоян А. А. Гликопептидные гормоны гипоталамуса в регуляции метаболизма Са ²⁺ , циклических нуклеотидов и катехоламинов	3
Боулатов А. А. Следовые амины как нейротрансмиттеры и нейромодуляторы	9
Лишко В. К., Терлецкая Я. Т., Гегелашвили Г. К. Бесклеточная модель нейро-секреции	17
Ашмарин И. П. Гипотеза о существовании новой высшей категории в иерархии регуляторных пептидов	23
Полнов А. А., Бельский М. А., Данилова О. А. Иммуноцитохимическое исследование локализации некоторых пептидных нейрогормонов в гипоталамо-гипофизарном комплексе позвоночных	28
Хашим Дж. А. Белки, пептиды и аутоиммунные поражения миелина	33
Брусов О. С., Яковлев А. Г., Плотицков В. В., Барам Г. И., Грачев М. А., Курмарев В. П., Кудрякова Т. Б., Борозков А. А., Кобзев В. Ф. Поиск эндогенных пептидных лигандов бензодиазепиновых рецепторов: выделение и молекулярно-генетические исследования	43
Герштейн Л. М. Нейрохимические и нейрофизиологические перестройки в структурах мозга при воздействии некоторых нейропептидов	51
Хаватова Е. М., Доведова Е. А., Михалева И. И. Метаболическая эффективность пептида дельта-сна при стрессорных состояниях организма	57
Тириаян Р. А. Реакция опиоидной системы головного мозга на стресс и ее зависимость от состояния катехоламинергической системы	63
Априкян Г. В., Князян В. А., Шагинян В. А., Ахвердян Э. С. Роль N-ацетил-L-аспарагиновой кислоты в механизме действия нейромедиаторных амфинокислот	71
Березин В. А., Шевченко Г. М., Бунытиян Г. Г., Халандский А. С., Нелдзевский В. С. Специфический белок промежуточных филаментов в нервной ткани и опухлях	77
Липкин В. М., Мурадов Х. Г., Думлер И. А., Этимюф Р. Н. Структура и функция специфического белка сетчатки быка—ингибитора 3',5'-сСМР-фосфоэстеразы	82
Микадзе Д. Г., Абутидзе К. Д., Саргания Н. А. Рецепторы нейролептиков и их связь с протеникиназными реакциями	89
Демин Н. Н., Шортанова Т. Х., Головина Т. Н. Количественные сдвиги белков и РНК в клетках ядер ствола головного мозга в динамике зимней спячки сусликов	95
Теттаманти Г., Фиорилли А., Венсрандо Б. Взаимодействие ганглиозидов с ферментами головного мозга на примере цитозольной синаптазы	102
Срапионян Р. М. Специфические гликопротеины гипоталамуса	109
Симс В. Э., Хедер Г., Эме П. Взаимодействие вещества Р и ангиотензинпревращающего фермента	116
Азарян А. В., Галоян А. А. Изучение экзопептидазной активности катепсина В и специфичности катепсина D и высокомолекулярной аспартильной протеазы головного мозга с помощью хромофорных и вазоактивных пептидов	125
Халмуратов А. Г., Кучмеровская Т. М., Пархомец П. К., Клименко А. П., Арутюнян А. В., Мовсесян Н. О. Влияние аналогов NAD на его связывание синаптическими мембранами коры больших полушарий головного мозга крыс	133
Карачезян К. Г., Мкртчян М. Е., Овакимян С. С. Липидзависимость тромбопластинов головного мозга, регулирующих гемокоагуляцию	138
Манукян К. Г., Степанян А. А., Казарян Т. И. О белковом и липидном компоненте «протеолипидов» разных субклеточных образований головного мозга крысы	144

CONTENTS

<i>Galoyan A. A.</i> Involvement of glycopeptide hormones from hypothalamus in the regulation of metabolism of Ca^{2+} , cyclic nucleotides and catecholamines	2
<i>Boulton A. A.</i> Trace amines as neurotransmitters and neuromodulators	9
<i>Lishko V. K., Terletskaia Ya. T., Gegelashvili G. K.</i> Cell-free model of neurosecretion	17
<i>Ashmarin I. P.</i> Hypothesis of the existence of a new higher category in the hierarchy of regulatory peptides	23
<i>Polenov A. L., Belenky M. A., Danilova O. A.</i> Immuno-cytochemical localization of some peptide hormones in hypothalamo-hypophyseal tract of vertebrates	28
<i>Hashim G. A.</i> Myelin proteins, peptides and autoimmune disease of myelin	33
<i>Brusov O. V., Yakovlev A. G., Plotnikov V. V., Baram G. I., Gradnev M. A., Kumarev V. P., Kudryakova T. B., Borovkov A. A., Kobzev V. F.</i> Search for endogenous peptide ligands of benzodiazepine receptors: isolation and genetic studies	43
<i>Gershtein L. M.</i> Neurochemical and neurophysiological shifts in brain structures under the effect of some neuropeptides	51
<i>Khvatova E. M., Dovedova E. L., Mikhaleva I. I.</i> Metabolic effect of delta sleep inducing peptide in stress	57
<i>Tigranian R. A.</i> Reaction of brain opioid system on stress and its dependence from state of catecholaminergic system	63
<i>Aprikan G. V., Knarian V. A., Shahinian V. A., Akhverdian E. S.</i> Role of N-acetyl-L-aspartic acid in the mechanism of action of neurotransmitter amino acids	71
<i>Berezin V. A., Shevchenko G. M., Buniatian G. H., Khalansky A. S., Nedzvet-ski V. S.</i> Specific protein of intermediate filaments in normal nervous tissue and in brain tumours	77
<i>Lipkin V. M., Muradov H. H., Dumler L. L., Etingof R. N.</i> Structure and function of bovine retinal specific protein—inhibitor of $3', 5'$ -cGMP phosphodiesterase	82
<i>Mikeladze D. G., Abutidze K. D., Surtanija N. A.</i> Receptors of neuroleptics and their connection with protein kinase reactions	89
<i>Doemin N. N., Shortanova T. Kh., Golovina T. N.</i> Quantitative protein and RNA changes in brain stem nuclei cells in dynamics of ground squirrel hibernation	95
<i>Tettamanti G., Fiorilli A., Venerando B.</i> Enzyme-ganglioside interactions in the brain: the example of cytosolic sialidase	102
<i>Strapionian R. M.</i> Specific proteins of hypothalamus	109
<i>Siems W.-F., Heder G., Oehme P.</i> Reactions between substance P and angiotensin-converting enzyme	116
<i>Azaryan A., Galoyan A.</i> Use of chromophoric and vasoactive peptides for the study of exopeptidase activity of cathepsin B and specificity of cathepsin D and high M_r aspartic proteinase from brain tissue	125
<i>Khalmuratov A. G., Kuchmerovskaya T. M., Parkhomets P. K., Klimenko A. P., Arutounyan A. V., Movsesyan N. O.</i> Effect of NAD-analogs on its binding with rat brain synaptic membranes	133
<i>Karagoezyan K. G., Mkrtchyan M. E., Hovakimyan S. S.</i> Lipid-dependence of brain thromboplastins regulating haemocoagulation	138
<i>Manukyan K. G., Stepanyan A. A., Kazaryan T. Y.</i> Protein and lipid component of proteolipids from brain different subcellular structures	144

К СВЕДЕНИЮ ЧИТАТЕЛЕЙ!

Журнал «Нейрохимия» (орган АН СССР и АН АрмССР) публикует статьи по актуальным вопросам функциональной нейрохимии, касающимся структуры и биологической роли специфических белков, нейропептидов, нуклеиновых кислот и нуклеотидов, липидов и других соединений нервной ткани, биохимии нейротрансмиттеров и их рецепторов, глии и нейронов, хромоафинных гранул и т. д. В работе журнала принимают участие, наряду с советскими нейрохимиками, известные зарубежные ученые.

С 1984 г. журнал «НЕЙРОХИМИЯ» издается на английском языке.

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

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

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

Стандартные обозначения некоторых тривиальных названий химических соединений

Ala ^a —аланин	Leu—лейцин
AMP, ADP, APT ^{a*} —аденозин-5'-моно-, ди- и трифосфаты	Lys—лизин
cAMP—циклический аденозинмонофосфат	Man—манноза
Arg ^a —аргининоз	Met—метионин
Arg—аргинин	NAD, NADH — никотинамидадениндинуклеотид и его восстановительная форма
Asp—аспарагиновая кислота	NADP, NADPH — никотинамидадениндинуклеотидфосфат и его восстановительная форма
Asx—аспарагиновая кислота или аспарагин	NMn — никотинамидмононуклеотид
CMP, CDP, CTP—цитидин-5'-моно-, ди- и трифосфаты	Orn—орнитин
CoA—коэнзим А	Phe—фенилаланин
CoASAc—ацетилкоэнзим А	P _i —неорганический фосфат
Cys—цистеин	PP _i —неорганический пиродифосфат
FAD, FADH ₂ — флавинадениндинуклеотид и его восстановительная форма	Pro—пролин
FMN, FMNH ₂ — флавоинмононуклеотид и его восстановительная форма	Rib, dRib—рибоза, 2-дезоксирибоза
Fuc—фруктоза	Q, QH ₂ —убихинон, убихинол
Fru—фруктоза	Scr—серин
Gal—галактоза	Thr—треонин
Glc—глюкоза	1MP, TDP, TTP—рибозилтимин-5'-моно-, ди- и трифосфаты
GlcA—глюкуроновая кислота (аналогично другим уровневым к-там)	Tpr—триптофан
GlcN—глюкозамин	Tyr—тирозин
GlcNAc—ацетилглюкозамин (аналогично другим дезоксисахарам и их ацетилпроизводным)	UMP, UDP, UTP—уридин-5'-моно-, ди- и трифосфаты
Gln—глутамин	Val—валин
Glu—глутаминовая кислота	АКТГ—адренокортикотропный гормон
Glx—глутамин или глутаминовая кислота	АХ—ацетилхолин
Gly—глицин	ГАМК—гамма-аминомасляная кислота
GMP, GDP, GTP—гуанозин-5'-моно-, ди- и трифосфаты	ДАС-На—додецилсульфат натрия
GSH, GSSG—глутатион и его окисленная форма	ДОФА—диоксифенилаланин
His—гистидин	ДНК—дезоксирибонуклеиновая кислота
Hyl—оксализин	ДОХ-На—дезоксиксолол натрия
Hyp—оксипролин	РНК—рибонуклеиновая кислота
Ile—изолейцин	pРНК—рибосомная РНК
IMP, IDP, ITP—инозин-5'-моно-, ди- и трифосфаты	mРНК—матричная (информационная, ядерная) РНК
	tРНК—транспортная РНК
	Glu-tРНК и т. п.—аминоацилпроизводные РНК
	ТХУ—трихлоруксусная кислота
	трис—трис (оксиметил) — аминометан
	ЭГТА—этиленгликольтетраацетат
	ЭДТА—этилендиаминтетраацетат

^aСтандартные обозначения аминокислот и моносахаридов допустимо употреблять в сокращенном виде при написании структур, а также в таблицах и на рисунках.

^{a*}Соответствующие дезоксирибонуклеотиды обозначаются путем добавления латинской строчной буквы d перед трехбуквенным символом.

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

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

Примечание. Сокращения для названий ферментов, как например, ГДГ, ГДК, ГФБДГ и т. д., не допускаются. Однако нет возражений против замены названия субстрата, входящего в тривиальное наименование фермента, стандартной аббревиатурой, например: АТРаза, РНКаза, NADH дегидрогеназа и т. п. Химические элементы следует обозначать символами, а простые неорганические соединения—формулами, например: $MgCl_2$. Символы ионов следует писать так: Mg^{2+} , Cl^- , PO_4^{3-} .

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

1. В журнале публикуются оригинальные статьи, содержащие результаты экспериментальных исследований по биохимии нервной системы, обзоры по важнейшим вопросам современной нейробиологии, рецензии на новые издания и актуальная научная хроника.

Объем рукописи (включая резюме, список литературы и иллюстрации) не должен превышать 15 с., напечатанных на машинке через 2 интервала. Объем обзоров не должен превышать 20 с., кратких сообщений, рецензий и хроники—4 с., а писем в редакцию—2 с.

Рукопись статьи должна подписываться всеми авторами (2 экз.) и сопровождаться актом экспертизы (2 экз.) и извлечением от учреждения.

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

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

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

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

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

Фамилии иностранных авторов даются в тексте на языке оригинала.

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

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

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

ссылки даются в квадратных скобках. Цитируемая литература—в списке приводится в следующем порядке: порядковый номер, фамилия и инициалы авторов на языке оригинала, название журнала, том, номер или выпуск, страницы, год издания. В случае сплошной нумерации страниц тома номер выпуска не указывать. При цитировании книги указывается также, под чьей редакцией она издана, название издательства и место издания. Например:

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

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

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

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

10. Редакция высылает авторам бесплатно отиски опубликованной статьи.

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

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

13. Корректуру авторам редакция не высылает.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

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

The Editorial Office

Journal „Neirokhimia“

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

Arrangement of the manuscript

1. The first page should bear:

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

2. Each paper should be preceded by a Summary giving a brief account to the most relevant contributions of the paper (100-200 words, 1.5 spacing). It's important to indicate the goal, the methods, the results and conclusions.

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

4. Bibliographic citations should be made in numerical order (not more than 25 References for articles, 8)—for reviews, 15—for short communications), in square brackets and in order of their citation in the text. The form of listed references is as follows: surname and initials of authors, journal name, volume and issue number, inclusive page numbers and year. For book titles the style is similar but contains book title—"In" followed by initials, surname of editor, the name and location of the publishing company.

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

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

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