

том 6, № 2, 1987

ISSN 0203-493X

НЕЙРОХИМИЯ

ՆԵՅԴՈՔԻՄԻԱ



АКАДЕМИЯ НАУК СССР
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

НЕЙРОХИМИЯ ՀԵՅՐՈՔԻՄԻԱ

ТОМ 6, ВЫП. 2
АПРЕЛЬ — ИЮНЬ

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 7.04. 1987 г. Подписано к печати 15.06. 1987 г. ВФ 01661.
Бумага № 1,70×108¹/₁₆. Высокая печать. лист. 9,5+1 вкл. Усл. печ. лист. 13,48.
Учет.-изд. 10,23. Тираж 590. Заказ 261. Издат. 7115.
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. КОСТИОК, 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. Н. КРУГЛИКОВ, В. Г. МХИТАРЯН, В. С. ОГАНЕСЯН, М. И. ПРО-
ХОРОБА, А. Д. РЕВА, А. А. СИМОНЯН, А. М. УТЕВСКИЙ,
Е. М. ХВАТОВА, А. С. ЧЕРКАСОВА, Р. Н. ЭТИНГОВ

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.



УДК 577.175.3

МОДЕЛЬНАЯ ХОЛИНЕРГИЧЕСКАЯ СИСТЕМА: ПРОШЛЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ В БУДУЩЕМ

*УИТТАКЕР В. П.

Отдел нейрохимии, Институт биофизической химии им. Макса Планка, Геттинген, ФРГ

Модельные системы в биологии. Возможно, что первое высказывание о полезности использования модельных систем в биологии было сделано Thomas Henry Huxley в предисловии к его книге по зоологии рака, опубликованной в 1880 г. [1]. Он заявил:

«Когда я писал книгу о раке, моим намерением не было представить зоологическую монографию об этой группе животных, и я не ставил перед собой цель написать трактат о нашем английском раке... то, что я имел в виду, гораздо скромнее, хотя при современном состоянии науки не менее полезно. В самом деле, я хотел показать, как тщательное изучение одного из обычных и весьма незначительных животных ведет шаг за шагом от ограниченного познания к широким обобщениям и к наиболее трудным проблемам зоологии, даже биологической науки вообще».

Со времен Huxley нейробиологи широко использовали модельные системы (табл. 1): гигантский аксон кальмара, который оказался идеальной модельной системой для изучения распространения потенциала дей-

Таблица 1

Модельные системы в нейробиологии

Вид животного	Структура	Исследованные функции	Авторы
Моллюск морской амен	Нейронная сеть	Простые системы обучения	Kandel, Strumwasser
Кальмар Рак	Гигантский аксон Рецептор расщепления	Потенциал действия Торможение	Young, Hodgkin, Huxley Adamkiewicz, Elliott
Электрический скат	Электромоторная система	Накопление и выход нейромедиатора	Whittaker
Пиявка	Брюшная цепочка	Рецептор АХ Плавательный рефлекс	Karlin, Raftery, Changeux, Numa, Nicholls
Омар	Брюшная цепочка	Специфические клеточные антигены Нейромедиаторы, опосредование	Nicholls Kravitz

* Статья оформлена по материалам доклада, представленного на конференцию «Функциональная нейрохимия белков, пептидов, трансмисмиттеров», Ереван, 1986 г. (печатается с сокращениями).

ствия: морской моллюск *Aplysia* (морской заяц), так много используемый в качестве простой модели обучения и поведения: приведший к идентифицированию ГАМК как тормозного синаптического нейромедиатора рецептор растяжения рака, которого изучал Huxley. Это только три модельные системы из многих, которые можно было бы упомянуть.

Эта статья посвящена модельной системе, которую мы и другие исследователи широко и интенсивно использовали в прошедшие 10—15 лет — электромоторной системе электрического ската (*Torpedo*). Я надеюсь показать, что способности этой системы далеко не исчерпаны, и она предоставляет благоприятные возможности для исследований в 90-х годах.

На рис. 1, а и в представлена электромоторная система электрического ската (*Torpedo*) с телами клеток в электрических долях, миелинизированными аксонами, образующими 4 больших нервных ствола, которые между жабрами проникают в электрический орган.

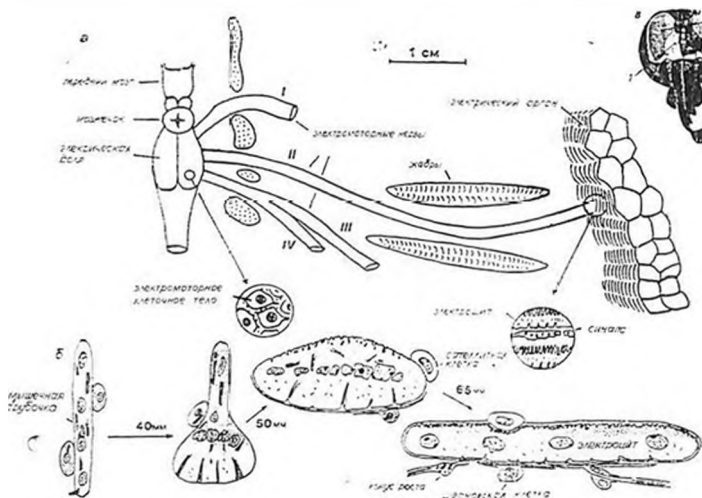


Рис. 1. а — электромоторная система электрического ската (*Torpedo*); б — развитие электроцитов мышечных трубочек; в — частично вскрытая рыба: электрическая доля (1), нервы (2), электрический орган (3)

моторные нейроны электрических долей представляют собой холиннергические клетки, их тела расположены в парных ядрах, выступающих на стволе головного мозга рыбы, а пресинаптические окончания их аксонов находятся в электрическом органе. Последний состоит из размещенных в сотовидном порядке пакетов уплощенных электроцитов, вентральную поверхность которых и покрывают пресинаптические нервные окончания. Холинореактивные постсинаптические клетки электрического органа (электроциты) развиваются (рис. 1, б) из вертикально ориенти-

рованных мышечных трубочек в процессе роста эмбрионов (в длину) от 40 до 65 мм. Хотя клетки электрического органа мышечные по происхождению, он во много раз богаче иннервирован, чем мышцы, и содержит синаптического материала приблизительно в 1000 раз больше, чем эквивалентная по массе мышечная ткань. По мере роста ската эмбриональные электроциты увеличиваются и за счет сливающихся с ними расположенных на них сателлитных клеток (рис. 1, б), а шванновские клетки постепенно покрывают нервные окончания, представленные на том же рисунке врастающими конусами роста.

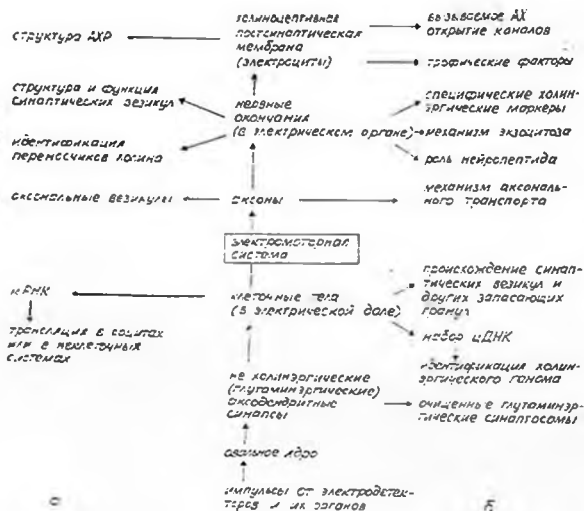


Рис. 2. Разработка проблем электромоторной системы: а—изучение далеко продвинуто, б—только начато

В общем, эта система является идеальной для изучения биохимии холинергической передачи. Однако возможность ее использования в нейробиологии гораздо шире. Так, при ее помощи можно было изучать такие проблемы, как контроль над развитием трофических факторов, явление запрограммированной клеточной смерти и наличие в той или другой условно-нейромедиаторной системе физиологически активных нейропептидов.

На рис. 2 представлены некоторые проблемы изучения электромоторной системы: те, разрешение которых далеко продвинуто (а), и те, разработка которых в настоящее время еще только начата (б), и их разрешение потребует усилий и в 90-х годах. Все это не умозрительная программа, а практические проекты. В докладе будут лишь кратко про-

на чем и сосредоточено внимание нашей лаборатории.

Никотиновый ацетилхолиновый рецептор. Одной из задач в современной молекулярной нейробиологии несомненно является изолирование никотинового ацетилхолинового рецептора из электрического органа, химическая характеристика этого рецептора при помощи методов белковой химии и молекулярной генетики, включение его в искусственные липидные мембраны и открытие его участия в таком тяжелом заболевании, как миастения (*myasthenia gravis*) [2]. Эти работы завершились установлением с помощью кДНК-метода полной последовательности составляющих рецептор четырех пептидов [3]. Хотя на этой основе с дополнением результатов исследования при помощи высокоразрешающей электронной микроскопии можно судить о третичной структуре этих пептидов и их расположении в мембране, в настоящее время еще не известно, каким образом АХ модифицирует рецептор для того, чтобы открыть образуемые им ионные каналы. Одним из подходов для решения этого вопроса являются опыты с систематическими изменениями в последовательности пептидов и тестировании тех эффектов, которые эти изменения производят на реконструированную систему. При этом можно выявить ту последовательность, которая играет ключевую роль в функции рецептора.

Трофические факторы. При работе с совместными культурами тканей эмбрионального электрического органа и электрической доли мозга мои сотрудники Richardson, Rimschen и Fox [4] обнаружили два трофических фактора, образуемых электрическим органом: 1) термостабильный диализуемый нейротрофический фактор, необходимый для жизнеспособности тел электромоторных клеток в электрической доле мозга, и 2) термолабильный недиализуемый холинотрофический фактор, вызывающий экспрессию холинергических свойств у клеток электрической доли. Идентифицирование этих факторов является интересной задачей для будущих исследований.

На рис. 3 представлена краткая сводка данных, свидетельствующих в пользу существования этих факторов. Можно видеть (рис. 3, а), что электромоторные нейроны 40-миллиметрового эмбриона хорошо выжили в культуре и их холинацетилтрансферазная (ХАТ) активность **повышалась, если в среду был добавлен экстракт электрического органа** (рис. 3, а). Если же использовать как тестирующую систему половину транзита (рис. 3, б), то нейротрофическая и ХАТ-активность **начинают обнаруживаться** в электрических органах эмбрионов, когда они достигают длины в 80 мм. При этом играют роль уже упомянутые выше два фактора—диализуемый нейротрофический и недиализуемый термолабильный холинотрофический. Так, диализ значительно уменьшал содержание нейротрофического фактора (клетки погибали), тогда как нагревание не влияло на выживание, но значительно снижало экспрессию ХАТ. В то же время оба фактора оказались холодоустойчивыми. Далее выяснилось, что, видимо,

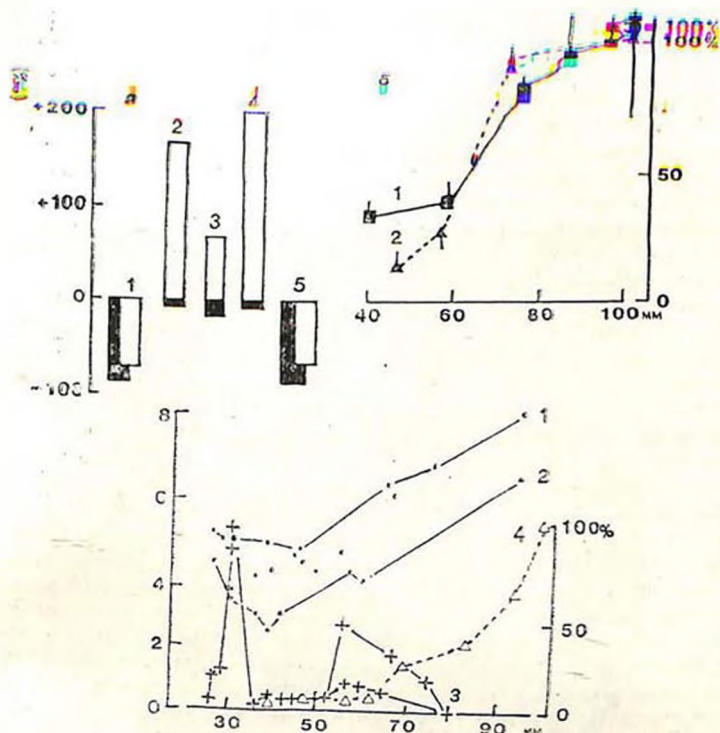


Рис. 3. а—повышение (+) или снижение (—) числа жизнеспособных эмбриональных электромоторных нейронов (черные столбики, в %) и холинэстеразной активности (белые столбики, в %) в эксплантатах ткани электрической доли 50—60-миллиметровых эмбрионов электрического ската, находившихся в культуральной среде без добавления (1) или с добавлением экстракта электрического органа 105-миллиметрового эмбриона, нативного (2) или подвергнутого нагреванию (3), охлаждению (4), диализу (5); по оси ординат—изменения, в %; б—ответ эксплантата ткани электрической доли 50—60-миллиметрового эмбриона на экстракт электрического органа 40—110-миллиметровых эмбрионов.

по оси абсцисс—длина эмбриона, в мм; по оси ординат (слева)—число клеток, $\times 10^{-4}$, по оси ординат (справа)—ферментативная активность по сравнению с новорожденными, в %. Данные а и б относятся к 1-недельному периоду

недифференцируемый холинотрофический фактор не способен оказывать эффект в отсутствие нейротрофического (ср. рис. 3, а. белые столбики 2 и 5). Так, данные, представленные на рис. 3, в, показывают, что продукция нейротрофического фактора эмбриональным электрическим органом начинается лишь у 80-миллиметровых эмбрионов как раз в тот период, когда волна гибели клеток в электрической доле спадает и число жизнеспособных клеток повышается вместе с увеличением и ХАТ-активности. Это свидетельствует о том, что препрограммированный синтез трофических факторов в развивающемся электрическом органе стабилизирует размер пула электромоторных нейронов и вызывает в них синтез ХАТ именно перед началом функционального синаптогенеза, имеющего место, когда эмбрионы достигают величины 90-100 мм.

Антисыворотки, связанные с нейромедиаторами, как специфические холинэргические маркеры. Мы много занимались также идентифицированием специфических холинэргических маркеров, используя антитела, выработанные на очень чистые препараты электромоторных синаптических пузырьков и пресинаптических плазматических мембран, которые были выделены методами субцеллюлярного фракционирования. Первым из таких маркеров явился специфический протеогликан пузырьков (СПГП). Он позволил нам следить гистохимически за образованием пузырьков в теле клетки, их передвижением по аксону и накоплением в нервных окончаниях [5, 6]. На рис. 4, а можно рассмотреть сделавшиеся видимыми под влиянием анти-СПГП-антисыворотки и меченого флуоресцентом второго антитела пузырьки, готовые к переходу по аксону из тела электромоторного нейрона. На рис. 4, б виден СПГП, скопившийся в аксоне проксимально от лигатуры, а на рис. 4, г заметно уменьшение содержания СПГП в пресинаптическом окончании, вызванное перевязкой аксона (ср. рис. 4, г с картиной в интактном органе на рис. 4, а).

В других работах [7—9] мы идентифицировали специфический холинэргический маркер (СХМ-1)—трисналоганглиозид необычной конфигурации. На основе недавней работы Tettamanti и его сотрудников, выполненной вместе с нами, в этом веществе один остаток снаховой кислоты присоединен к ацетилглюкозаминовому остатку. Антисыворотка к этому ганглиозиду специфически вызывает избирательный лизис комплемента холинэргической субпопуляции синапсом головного мозга [8].

На рис. 5, а показан избирательный выход ХАТ из препаратов синапсом коры больших полушарий мозга морской свинки, подвергнутых лизису комплемента в присутствии антисыворотки к анти-СХМ-1. При этом маркер адренэргических синапсом (тирозингидроксилаза) не выходил: выходило около 10% цитоплазматического маркера — лактатдегидрогеназы. Это соответствует той доле синапсомной цитоплазмы, которая отвечает за холинэргическую субпопуляцию пузырьков. На рис. 5, б представлены подобные результаты, полученные в случае препаратов синапсом, нагруженных перед лизисом радиоактивной деоксиглюкозой (в качестве цитоплазматического маркера) и мечеными же нейромедиаторами — глутаматом, ГАМК, дофамином, норадреналином

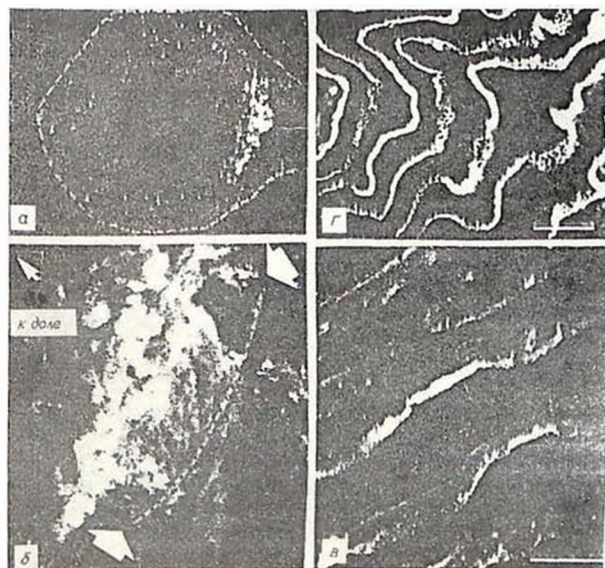


Рис. 4. а—СПП-положительные органеллы (синаптические пузырьки), готовые к выходу из перикариона (очерчено) электромоторного нейрона; б—СПП-иммунореактивность, накопившаяся над перетяжкой (между стрелками); в и г—СПП-иммунореактивность в окончаниях электромоторного нерва к центральной поверхности электроцита, когда аксон перетянут (в) и интактен (г)

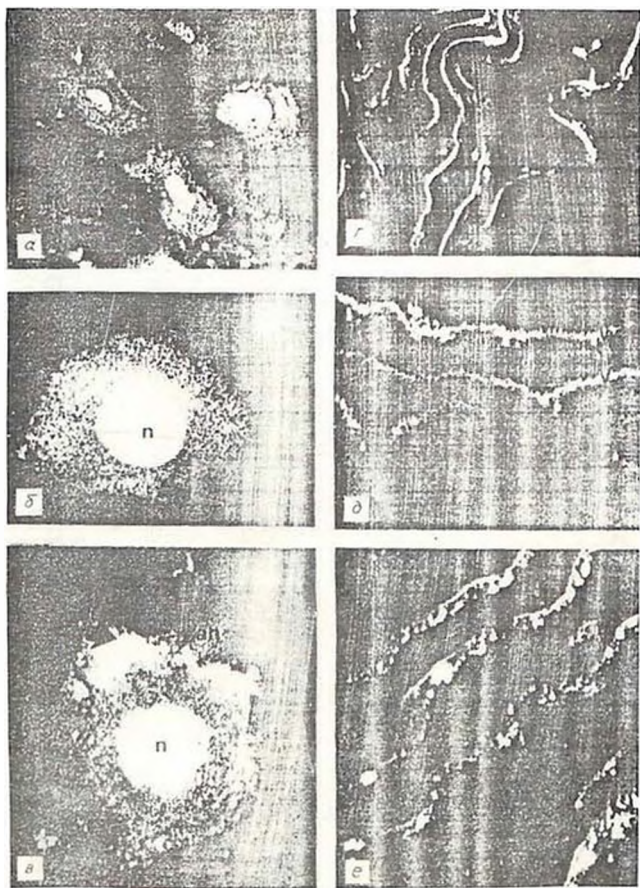


Рис. 6. ВКП-подобная иммунореактивность в криостатных срезах электрической доли (а, б, н) и электрического органа (i, л, с) после перенязки электромоторных аксонов (а, б, i, л) и в нерве (в, е); б и л—увеличение структур в полях, соответствующих а и i. Аккумуляция западающих гранул наблюдается в аксонном бугорке. Клеточное ядро (n) также окрашивается

и серотонином (в качестве маркеров соответствующих синаптических субпопуляций) [10]. При этом также подвергалась лизису лишь холинергическая субпопуляция, а количество высвобождавшейся деоксиглюкозы соответствовало ее фракции, захваченной этой субпопуляцией. Наоборот, лизис комплемента неспецифических антикортикальных антител сопровождался выходом вместе с деоксиглюкозой и всех нейромедиаторов. Эти эксперименты также показали насколько специфичен захват различных нейромедиаторов разными субпопуляциями.

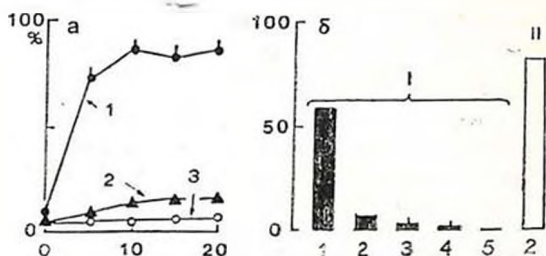


Рис. 5. Избирательный вызываемый комплементом лизис холинергических синапсов больших полушарий: головного мозга морской свинки после сенсibilизации анти-СХМ-1 антисывороткой: а—холинацетилтрансфераза (1), лактатдегидрогеназа (2), тирозингидроксилаза (3); по оси абсцисс— время (в мин), по оси ординат—выход, в %; б—результаты такого же опыта [10] с сенсibilизацией анти-СХМ-1 антисывороткой (1) с синапсами, нагруженными деоксиглюкозой (2), глутаматом (3), ГАМК (4), серотонином, норадреналином и дофамином (5); избирательный выход лишь холинацетилтрансферазы (1); выход всех компонентов при неспецифической сенсibilизации под влиянием антисыворотки против всего комплекса антигенов коры больших полушарий (II, белый столбик)

Функция СХМ-1 в настоящее время неизвестна, но одной из возможностей, которую мы рассматриваем, может быть то, что он присоединяется к комплементарной структуре холинорецептивной клетки-мышцы во время синаптогенеза. Результаты недавних эмбриологических исследований электрического скота поддерживают эту точку зрения. Изучение функции СХМ-1 и его возможной роли в аутоиммунных заболеваниях НС, сопровождающихся избирательной дегенерацией холинергических нейронов, будет целью исследований еще и в следующем 10-летии.

Кальций. Мало известно о механизме экзоцитоза. Наша группа (Valker, Sudhof и Fritsche) недавно обнаружила новый класс белков, которые прочно связываются с липопротеиновыми мембранами. Мы полагаем, что этот регулируемый Ca^{2+} процесс, возможно, участвует в экзоцитозе и слиянии пузырьков.

Если полученные при гомогенизации препараты мембран электрического органа хорошо промыты Ca^{2+} -содержащими соевыми растворами и затем элюированы той же средой, содержащей ЭГТА, то

такой экстракт содержит один главный белковый компонент с M_r 32 кД [11, 12]. Этот белок, получивший название калелектрина [12], связывается с мембранами в присутствии Ca^{2+} , а также усиливает вызываемую двухвалентными катионами коацервацию мембранных пузырьков, включая синаптические, со специфическим участием Ca^{2+} [13]. Антисыворотка к калелектрину вступает в перекрестные реакции с близкими белками во многих клетках и тканях млекопитающих, включая печень, мозговой слой надпочечников, головной мозг, лейкоциты и сперматозоиды. Одной из функций калелектрина может быть то, что он способствует прикреплению содержащих десмин цитоскелетных элементов к мембране при помощи фосфатидилсерина и других отрицательно заряженных липидов [14]. Было установлено, что антисыворотка против калелектрина электрического ската может опознавать целый класс находящихся во многих клетках новых белков, обладающих общими для них повторяющимися аминокислотными последовательностями и способностью к Ca^{2+} -зависимому связыванию с липидами [15].

Идентифицирование участка генома, кодирующего холинергическую функцию. Столь большие тела электромоторных нейронов должны обладать объемом, по крайней мере в 30 раз превышающим размеры пресинаптических нервных окончаний. Это не удивительно, так как их перикарионы полны полисомами, а также грубым и гладким эндоплазматическим ретикулумом. Из этих клеток была выделена мРНК [16], которая проявляла высокую активность в бесклеточной трансляционной системе: среди образующихся продуктов был обнаружен ряд цитоплазматических белков, свойственных пузырькам и нервным окончаниям. При посредстве этой мРНК была получена кДНК, которую успешно вводили в *E. coli* [17]. Был выполнен скрининг с меченой кДНК, выделенной из мышцы (как образец не нервной ткани) и из мозжечка (как образец структуры мозга с дефицитом холинергических нейронов). Приблизительно из 3500 клонов было изолировано 50, которые соответствовали специфично лишь кДНК электрической доли и, таким образом, несодержавшие последовательностей, кодирующих как белки, общие для всех нейронов, так и «хозяйственные» белки, свойственные вообще всем клеткам. Обнаружено, что лишь очень небольшое число клонов оказалось одинаково положительным в случае как электрической доли, так и мозжечка; еще меньше выявилось отвечающих и на пробу с мышечной тканью. Теперь предприняты попытки, используя вектор экспрессии, установить клоны, содержащие кДНК-последовательность, которая кодирует холинергические синаптические белки.

Вазоактивный кишечный пептид: холинергический ко-нейромедиатор? Этот последний раздел посвящен некоторым новым работам [18], показавшим, что в электромоторных нейронах имеется какой-то пептид с иммунореактивностью, близкой к проявляемой вазоактивным кишечным пептидом (ВКП); этот пептид из тел электромоторных нейронов транспортируется в нервные окончания.

На рис. 6 показано иммунохимическое выявление ВКП-подобной иммунореактивности в телах электромоторных клеток нормальной рыбы (рис. 6, а) и рыбы, у которой электромоторные нервы оставались перевязанными в течение 14 дней (рис. 6, а, б). Обратите внимание на усиление иммунореактивности в электрической доле после перевязки. Эти

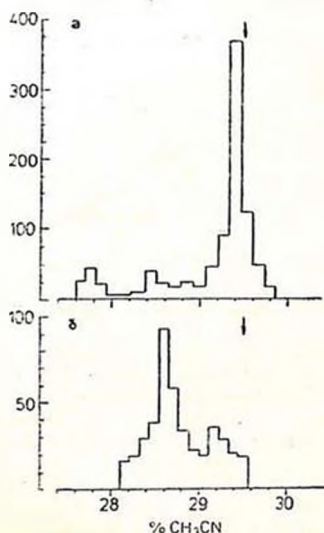


Рис. 7. Хроматография ВКП-подобной иммунореактивности электрической доли (а) и электрического органа (б). По оси ординат—концентрация ВКП, в пМ/л

результаты можно сравнить с подобными данными, полученными в случае СПГП и анти-СПГП-антисыворотки (рис. 4). Следует отметить также аккумуляцию накопительных гранул в аксонном бугорке (рис. 4). В соответствии с этим лигатура электрического органа (рис. 6, а, д) сопровождалась уменьшением ВКП-реакции из-за отключения содержащих ВКП гранул в результате перевязки аксона (рис. 6, а и е), так как локализация ВКП, подобно СПГП, ограничена нервными окончаниями, расположенными на вентральной поверхности электроцитов.

Количественные определения (табл. 2) подтвердили иммунохимические наблюдения: в результате перевязки электромоторных аксонов ВКП-иммунореактивность электрической доли повышалась, а в электрическом органе падала.

ВКП-подобный иммунореактивный материал электрической доли (а) и электрического органа (б) был подвергнут хроматографии (рис. 7). Можно видеть, что исследуемый препарат вел себя не совсем идентично свиному ВКП, объем пиков которого показан стрелками. Это было

подтверждено также и тем, что кривые вытеснения антисыворотки со свиного ВКП этим пептидом и ВКП электрического ската не совпадали (рис. 8). Далее было обнаружено, что иммунореактивные пептиды неодинаковы в двух разных участках электромоторных нейронов. Очист-

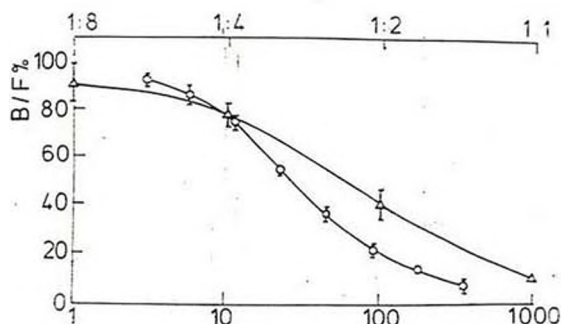


Рис. 8. Вытеснение антисыворотки со свиного ВКП холодным раствором свиного ВКП (○) и ВКП электрического ската (△). По верхней оси абсцисс—величина добавления экстракта; по нижней—концентрация пептида, в пМ/л; по оси ординат—отношение связанной антисыворотки к свободной, в %

Таблица 2

Эффект перевязки на величину ВКП-подобной иммунореактивности

Ткань	ВКП-подобная иммуно-реактивность в фмоля эквивалентах/г		изменения в %
	контроль	лигатура	
Электрическая доля	740±68	1371±226	+84±10
Нервы	183±32	244±38	+34±11
Электрический орган	130±16	60±11	-47±5

Примечание. Данные для индивидуальной рыбы являются средними из результатов 3 определений. Величины изменений представляют собой умноженные на 100 величины при перевязке с вычетом контрольных данных и деленные на эти контрольные величины. Отрицательные величины указывают на уменьшение, а положительные—на увеличение после перевязки. Результаты определений в нервах относятся к их части, проксимальной к перевязке. Все данные статистически достоверны ($p < 0,01$).

но также, что при транспорте ВКП из тела клетки в нервное окончание происходит какой-то вид процессинга, который включает удаление гидрофобной последовательности в С-концевой части пептида.

Располагая такой хорошо охарактеризованной холинергической системой, мы теперь имеем модель для изучения запутанной и интригующей проблемы ко-нейромедиаторов. Сопровождается ли высвобождение АХ также и выходом ВКП? Какую роль играет ВКП в модуляции холинергической функции? Разработка данных и близких к ним вопросов с использованием этой и других модельных систем будет занимать нас и в будущем.

ЛИТЕРАТУРА

1. Цит. по *Kandel E.* Cellular Basis of Behavior. Freeman, San Francisco, 1976.
2. *Heilbronn E.*—In: Handbook of Neurochemistry (ed. A. Lajtha), 2nd ed., v. 10, p. 241—284. New York, Plenum Press, 1985.
3. *Numa M., Takahashi H., Tanabe T., Toyosato M., Kikuyotani S., Furutani Y., Hirose T., Takashima H., Inayama S., Miyata T., Numa S.* Nature, v. 302, p. 528—532, 1983.
4. *Richardson G. P., Rinschen B., Fox G. Q.* J. Comp. Neurol., v. 231, p. 339—352, 1985.
5. *Jones R. T., Walker J. H., Stadler H., Whittaker V. P.* Cell Tiss. Res., v. 223, p. 117—126, 1982.
6. *Walker J. H., Obrocki J., Zimmermann C. W.* J. Neurochem., v. 41, p. 209—216, 1983.
7. *Jones R. T., Walker J. H., Richardson P. J., Whittaker V. P.* Cell Tiss. Res., v. 218, p. 355—373, 1982.
8. *Richardson P. J., Walker J. H., Jones R. T., Whittaker V. P.* J. Neurochem., v. 38, p. 1605—1614, 1982.
9. *Ferretti P., Borroni E.* J. Neurochem., v. 42, p. 1085—1093, 1984.
10. *Richardson P. J.* J. Neurochem., v. 41, p. 640—648, 1983.
11. *Walker J. H.* J. Neurochem., v. 39, p. 815—823, 1982.
12. *Südhof T. C., Ebberke M., Walker J. H., Fritsche U., Boustead C.* Biochemistry, v. 23, p. 1103—1109, 1984.
13. *Südhof T. C., Walker J. H., Obrocki J.* EMBO J., v. 1, p. 1167—1170, 1982.
14. *Fiedler W., Walker J. H.* Eur. J. Cell. Biol., v. 33, p. 34—41, 1985.
15. *Geisow M. et al.* Nature, v. 320, p. 631—638, 1986.
16. *Schmid D. W., Stadler H., Whittaker V. P.* Eur. J. Biochem., v. 122, p. 633—639, 1982.
17. *Schmid D. W., Girou C.* J. Neurochem. (in press), 1986.
18. *Agoston D. V., Conlon J. M.* J. Neurochem., v. 47, p. 445—453, 1986.

Поступила 31. XI 1986



УДК 612.822.1+612.815.1

ГАМК-РЕЦЕПТОРЫ СИНАПТИЧЕСКИХ МЕМБРАН И ИХ
ЭНДОГЕННЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ В ОНТОГЕНЕЗЕ
КОРЫ МОЗГА КРЫС

ПАРФЕНОВА Е. В.

Институт экспериментальной медицины АМН СССР, Ленинград

Изучено Na^+ -независимое связывание $[\text{^3H}]\text{ГАМК}$ с синаптическими мембранами коры головного мозга крыс в эмбриональном и раннем постнатальном периодах онтогенеза. Показано, что ГАМК-рецепторы в коре больших полушарий появляются на 20-й день эмбрионального развития и имеют высокий уровень специфического связывания $[\text{^3H}]\text{ГАМК}$, при этом сродство их к лиганду в 5 раз ниже, чем у взрослых животных. Появлению рецептора предшествует появление активатора—вещества полипептидной природы, содержащегося во фракции синаптических мембран 19-суточных эмбрионов, которое в 2—3 раза увеличивает специфическое связывание $[\text{^3H}]\text{ГАМК}$ с мембранами коры мозга взрослых животных. Сразу же после рождения связывание $[\text{^3H}]\text{ГАМК}$ падает до 10—20% от взрослого уровня, а затем в течение 1 недели постнатального развития постепенно повышается, достигая к 7-у дню 50% от взрослого уровня. Эндогенные ингибиторы ГАМК-рецепторов впервые обнаруживаются на 20-й день эмбрионального развития, что совпадает по времени с появлением самих рецепторов и, по-видимому, указывает на их тесную структурно-функциональную взаимосвязь. Активность эндогенных ингибиторов, которая может быть оценена по их влиянию на связывание $[\text{^3H}]\text{ГАМК}$ с синаптическими мембранами коры мозга взрослых крыс, у эмбрионов 20—21 дня развития выше их активности в постнатальном периоде. Обсуждается изменение свойств ГАМК-рецепторов и их эндогенных регуляторов в онтогенезе головного мозга крыс.

В регуляции ГАМК-ергической синаптической передачи в ее постсинаптическом звене участвуют эндогенные ингибиторы—вещества белковой или пептидной природы, содержащиеся во фракции синаптических мембран головного мозга крыс, которые снижают сродство ГАМК-рецепторов к медиатору и уменьшают общее количество рецепторных участков [1—4]. Имеющиеся в литературе данные позволяют предполагать, что эндогенные ингибиторы являются неотъемлемым функциональным компонентом комплекса ГАМК-рецептор—ионофор [5]. Одним из возможных путей для проверки этого предположения является изучение эндогенных ингибиторов в онтогенезе головного мозга. Имеющиеся работы такого рода единичны и касаются лишь постнатального

развития крыс [6—8]. Полученные в них данные противоречивы и основаны лишь на косвенной оценке их активности (по приросту рецепторного связывания [^3H]ГАМК после обработки синаптических мембран тритоном X-100 [7, 8]). Сведений об эндогенных ингибиторах ГАМК-рецепторов передних отделов головного мозга в эмбриогенезе нет. Задачей нашей работы было изучение ГАМК-рецепторов и их эндогенных ингибиторов в коре головного мозга крыс в пре- и ранний постнатальный периоды развития.

Материалы и методы

Опыты проводили на крысах линии *Wistar*. Начало беременности определяли путем идентификации сперматозоидов во влагалищном мазке самок через 10 ч после подсадки самцов*. У 17-суточных зародышей исследовали передний мозг целиком, отделяя его препаровальной иглой под лупой. У 19-, 20- и 21-суточных эмбрионов, а также у животных через 1, 4 и 7 суток после рождения отделяли сформированную кору больших полушарий. Полученный материал хранили в 0,32 М растворе сахарозы при -18° в течение 1—10 суток до использования. Фракцию синаптических мембран получали путем дифференциального центрифугирования гомогената мозговой ткани по методу Дамбиновой, Городнинского [9], позволяющему получить фракцию, практически полностью освобожденную от митохондрий. Для «проявления» ГАМК-рецепторов полученную фракцию подвергали замораживанию-оттаиванию с последующими многократными промывками буфером 50 мМ трис-цитрат pH 7,4 (синаптические мембраны типа А) или же предварительно обрабатывали 0,05% тритоном X-100 (синаптические мембраны типа Б). Такая обработка способствует отделению эндогенных ингибиторов и выявлению ГАМК-рецепторов [2, 10].

Для определения Na^+ -независимого связывания [^3H]ГАМК, которое идентично связыванию медиатора с рецепторными участками [10, 11], 20—50 мкг белка синаптических мембран инкубировали в течение 10 мин при $0-4^\circ$ в 1 мл вышеуказанного буфера в присутствии 50—200 нМ [^3H]ГАМК 32 Ки/ммоль («Изотоп», СССР): неспецифическое связывание определяли в той же среде в присутствии 1 мМ немеченой ГАМК («Fluka», Швейцария). Для синаптических мембран коры мозга взрослых животных оно составляло менее 30% от общего связывания метки. Специфическое связывание получали путем вычитания значений неспецифического связывания из величин общего связывания. Связанную с мембранами метку отделяли от свободной фазы с помощью фильтрации проб под вакуумом через целлюлозные фильтры диаметром пор 0,42 мкм («Synpro», СССР). Фильтры быстро промывали под вакуумом 5-кратным объемом буфера, после высушивания на воздухе переносили вials, заливали сцинтилляционной жидкостью

* Автор приносит благодарность П. А. Дыбану за помощь в этой части работы.

(5 г РРО и 50 мг РРОР в 1 л толуола) и измеряли радиоактивность на счетчике «Mark II», США).

Содержание белка во фракции синаптических мембран оценивали по методу Lowry после их предварительного гидролиза в NaOH [12].

В качестве источника эндогенных ингибиторов использовали супернатант, полученный после осаждения предварительно замороженных в буфере 50 мМ трис-цитрат pH 7,4 и оттаявших синаптических мембран коры мозга животных разных стадий развития. Ранее нами было показано, что при замораживании-оттаивании от фракции синаптических мембран отделяются окрашивающиеся реактивом Фолина вещества, которые дозозависимым образом ингибируют рецепторное связывание [^3H] ГАМК и, следовательно, могут быть отнесены к эндогенным ингибиторам [13]. Активность полученного ингибиторсодержащего супернатанта тестировали на предварительно обработанных 0,05%-ным триптоном X-100 синаптических мембранах коры мозга взрослых крыс.

Результаты исследований

В передних отделах головного мозга 17-суточных эмбрионов и коры больших полушарий 19-суточных зародышей специфического Na^+ -независимого связывания [^3H] ГАМК не обнаруживается (табл. 1).

Таблица 1

Na^+ -независимое специфическое связывание [^3H] ГАМК с синаптическими мембранами коры головного мозга крыс на различных стадиях онтогенетического развития*

Объект	Na^+ -независимое специфическое связывание [^3H] ГАМК с синаптическими мембранами (СМ)			Эндогенные модуляторы		
	СМ типа А	СМ типа Б		активатор	ингибитор	
	(нмг мин мг белка)	(нмг мин мг белка)	K_d (нМ)		% ингибирования	ID_{50} (мкг белка/мл)
Эмбрионы:						
17 суток	нет	нет			не определяли	
19 суток	нет	нет		+		
20 суток	21000	59000	200	нет	90	0,7
21 сутки	3900	11000	250	нет	90	2,0
После рождения:						
1 сутки	нет	2300	260	нет	60	1,9
6 суток	2700	7100	не определ.	нет	50	1,5
7 суток	3100	6000	не определ.	нет	50	2,0
Взрослые	7000	17000	40	нет	50	2,0

* Примечание. Концентрация [^3H] ГАМК в пробках составляла 50 нМ.

Вместе с тем оказалось, что замораживание-оттаивание синаптических мембран коры мозга 19-суточных эмбрионов приводит к отделению от них веществ, которые увеличивают рецепторное связывание [^3H] ГАМК с мембранами коры мозга взрослых крыс (рис. 1). Уровень активации

в различных опытах несколько варьировал (в среднем в 2,8 раза) при концентрации белка супернатанта 20 мкг/мл. Активатор был стабилен при хранении при -17° в течение 4 суток, однако повторное его замораживание-оттаивание приводило к потере активирующего эффекта. В дополнительных опытах было показано, что активация ГАМК-рецепторов синаптических мембран коры мозга взрослых крыс в присутствии фактора из мембран 19-суточных зародышей происходит за счет увеличения общего количества рецепторных участков без заметного изменения их сродства к лиганду.

Синаптические мембраны, полученные из коры мозга 20-суточных эмбрионов крыс, обнаруживают Na^{+} -независимое специфическое связывание $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$, которое выявляется как на прсмывых буфером (тип А мембран), так и на обработанных 0.05%-ным тритоном (тип Б мембран) препаратах (табл. 1). При этом рецепторное связывание $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ у эмбрионов этого срока развития превышает связывание с мембранами коры мозга взрослых крыс, что обусловлено высоким числом рецепторных участков B_{max} наряду с пониженным сродством их к лиганду (200 нМ). Синаптические мембраны из коры мозга 21-суточных эмбрионов крыс (как типа А, так и типа Б) также обнаруживают способность к Na^{+} -независимому специфическому связыванию $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$, которое ниже, чем у 20-суточных эмбрионов и сопоставимо по величине со связыванием с мембранами коры мозга взрослых крыс (табл. 1). Как и у 20-суточных зародышей, сродство ГАМК-рецепторов к лиганду на 21 сутки эмбрионального развития ниже, чем в коре мозга взрослых крыс ($K_d=250$ нМ).

Эндогенные ингибиторы обнаруживаются в препаратах синаптических мембран коры больших полушарий на 20 и 21-е сутки эмбрионального развития. Косвенным указанием на их существование является факт увеличения рецепторного связывания $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ после обработки синаптических мембран эмбрионов этих сроков развития 0.05% тритоном в 2—3 раза, что сопоставимо с приростом связывания после аналогичной обработки мембран коры мозга взрослых крыс (табл. 1). Кроме того, показано, что супернатант, полученный после осаждения предварительно замороженных и оттаявших синаптических мембран из коры мозга зародышей дозозависимым образом ингибировал Na^{+} -независимое связывание $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ с синаптическими мембранами из коры мозга взрослых крыс (ID_{50} составляет 0.7 и 2 мкг белка/мл для 20- и 21-суточных эмбрионов соответственно, табл. 1). Максимальный уровень ингибирования составлял 90%, в то время как аналогичным образом выделенная из мембран коры мозга взрослых крыс фракция ингибировала связывание $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ не более чем на 50% (рис. 2).

У новорожденных животных через сутки после рождения синаптические мембраны типа А не обнаруживают рецепторного связывания $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$, в то время как их обработка детергентом «проявляет» рецепторные участки (табл. 1). Уровень специфического связывания

ГАМК с мембранами типа Б из коры мозга 1-дневных крыс существенно ниже, чем у взрослых животных, что сопровождается и пониженным сродством рецепторных участков к лиганду ($K_d=260$ нМ). В дальнейшем постнатальном периоде наблюдается постепенное увеличение рецепторного связывания $[^3H]$ ГАМК, которое к концу 1 недели достигает 50% от взрослого уровня (табл. 1).

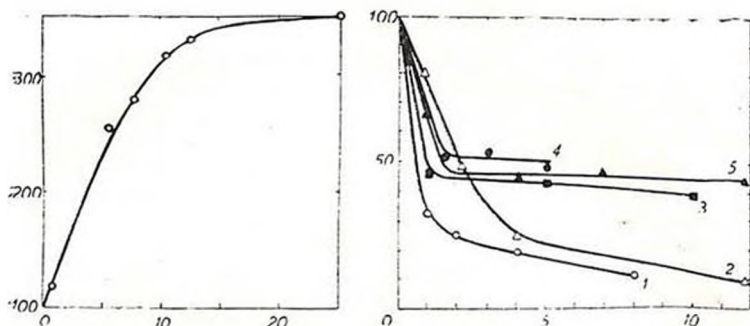


Рис. 1. Влияние активаторсодержащей фракции коры мозга 19-суточных эмбрионов крыс на Na^+ -независимое связывание $[^3H]$ ГАМК с синаптическими мембранами из коры мозга взрослых крыс; по оси абсцисс—концентрация белка фракции в пробе (мкг/мл); по оси ординат—специфическое связывание $[^3H]$ ГАМК (% к контролю)

Рис. 2. Влияние ингибиторсодержащей фракции из коры мозга крыс на Na^+ -независимое связывание $[^3H]$ ГАМК с синаптическими мембранами из коры мозга взрослых крыс. Фракции из коры мозга эмбрионов крыс: 1—20-суточных; 2—21-суточных. Фракции из коры мозга крыс после рождения: 3—1-суточных; 4—4-суточных; 5—взрослых. Обозначения по осям координат те же, что и на рис. 1

В синаптических мембранах, выделенных из коры мозга крысы через 1—7 суток после рождения, обнаруживается существование эндогенных ингибиторов. Оно выявляется как косвенно по приросту рецепторного связывания ГАМК после обработки мембран детергентом (табл. 1), так и непосредственно по влиянию ингибиторсодержащего супернатанта после осаждения замороженных-оттаявших мембран на рецепторное связывание $[^3H]$ ГАМК с синаптическими мембранами коры мозга взрослых крыс (рис. 2). Следует отметить, что по своим характеристикам (ID_{50} , максимальная глубина ингибирования) эндогенные ингибиторы коры мозга 1—7-дневных крыс сходны с ингибиторами взрослых животных (табл. 1, рис. 2).

Обсуждение результатов

Как следует из представленных нами данных, ГАМК-рецепторы в передних отделах головного мозга крыс не обнаруживаются до 19 суток

эмбрионального развития включительно. Появлению рецептора в онтогенезе предшествует появление активатора—вещества, которое отделяется в супернатант при замораживании-оттаивании синаптических мембран коры мозга 19-суточных зародышей и в 2—3 раза увеличивает рецепторное связывание [^3H]ГАМК с предварительно обработанными детергентом мембранами коры мозга взрослых крыс преимущественно за счет проявления латентных участков. Механизм действия и природа активатора неизвестны. Этим веществом не может быть эндогенная ГАМК, которая появляется в передних отделах головного мозга крыс уже на ранних стадиях эмбрионального развития [14], поскольку единственным ее эффектом может быть лишь занижение величин рецепторного связывания, получаемым с помощью радиоизотопного метода (эффект разбавления метки). Можно полагать, что активатор имеет белковую или пептидную природу, так как окрашивается реактивом Фолина и, вероятно, является слабосвязанным с мембранами или примембранным белком.

ГАМК-рецепторы в коре головного мозга крыс обнаруживаются на 20-й день эмбрионального развития; их возникновение имеет скачкообразный характер, а способность связывать [^3H]ГАМК значительно превышает таковую у взрослых крыс. К 21 дню эмбрионального развития связывание [^3H]ГАМК с рецепторами понижается до уровня, характерного для рецепторов коры головного мозга взрослых крыс. Одновременно с появлением ГАМК-рецептора обнаруживаются и эндогенные ингибиторы, об активности которых мы могли судить не только на основании косвенных данных (величины прироста рецепторного связывания после обработки синаптических мембран тритоном X-100), но и непосредственно по их влиянию на связывание [^3H]ГАМК с мембранами коры мозга взрослых крыс. Таким образом, появление эндогенных ингибиторов ГАМК-рецепторов в онтогенезе коры головного мозга крыс совпадает по времени с появлением самих рецепторов, что указывает на их тесную структурно-функциональную взаимосвязь.

Согласно данным Coyle, Еппа [6], наличие ГАМК-рецепторов в мозгу крыс отмечается уже на 15-й день эмбрионального развития (их уровень не превышает 5% от содержания ГАМК-рецепторов у взрослых крыс), а к моменту рождения рецепторное связывание [^3H]ГАМК увеличивается до 25%. Такое расхождение с полученными нами данными, видимо, объясняется тем, что в цитированной работе авторы работали с целым мозгом, выделяя из него суммарную фракцию всех субклеточных частиц (включая неразрушенные клетки, ядра, митохондрии и синапсомы), которые могут иметь нереперторные ГАМК-связывающие участки, что затрудняет интерпретацию данных.

Сразу же после рождения отмечается дальнейшее снижение рецепторного связывания [^3H]ГАМК до 15—20% от уровня у взрослых животных, а затем его постепенное повышение, так что к концу I недели постнатального развития специфическое Na^+ -независимое связывание [^3H]ГАМК составляет около 50% от этой величины. Это согласуется

с приводимыми в литературе данными о том, что в постнатальном периоде развития головного мозга активность ГАМК-рецепторов постепенно возрастает [7, 8]. Эндогенные ингибиторы обнаруживаются в мозгу на всех исследованных сроках постнатального развития (1—7-сутки), однако, в отличие от ингибиторов из мозга 20—21-суточных эмбрионов, они ингибируют связывание [^3H]ГАМК не более чем на 50—60% и в этом отношении сходны с ингибиторами, выделенными из коры мозга взрослых животных.

Полученные нами данные позволяют предположить, что ГАМК-рецепторы и их эндогенные ингибиторы в онтогенезе коры головного мозга крыс претерпевают следующие изменения, которые можно обозначить термином «созревание» рецептора и системы его регуляции: а) ГАМК-рецепторы, появляясь на последних стадиях эмбрионального развития, в постнатальном периоде приобретают значительно большую чувствительность к лиганду; б) первым эндогенным модулятором ГАМК-рецепторов в онтогенезе коры головного мозга является активатор ГАМК-рецептора, появление которого предшествует появлению рецептора; в) эндогенные ингибиторы появляются в онтогенезе одновременно с ГАМК-рецепторами, что свидетельствует об их тесной структурно-функциональной связи; г) в процессе постнатального развития коры мозга эндогенные ингибиторы снижают свою активность и уменьшают максимальную глубину ингибирования ГАМК-рецепторов, что может быть связано с укрупнением молекулы ингибитора и снижением доступности для нее рецептора.

GABA RECEPTORS AND THEIR ENDOGENOUS REGULATION IN RAT BRAIN SYNAPTIC MEMBRANES IN ONTOGENESIS

PARFENOVA E. V.

Institute of Experimental Medicine, USSR Acad. Med. Sci., Leningrad

Na^+ -independent binding of ^3H -GABA with brain synaptic membranes has been studied in embryonic and in the early postnatal periods. GABA receptors in the cortex of brain big hemispheres appear at the 20th day of embryonic development with high level of ^3H -GABA specific binding, their affinity to the ligand being 5-fold lower than in adult animals. Appearance of receptor is preceded by that of an activator (19th day of embryonic development) that enhances 2—3-fold specific binding of ^3H -GABA and is a polypeptide. Immediately after birth binding of ^3H -GABA drops to 10—20% of the adults' levels, reaching 50% level to the end of the 7th day. Endogenous GABA inhibitors are detected on the 20th day of embryonic development as the receptors themselves pointing to their intimate structure-function relationship. The potency of these inhibitors is higher in 20—21-day embryos than in postnatal period.

A possible role of GABA receptors and regulators in rat brain in ontogenesis is discussed.

ЛИТЕРАТУРА

1. Guidotti A., Konkel D. R., Ebstein B., Corda M. G., Wise B. C., Krutzsch H., Meek J. L., Costa E. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Biol. Sci., v. 79, p. 6034—6088, 1982.
2. Mussotti M., Mazzari S., Schmid R., Guidotti A., Costa E. Neurochem. Res., v. 6, p. 551—565, 1981.
3. Yoneda Y., Kurtyama K. Nature, v. 285, p. 670—673, 1980.
4. Johnston G. A. R., Kennedy S. M. R. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., v. 6, p. 686—687, 1979.
5. Costa E.—In: Receptor as supramolecular entities (eds. G. Biggio, E. Costa), p. 213—235, N. Y., Pergamon Press, 1983.
6. Coyle J. T., Enna S. J. Brain Res., v. 111, p. 119—133, 1976.
7. Palacios J. M., Niehoff D. L., Kuhar M. J. Brain Res., v. 179, p. 390—395, 1979.
8. Skerritt J. H., Johnston G. A. R. Dev. Neurosci., v. 5, p. 189—197, 1982.
9. Дамбинова С. А., Городинский А. И. Биохимия, т. 49, № 1, с. 67—75, 1984.
10. Lester B. L., Peck E. J. Brain Res., v. 161, p. 79—97, 1979.
11. Greenlee D. V., Van Ness P. C., Olsen R. W. J. Neurochem., v. 31, p. 933—938, 1978.
12. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
13. Парфенова Е. В. Цитология, т. 26, № 9, с. 1076—1077, 1984.
14. Pradhan S. N., Pradhan S.—In: Biogenic Amines in Development (eds. H. Parvez, S. Parvez), p. 275—284, Bo Biomedical Press, Elsevier North-Holland, 1981.

Поступила 14. VI 1986



УДК 577.612.015

ИЗМЕНЕНИЕ СОСТОЯНИЯ ХОЛИНОРЕЦЕПТОРА МУСКАРИНОВОГО ТИПА МОЗГА ПРИ ИМПРИНТИНГЕ У ЦЫПЛЯТ

СОЛОМОНΙΑ Р. О., СОБЧИНСКАЯ Н. М., МИКЕЛАДЗЕ Д. Г.

Институт физиологии им. И. С. Берташвили АН ГССР, Тбилиси

Было изучено изменение количества холинорецептора мускаринового типа в штерминальной части медиального вентрального гипостриатума (ИМВГ) цыплят в процессе импринтинга (запечатлевания). Первичное световое раздражение как в экспериментальной, так и в контрольной группе вызывало сильное увеличение количества холинорецептора, которое частично уменьшалось через 30 мин. Наблюдали два четко различимых временных периода, характерных для импринтинга: 1) 30—60 мин после импринтинга с высокой активностью холинорецепторной системы; 2) 60—120 мин после импринтинга с низкой активностью холинорецепторной системы. ИМВГ правого полушария цыплят как экспериментальных, так и контрольных групп реагируют соответственно на импринтинг-объект и диффузный свет более сильно, чем левое. Предполагается, что этот феномен функциональной асимметрии не является существенным для записи следов импринтинга, а обусловлен генетически детерминированным ством на первичное световое раздражение.

Многочисленные биохимические [1—5] и фармаколого-биохимические [6—9] исследования указывают на существенную роль этой системы в процессах формирования и хранения следов памяти. Дальнейшее успешное изучение этой проблемы во многом зависит от выбранной модели исследования. Одной из предпочитаемых моделей является импринтинг у цыплят. Импринтинг как модель для исследования памяти обладает существенным преимуществом по сравнению с другими моделями обучения, так как определен участок головного мозга цыплят, которому принадлежит ведущая роль в записи следов импринтинга. Он соответствует ИМВГ [10—12].

Изменению количества холинорецептора мускаринового типа в процессе импринтинга посвящено относительно мало работ, в которых в основном и исследуется только одна временная точка [3, 5].

Поэтому целью настоящего исследования являлось изучение изменения холинорецептора мускаринового типа в динамике в ИМВГ цыплят в процессе импринтинга.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на цыплятах породы белый леггорн. За день до вылупления яйца изолировали в отдельные коробки для устранения неспецифических побочных раздражений. Цыплят импринтировали в сенситивном периоде, через 17—20 ч после вылупления в аппарате Гесса [13]. Импринтинг-объектом служил красный полиэтиленовый цилиндр (с лампой 25 ВТ) диаметром 9,6 см, высотой 14 см. Световой прибор вращался на манеже по кругу радиусом 60 см. Экспозиция импринтинг-объекта продолжалась 15—20 мин (за это время цыпленок пробегал 15—20 м). Критерием импринтирования служила реакция следования за световым импринтинг-объектом. Контролем служили цыплята, которые за тот же период времени освещались диффузным светом. До и после импринтирования цыплят содержали в отдельных коробках, в темноте, изолированно от внешних раздражителей. После декаптации проводили экстирпацию ИМВГ и замораживали в жидком азоте.

Для определения количества холинорецептора мускаринового типа использовали мембранную фракцию ИМВГ после осмотического шока, полученного по методу Cotman и соавт. [14]. Количество холинорецептора мускаринового типа определяли по разнице между общим и неспецифическим связыванием с [^3H] кунниклидилбензилатом (КНБ). Пробы в объеме 250 мкл содержали буфер трис-Кребс-Рингера (P_1) следующего состава: 145 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1,2 мМ CaCl_2 , 1,3 мМ MgCl_2 , 2 мМ NaH_2PO_4 , 10 мМ глюкозы, 10 мМ трис-HCl, pH 7,4. [^3H] КНБ (16 К $_{\text{д}}$ /мМ, „Amersham“, Англия) в концентрации 10 нМ и 100 мкг мембранного белка (осадок P_1 , полученный по методу Cotman и соавт. [14]). Для определения неспецифического связывания в пробы добавляли атропин-сульфат до концентрации 10 мкМ. Инкубацию проводили при 4° в течение 90 мин. Пробы фильтровали на фильтрах CF/C и просчитывали в толуольном сцинтилляторе на жидкостном сцинтилляционном спектрометре SL 4000 („Intertechnique“, Франция). Белок определяли по методу Bradford [15].

При исследовании временной зависимости состояния холинорецепторов от импринтирования началом отсчета был момент предъявления цыплятам импринтинг-объекта (эксперимент) или начало освещения диффузным светом (контроль). Концом данного интервала времени считался момент декаптации. На каждой временной точке испытывалась группа цыплят, состоявшая из 12 экспериментальных и 12 контрольных животных (число параллельных измерений также равнялось 12). Результаты обрабатывали статистически, достоверность различий и уровень значимости определяли по критерию распределения Стьюдента для малых выборок.

Результаты и обсуждение

На рисунке представлены данные изменения количества холинорецептора мускаринового типа ИМВГ цыплят в процессе импринтинга.

Резкое увеличение ($\sim$ в 3 раза) количества холинорецептора наблюдали как у экспериментальных, так и у контрольных животных сразу после импринтинга и соответствующего освещения диффузным светом. Через 30 мин происходил обратный процесс, хотя количество холинорецептора не достигало начального уровня и в экспериментальной группе превосходило контрольный на 18—24% (рис., а, б). За последую-

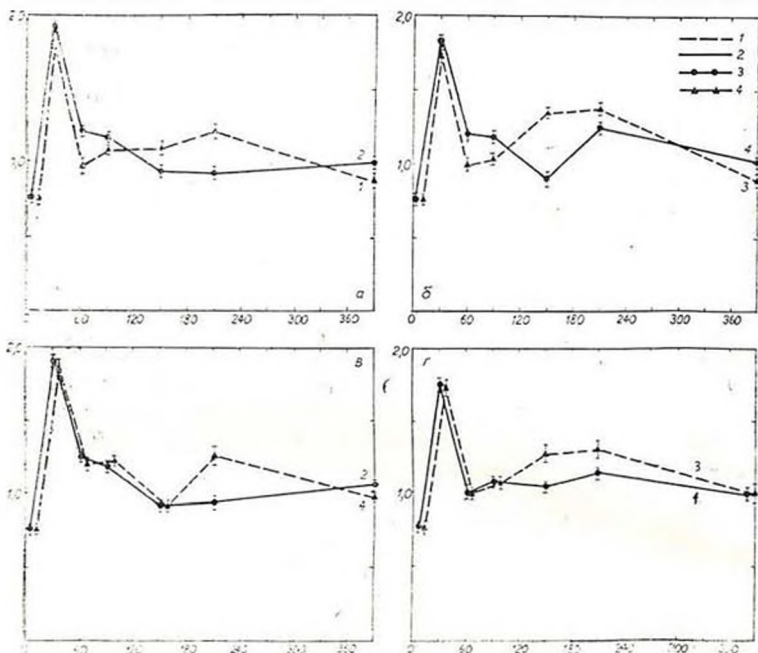


Рис. Изменение количества холинорецептора в интермедиальной части медиального вентрального гиперстриатума в зависимости от времени после начала импринтинга (а, б, а) и освещения диффузным светом (г). 1—левое полушарие, контроль; 2—левое полушарие, эксперимент; 3—правое полушарие, контроль; 4—правое полушарие, эксперимент. По оси абсцисс—время после начала импринтинга (мин); по оси ординат—содержание холинорецептора (нмоль [^3H]квинклидилабензилата/мг белка)

щие 30 мин разница между импринтированными и контрольными цыплятами в малой степени уменьшалась за счет некоторого повышения количества холинорецептора у последних (рис., а, б). Спустя 2 ч после окончания импринтинга ИМВГ полушарий экспериментальных цыплят не отличались друг от друга (рис., в), в то время как у контрольных цыплят проявлялась функциональная асимметрия (рис., г). ИМВГ правого полушария превосходила ИМВГ левого по исследуемому параметру на 26.5% (рис., г), и каждая из них была выше, чем в соот-

ветствующей экспериментальной группе (рис., а, б). За последующий час разница между контрольной и экспериментальной группами оставалась приблизительно такой же (рис., а, б), но уже начинала проявляться функциональная асимметрия в экспериментальной группе: ИМВГ правого полушария превосходила ИМВГ левого на 26,8% (рис., в). Спустя 6 ч после окончания импринтинга разницы по количеству холинорецептора между ИМВГ левого и правого полушарий в экспериментальной и контрольной группах, а также между этими группами практически не наблюдалось (рис., в, г).

При исследовании биохимических механизмов импринтинга необходимо принять во внимание тот факт, что перед освещением диффузным светом и перед предъявлением импринтинг-объекта контрольные и экспериментальные цыплята находились в темноте. У крыс, которых с рождения помещали в темные камеры, после их помещения на свет отмечался усиленный синаптогенез и связанный с этим процессом целый ряд биохимических изменений в зрительной коре головного мозга [16—18], составной частью которой, как уже отмечалось, является ИМВГ. В частности, в нашей предыдущей работе было установлено усиление синтеза синапсомных гликопротеинов в процессе импринтинга [19].

Таким образом, независимо от обучения, как в экспериментальной, так и в контрольной группе отмечается усиленный синаптогенез, а этот процесс, как известно, является одним из основных механизмов памяти [20]. Однако следует отметить, что обнаруженная нами разница между контролем и экспериментом отражает процессы, характерные для памяти, а не изменения, свойственные для общего синаптогенеза.

Сложную флуктуацию количества холинорецептора в ИМВГ цыплят можно объяснить совпадением во времени двух взаимосвязанных процессов: синаптогенезом, индуцированным светом, и фиксацией следов памяти. Интересным является резкое увеличение количества холинорецептора в обеих группах цыплят после импринтинга и соответствующего освещения диффузным светом. Поскольку 15—20 мин (см. Материалы и методы) являются недостаточными для синтеза *de novo* и встраивания в мембраны большого количества функционального холинорецептора, можно предположить, что в этом случае имеет место сенситизация—«демаскирование» рецептора. Детальные биохимические механизмы, лежащие в основе «демаскирования», к настоящему времени описаны только для глутаматного рецептора [21]. Кроме того, через 30 мин наблюдалось резкое уменьшение количества холинорецептора, что также подтверждает наше предположение об отсутствии синтеза рецептора *de novo*, так как катаболическое расщепление быстрообновляемых белков является термодинамически невыгодным для биологической системы. Литературные данные позволяют предположить, что в уменьшении активности и чувствительности холинорецепторных белков участвуют системы посттрансляционной модификации, в частности фосфорилирования белков [22—24]. Интересно отметить, что на 30-й мин после окончания импринтинга оба полушария экспериментальной группы:

по количеству холинорецептора превосходят соответствующие контроли. То же самое наблюдалось и в последующие 30 мин. Учитывая, что по холинорецепторной активности экспериментальная группа превосходила контрольную, можно заключить, что период времени 30—60 мин после импринтирования является критическим для этого вида памяти. Надо отметить, что увеличение количества холинорецептора через 30 мин после обучения наблюдалось также и в случае выработки пассивного избегания у цыплят [4]. Кроме того, поскольку последующий 1 ч характеризовался угнетением холинорецепторной активности в экспериментальной группе, не исключено, что и эта фаза является характерной для процесса консолидации следов импринтинга. Именно в этом промежутке времени отмечался усиленный синтез синаптических гликопротеинов [19].

Особого внимания заслуживает факт функциональной асимметрии у цыплят обеих групп. Более сильное и быстрое реагирование на импринтинг-объект правого полушария было отмечено в случае АХЭ и синтеза синаптосомных гликопротеинов [25, 19]. Однако аналогичное явление не отмечалось у контрольных цыплят при освещении диффузным светом. В случае холинорецептора мускаринового типа функциональная асимметрия наблюдалась также и у контрольных цыплят. Правое полушарие реагировало более сильно на световое раздражение, чем левое. Эти данные могут указывать на генетически детерминированную асимметрию зрительной коры головного мозга цыплят в процессе синаптогенеза.

Таким образом, полученные результаты по активности холинорецептора мускаринового типа указывают на два различных периода, характерных для процесса импринтинга: I период—30—60 мин после импринтирования с высокой активностью холинорецепторной системы, а II—60—120 мин после импринтирования с низкой активностью холинорецепторной системы. Второй период совпадает с фазой активного синтеза синаптических гликопротеинов [19] и должен представлять собой период фиксации следов памяти-импринтинга.

ALTERATION OF THE MUSCARINIC TYPE CHOLINORECEPTOR STATE IN THE CHICK BRAIN DURING IMPRINTING

SOLOMONIA R. O., SOBCHINSKAYA N. M., MIKELADZE D. G.

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

Alteration of the muscarinic type cholinoreceptor amount was studied in the chick intermediate part of medial hyperstriatum ventrale (IMHV) during imprinting. Initial light exposure causes drastic increase in the amount of cholinoreceptor both in the experimental and control groups, which is partially abolished after 30 minutes. Two, well distinguished specific periods were observed during imprinting-memory:

1) 30—60 minutes after imprinting are characterised by high activity of cholinoreceptor system and 2) 60—120 minutes after imprinting—by low activity of cholinoreceptor system. IMHV of chick right hemisphere in experimental and control groups, response correspondingly to imprint-object and diffuse light more stronger, than IMHV of the left one. It is suggested that this phenomenon of functional asymmetry is not essential for the recording of imprinting-memory traces, but is due to genetically determined response to initial light exposure.

ЛИТЕРАТУРА

1. Селиванова А. Т. Выход. первая. дят., т. 24, № 6, с. 1202—1210, 1971.
2. Кругликов Р. И. Нейрохимия механизмов обучения и памяти. М., Наука, 1981.
3. Longstaff A., Rose S. P. R. J. Neurochem., v. 37, № 5, p. 1089—1098, 1981.
4. Rose S. P. R., Gibbs M. E., Hambley J. Neuroscience, v. 5, № 1, p. 169—172, 1980.
5. Bradley P., Horn G. Exp. Brain. Res., v. 41, № 1, p. 121—123, 1981.
6. Ильяченко Р. Ю. Фармакология обучения и памяти. Новосибирск, Наука, 1972.
7. Gardner R., Ray R., Gräfenhelm J., Wallace K., Robitzaud R. Pharm Biochem. and Behav., v. 21, № 1, p. 43—46, 1984.
8. Lerer B., Altman H., Stanley M. Pharm. Biochem. and Behav., v. 21, № 3, p. 467—469, 1984.
9. Harotian V., Kanof P., Davis K. L. Life Sci., v. 37, № 10, p. 945—952, 1985.
10. Horn G., McCabe B. J. J. Physiol. (Gr. Brit.), v. 275, № 1, p. 2—3, 1978.
11. Kohsaka S., Takamatsu K., Aoki E., Tsukada Y. Brain Res., v. 172, № 3, p. 539—541, 1979.
12. McCabe B. J., Cipolla-Neto J., Horn G., Bateson P. J. G. Exp. Brain. Res., v. 48, № 1, p. 13—21, 1982.
13. Понцасова А. Р. Импринтинг (запечатление). А., 1973.
14. Colman C. W., Barber G., Chaurach J., Taylor A. J. Cell. Biol., v. 63, № 3, p. 441—455, 1974.
15. Bradford M. M. Anal. Biochem., v. 72, № 2, p. 249—254, 1976.
16. Burgoune R. D., Rose S. P. R. J. Neurochem., v. 34, № 3, p. 510—517, 1980.
17. Флюкова Е. J. Neurobiol., v. 1, № 2, p. 285—294, 1970.
18. Cragg B. G. Exp. Neural., v. 46, № 3, p. 445—451, 1975.
19. Соломония Р. О., Микаладзе Д. Г. Нейрохимия, т. 5, № 3, с. 393—397, 1986.
20. Rose S. P. R. Neuroscience, v. 6, № 4, p. 811—821, 1981.
21. Lush G., Baudry M. Science, v. 224, № 4653, p. 1057—1063, 1981.
22. Burgoune R. D. FEBS Lett., v. 122, № 2, p. 288—292, 1980.
23. Burgoune R. D. FEBS Lett., v. 127, № 1, p. 144—147, 1981.
24. Burgoune R. D. J. Neurochem., v. 40, № 2, p. 324—331, 1983.
25. Solomon R. O., Sobchatskaya N. M., Zaulshvili E. A. J. Neurochem., v. 41, suppl S70, 1985.

Поступила 15. X 1986



УДК 612.815:577.175.823

СЕРОТОНИНОВЫЕ РЕЦЕПТОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА
ВО ВРЕМЯ ЗИМНЕЙ СПЯЧКИ

ПАК Д. Ф., КУЛИКОВ А. В., ПОПОВА Н. К.

Институт цитологии и генетики СО АН СССР, Новосибирск

Для выявления функциональной роли серотониновых рецепторов первого (C1) и второго (C2) типов определено число центров рецепторного связывания серотонина C1 и C2 в головном мозгу сусликов в различные периоды цикла активного состояния—зимняя спячка. Впервые показано изменение и C1 рецепторов в связи с естественным поведением и функциональным состоянием животного: повышение количества C1 перед впадением в зимнюю спячку во фронтальной коре больших полушарий и гиппокампе мозга. Во время зимней спячки отмечено повышение в гиппокампе, в среднем мозгу и полосатом теле. Пробуждение сопровождалось снижением количества рецепторов C1 во всех исследованных структурах. Обнаружено повышение количества C2 рецепторов во фронтальной коре непосредственно перед впадением в зимнюю спячку и его снижение во время зимней спячки до контрольного уровня; в течение пробуждения существенных изменений в количестве рецепторов C2 не было отмечено. Сделано заключение, что C1 центры рецепторного связывания серотонина являются функционирующими рецепторами, причем их функции отличаются от функций C2 рецепторов.

В последние годы в головном мозгу млекопитающих выявлено два типа серотониновых рецепторов C1 и C2, различающихся по родству к агонистам и антагонистам серотонина, по локализации в структурах мозга и по связи с серотонинчувствительной аденилатциклазой [1—3]. Функциональная роль C2 изучена очень слабо [4—6], роль C1 вообще не ясна.

Фармакологические исследования свидетельствуют о возможном участии C1 рецепторов в регуляции таких форм поведения, как межсамцовая агрессия мышей [7], половое поведение самок крыс [8] и в терморегуляции у крыс [9]. Однако никаких данных об изменении числа C1 рецепторов в зависимости от поведения или функционального состояния животного не имеется. Это вызвало сомнение в самом существовании рецепторов типа C1 [10].

Важным для выявления функциональной роли серотониновых рецепторов является выбор адекватной поведенческой серотонинзависимой модели. Такой моделью может служить, например, зимняя спячка.

поскольку она представляет резко контрастное по сравнению с бодрствованием состояние и характеризуется существенными особенностями метаболизма серотонина в мозгу [11]. Более того, показано, что экспериментальное снижение содержания серотонина в мозгу приводит к пробуждению сусликов от спячки [12], а центральное введение серотонина замедляет пробуждение [13, 14].

Целью настоящего исследования явилось определение числа центров рецепторного связывания серотонина С1 и С2 рецепторами в мозгу сусликов в различные периоды цикла бодрствование—зимняя спячка.

Материалы и методы

В опытах использовали взрослых краснощеких сусликов (*Citellus erythrogenys major*) обоего пола массой 250—350 г. Отловленных животных содержали в открытом вольере, пищу (сухой корм и свежую траву) и воду они получали без ограничений. В конце сентября сусликов переносили в специальное помещение, где они впадали в спячку и находились в течение всего периода спячки при температуре воздуха 4°.

Серотониновые рецепторы определяли у полностью естественно подготовившихся к спячке сусликов (при температуре тела $36.5 \pm 0.2^\circ$) перед впадением в спячку (сентябрь), во время глубокой спячки (при температуре тела 4°), во время пробуждения от спячки (два срока—при температуре тела 22° и 37°) и летом в активном состоянии животных (при температуре тела 37°). Период, непосредственно предшествовавший впадению сусликов в спячку, характеризовался понижением двигательной активности, вялостью, попеременным засыпанием и пробуждением животного, некоторым понижением температуры тела, остававшейся тем не менее еще в пределах нормотермии. Пробуждение сусликов вызывали в апреле, перенося животных в помещение с температурой воздуха 18—20°, что способствовало их быстрому пробуждению.

Специфическое связывание серотонина рецепторами С1 определяли радиолигандным методом [15] в мембранной фракции гомогената фронтального отдела коры больших полушарий мозга, полосатого тела, гиппокампа и среднего мозга; связывание рецепторами С2—во фронтальной коре, так как в этом отделе мозга С2 рецепторы определяются наиболее надежно [3]. Необходимо отметить, что, хотя достаточно распространенный термин «количество (число) рецепторов» менее корректен, чем «число центров рецепторного связывания», ввиду его простоты мы используем с известными оговорками [16].

Для определения количества С1 и С2 рецепторов у декапитированных животных на лбу выделяли соответствующие отделы мозга и помещали их в жидкий азот до начала определения. Замороженную ткань гомогенизировали в трис-НСI буфере, рН 7.6 и центрифугировали (20 мин, 20000g) для осаждения мембранной фракции [17]. Затем осажденные мембраны инкубировали в том же буфере в течение 10 мин при 37° для удаления эндогенного серотонина и вновь центрифугировали

ли 20 мин при 20000g. Конечную гомогенизацию производили в буфере с добавлением NaCl, CaCl₂, KCl и MgCl₂, ингибитора МАО—паргилина и 0,1%-ной аскорбиновой кислоты, что уменьшает неспецифическое связывание метки [18]. В качестве метки использовали [³H] серотонин («Amersham», Англия) в концентрации 14 нМ при определении С1 рецепторов и [³H] спиперон («Amersham», Англия) в концентрации 1,4 нМ при определении С2 рецепторов, а в качестве заместителей—буфотенин («Serva», ФРГ) и кетансерин («Janssen Pharmaceutica», Бельгия) в концентрациях 10 мкМ и 10 нМ соответственно. Суспензию ткани, содержащую метку и заместитель, инкубировали при 37° и быстро отфильтровывали через стекловолокнистые фильтры GF/B под вакуумом. Осадок на фильтрах трижды промывали 5 мл охлажденного трис-HCl буфера в целях удаления несвязанной метки. Затем фильтры с осадком мембран высушивали при комнатной температуре. Их радиоактивность определяли на жидкостном сцинтилляционном счетчике «Delta-300»; для этого их помещали во флаконы с толуоловым сцинтиллятором. Специфическое связывание метки с рецептором определяли по разнице между связыванием его в отсутствие и в присутствии избытка нерадиоактивного заместителя и выражали в фмоль/мг белка. Концентрацию белка в пробе определяли по методу Lowry и соавт. [19]. Количество белка в пробе было в пределах 1—4 мг. Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

В период, непосредственно предшествующий зимней спячке (в конце сентября), у сусликов, подготовившихся к ней, но еще поддерживавших температуру тела в пределах, характерных для гомойотермных животных, было обнаружено повышение количества С1 и С2 серотониновых рецепторов во фронтальной коре больших полушарий и С1 рецепторов в гиппокампе (см. рис.) по сравнению с активными бодрствующими сусликами. Количество же С1 рецепторов в среднем мозгу и полосатом теле существенно не изменялось.

Сдвиги количества серотониновых рецепторов перед самым впадением животных в спячку имели место еще в состоянии нормотермии и проявлялись не во всех отделах мозга. Обращает на себя внимание то, что повышение количества С1 рецепторов отмечено в гиппокампе—единственном образовании мозга, в котором ранее было обнаружено повышение содержания серотонина также еще перед впадением в зимнюю спячку [11]. Следует отметить, что лимбические структуры, особенно гиппокамп, на основании электрофизиологических исследований относят к образованиям, которые могут играть триггерную роль в возникнове-

* Авторы благодарят фирму «Janssen Pharmaceutica» за любезно предоставленный кетансерин.

нии спячки и в пробуждении [20]. В то же время необходимо подчеркнуть, что, поскольку мы не определяли значения K_d , нельзя исключить изменений в средстве рецепторов к серотонину как причину увеличения его связывания.

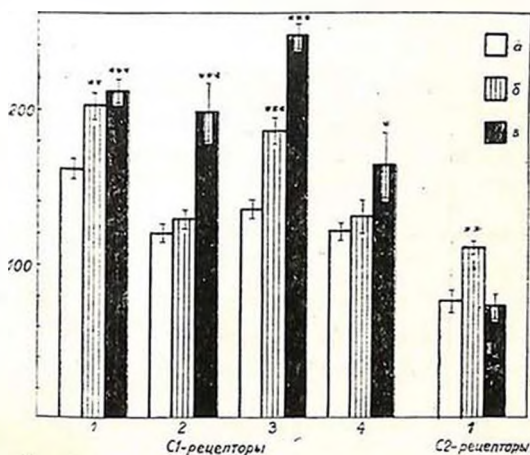


Рис. Количество серотонинсвязывающих C1 и C2 рецепторов в разных отделах головного мозга краснощекого суслика в активном состоянии, перед впадением в зимнюю спячку и при зимней спячке. 1—фронтальная кора больших полушарий, 2—средний мозг, 3—гиппокамп, 4—полосатое тело; а—бодрствование, б—перед впадением в зимнюю спячку, в—зимняя спячка; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; каждая точка представляет собой результат не менее 5 опытов. По оси ординат—количество рецепторов в фмоль/мг белка

Наступление глубокой зимней спячки сопровождалось дальнейшим увеличением количества C1 рецепторов в гиппокампе. Однако и в других отделах мозга—во фронтальной коре, среднем мозгу и полосатом теле, количество C1 рецепторов в состоянии спячки было существенно выше, чем у активных бодрствующих животных. Количество же C2 рецепторов в коре больших полушарий у находящихся в глубокой спячке сусликов не отличалось от бодрствующих животных и, таким образом, было достоверно снижено по сравнению с периодом, предшествовавшим засыпанию (см. рис.).

При пробуждении сусликов от зимней спячки число C2 рецепторов не изменялось. У спящих сусликов оно равнялось $73,11 \pm 4,9$ фмоль/мг белка: при пробуждении животного и повышении температуры его тела до 22° количество C2 рецепторов составляло $69,0 \pm 3,6$ фмоль/мг белка. Затем при достижении уже нормальной температуры тела 37° эта величина практически не менялась ($68,2 \pm 3,3$ фмоль/мг белка).

Иную картину наблюдали в случае C1 рецепторов. При пробуждении сусликов происходили изменения, противоположные установленным:

при впадении животных в зимнюю спячку.—понижение числа С1 рецепторов. В процессе пробуждения при температуре тела 22° число С1 рецепторов в коре больших полушарий и в полосатом теле достоверно снижалось. В гиппокампе и среднем мозгу также отмечена тенденция к понижению числа С1 рецепторов по мере разогревания животного (таблица).

Таблица

Изменение числа С1 рецепторов в отделах головного мозга сусликов при пробуждении (фмоль/мг белка)

Отделы мозга	Температура тела		
	4°	22°	37°
Фронтальная кора	218,38±6,49 (15)	150,08±6,78** (8)	171,39±6,07** (10)
Гиппокамп	263,51±7,80 (6)	269,00±13,44 (4)	227,72±19,46 (5)
Средний мозг	212,49±19,86 (5)	186,97±7,47 (4)	168,29±15,26 (5)
Полосатое тело	167,80±19,27 (6)	111,46±11,51* (4)	165,25±10,02 (5)

Примечание. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ по сравнению с данными при 4°, в скобках—количество животных.

Уменьшение числа С1 рецепторов в головном мозгу при выходе сусликов из состояния зимней спячки хорошо согласуется с полученными нами ранее данными о понижении активности серотониновой системы мозга, усиленном катаболизме серотонина и падении его содержания в мозгу во время пробуждения от спячки [14]. Можно полагать, что ослабление эффектов серотонина, проявляющееся в снижении числа его С1 рецепторов в ряде отделов мозга, является одним из механизмов, обеспечивающих выход животного из состояния зимней спячки. Привлекает внимание тот факт, что снижение количества С1 рецепторов во время пробуждения наступает очень быстро. Весь период пробуждения при перенесении животных в теплое помещение длится около 2 ч [11], до 22° температура тела повышается приблизительно в течение 1,5 ч. Этого времени оказывается достаточно для уменьшения числа рецепторов в коре больших полушарий и в полосатом теле на 25—30%. Скорость уменьшения числа рецепторов заставляет предположить, что скорее всего при этом происходят именно конформационные изменения, в результате которых С1 рецепторы теряют свое высокое сродство к серотонину и становятся функционально неактивными.

Таким образом, наступление зимней спячки сопровождается выраженными изменениями в количестве серотониновых рецепторов головного мозга, причем наиболее значительные изменения происходят в числе С1 рецепторов. Изменение числа С2 рецепторов обнаружено лишь в одной фазе цикла бодрствование—зимняя спячка: их количество повышалось

непосредственно перед впадением сусликов в спячку, затем снижалось. Количество же 5-HT_1 рецепторов менялось на протяжении всех периодов этого цикла. Увеличение числа 5-HT_1 рецепторов, отмеченное перед впадением в спячку в гиппокампе и фронтальной коре, во время зимней спячки было обнаружено и в других отделах мозга—полосатом теле и среднем мозгу. Пробуждение сопровождалось снижением числа 5-HT_1 рецепторов. Характер обнаруженных нами изменений соответствует представлениям о возможной роли серотонина мозга, как фактора, индуцирующего состояние зимней спячки [11], и согласуется с предположением [2], что ингибирующее влияние серотонина на серотонинзависимые формы поведения опосредуется 5-HT_1 рецепторами. Полученные результаты свидетельствуют, что 5-HT_1 рецепторы головного мозга являются функциональными рецепторами, причем их функции, по-видимому, отличаются от функций 5-HT_2 рецепторов.

SEROTONIN RECEPTORS OF THE BRAIN DURING HIBERNATION

ПАК D. F., KULIKOV A. V., POPOVA N. K.

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

To define the functional role of the serotonin (5-HT) receptors the number of the binding sites of 5-HT_1 and 5-HT_2 types in the active state of ground squirrel and during the hibernation was determined. The number of the 5-HT_1 receptors was increased in the frontal cortex and in the hippocampus just before the hibernation and was considerably higher in the frontal cortex, midbrain, hippocampus and striatum of the hibernating animals than in the same areas the active ones. The number of the 5-HT_1 receptors decreased quickly after arousal in all structures of the brain studied. The number of the 5-HT_2 receptors increased before the beginning of hibernation, being on the normal level during the hibernation and arousal. It was concluded that the 5-HT_1 receptors are involved in the mechanism of natural hibernation and that their role differs from that of the 5-HT_2 receptors.

ЛИТЕРАТУРА

1. Peroutka S. J., Lebovitz R. M., Snyder S. H. *Mol. Pharmacol.*, v. 16, p. 700—708, 1979.
2. Peroutka S. J., Lebovitz R. M., Snyder S. H. *Science*, v. 212, p. 827—829, 1981.
3. Peroutka S. J., Snyder S. H. *Feder. Proc.*, v. 42, p. 213—217, 1983.
4. Leysen J. E., Gommeren W., Luduron P. M. *Biochem. Pharmacol.*, v. 27, p. 307—316, 1978.
5. Leysen J. E. *J. physiol. (France)*, v. 77, p. 351—362, 1981.
6. Lucki I., Nobler M. S., Frazer A. J. *Pharmacol. and Exp. Ther.*, v. 223, p. 133—139, 1981.
7. Куликов А. В. *Изв. СО АН СССР, сер. биол. наук, вып. 3*, с. 123—126, 1983.

8. *Wilson C. A., Hunter A. J. Brain Res.*, v. 333, p. 223—229, 1955.
9. *Попова Н. К., Концсова А. В. Бюл. эксперим. биол. и мед.*, т. 95, № 6, с. 3—5, 1983.
10. *Laduron P. M.*—In: *Investigation of membrane -located receptors* (eds. Roid E., Cook G. M. W., Morre D. J.), p. 31—46, N. Y., Plenum Press, 1984.
11. *Попова Н. К., Науменко Е. В., Колпаков В. Г. Стресс и поведение*, с. 145—187, Новосибирск, Наука, 1978.
12. *Jouvet M., Pujol J—F. Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, v. 11, p. 199—209, 1974.
13. *Попова Н. К. Физiol. журн. СССР*, т. 61, № 1, с. 153—156, 1975.
14. *Попова Н. К., Кудрявцева Н. Н. Патол. физиология и эксперим. терапия*, вып. 6, с. 72—74, 1975.
15. *Peroutka S. J., Snyder S. H. Molec. Pharmacol.*, v. 16, p. 687—699, 1979.
16. *Попова Н. К., Куликова А. В., Пак Д. Ф. Бюл. эксперим. биол. и мед.*, т. 100, № 9, с. 322—324, 1985.
17. *Nelson D. L., Pedigo N. W., Yamamura H. I. J. physiol. (France)*, v. 77, p. 369—372, 1981.
18. *Gripenberg J., Jansson S. E. Acta physiol. scand.*, v. 102, p. 123—125, 1978.
19. *Lowry O. H., Rosenbrough M. J., Farr A., Randall R. J. J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265—275, 1951.
20. *Штарк М. Б. Мозг зимоспящих*, Новосибирск, Наука, 1970.

Пестушила 2. VII 1986



УДК 612.822.1

ВЛИЯНИЕ КАРДИОАКТИВНЫХ НЕЙРОГОРМОНОВ «Г» И «К»
НА ВЫСВОБОЖДЕНИЕ И ЗАХВАТ $[^3\text{H}]$ НОРАДРЕНАЛИНА
В СИНАПТОСОМАХ ГИПОТАЛАМУСААРМЕНЯН А. Р., АРАКЕЛЯН Л. Н., СРАПИОНЯН Р. М.,
КАРАПЕТЯН Р. О., СААКЯН Ф. М., СААКЯН С. А., ГАЛОЯН А. А.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Изучено влияние нейрогормонов «Г» и «К» на K^+ -вызванное высвобождение и захват $[^3\text{H}]$ норадреналина ($[^3\text{H}]\text{НА}$) в гипоталамических синапсосомах мозга крыс. Нейрогормон «Г» (нГ) в концентрации 25 мЕ/мл, добавленный одновременно с K^+ , подавлял K^+ -вызванное высвобождение $[^3\text{H}]\text{НА}$, тогда как в концентрации 50 мЕ/мл—стимулировал этот процесс. Когда нГ в концентрации 50 мЕ/мл добавляли к суперфузионной среде до стимуляции синапсом, а затем вместе с K^+ , то усиления вызванного высвобождения $[^3\text{H}]\text{НА}$ больше не наблюдалось. В присутствии нГ в концентрациях 5 и 100 мЕ/мл вызванное высвобождение $[^3\text{H}]\text{НА}$ не изменялось. В концентрациях 20 и 50 мЕ/мл нГ увеличивал специфический захват $[^3\text{H}]\text{НА}$ синапсосомами. Нейрогормон «К» (нК) в концентрации 0,05 Бд^{*}/мл стимулировал K^+ -вызванное высвобождение $[^3\text{H}]\text{НА}$. В присутствии нК (0,01—0,1 Бд/мл) захват $[^3\text{H}]\text{НА}$ синапсосомами не изменялся. Полученные результаты говорят о возможном участии нГ и нК в процессе пресинаптической регуляции высвобождения НА в гипоталамической области мозга.

Установлено, что в нейросекреторных гранулах магнотеллюлярных ядер гипоталамуса ряда животных вырабатываются пептидные нейрогормоны, оказывающие регулирующее влияние на сердечную деятельность. Условно их называли нейрогормоны «Г», «К» и «С» [1, 2]. Выяснено, что эти вещества, поступая из мозга в общую циркуляцию, связываются с γ -глобулинами сыворотки крови и транспортируются к сердцу [3]. Далее из гипоталамуса и нейрогипофиза ряда животных выделены коронароактивные белки—предшественники и носители нГ, нК и нС [4]. Изучение субклеточного распределения этих нейроспецифических белков выявило их локализацию в нейросекреторных гранулах и синапсосомах гипоталамуса и коры мозга [5]. Из этих нейрогормонов наиболее подробно изучен нС, который оказался активным регулятором различных метаболических процессов в мозгу и висцеральных органах [6]. В настоящее время нГ и нК сравнительно мало

* Бд—биологическая доза

изучены. Выявлено, что нГ, подобно нС, ингибирует активность фосфо-диэстеразы (ФДЭ) сАМР в мозгу и увеличивает фосфорилазную активность в мозгу, скелетной мышце и почках. В отношении нК доказано, что он не действует на ФДЭ сАМР [7].

Синаптосомная локализация нейрогормонов предполагает их участие в синаптических процессах, в частности, в регуляции обмена нейромедиаторов. Исходя из этого, в настоящей работе мы изучали влияние нГ и нК на захват и K^+ -вызванное высвобождение $[^3H]$ НА в гипоталамических синаптосомах.

Материалы и методы

Нервные окончания из гипоталамической области мозга крыс, выделенные по методу Najos [8], инкубировали 10 мин в присутствии $[^3H]$ НА ($5 \cdot 10^{-8}$ М). Затем синаптосомную суспензию переносили в суперфузионные камеры на мембранные миллипоровые фильтры (диаметр пор 0,65 мкм, тип ДА). Высвобождение $[^3H]$ НА из синаптосом изучали суперфузионным методом Raiteri и соавт. [9]. Скорость супер-

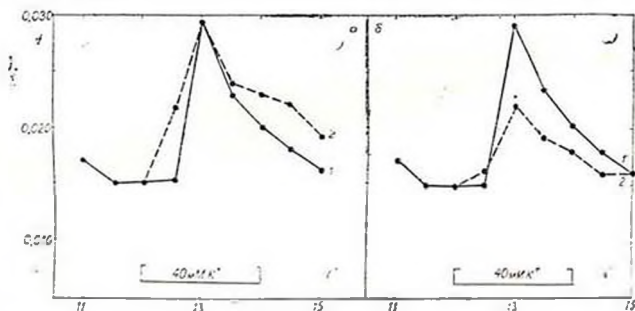


Рис. 1. Влияние 5 мЕ/мл (а) и 25 мЕ/мл (б) нейрогормона «Г» на K^+ -вызванное высвобождение 3H -норадреналина из гипоталамических синаптосом. По оси абсцисс—время суперфузии в мин; по оси ординат—степень высвобождения 3H -норадреналина. 1—контроль, 2—нейрогормон «Г». Средние данные 5—8 опытов; стандартное отклонение не более 10%; $p < 0,005$

фузии составляла 1 мл/мин. Степень высвобождения $[^3H]$ НА (i) рассчитывали по отношению радиоактивности суперфузионной среды к оставшейся общей радиоактивности синаптосом. При изучении захвата инкубированную суспензию ($0,77 \pm 0,07$ мг белка/мл) в присутствии $[^3H]$ НА и нейрогормонов переносили на миллипоровые фильтры и промывали. Для вычитания неспецифического захвата проводили параллельную инкубацию синаптосом при 0° . Радиоактивность синаптосом и среды измеряли после добавления 0,5 мл этанола и 10 мл сцинтилляционной жидкости Брея на жидкостном сцинтилляционном счетчике «Intertechnique SL-4221» (Франция). Подробности методики исследований описаны в предыдущей работе [10].

Использовали Кребс-бикарбонатный буфер pH 7.2—7.4 со следующим составом (мМ): NaCl—113; KCl—4,75; KH_2PO_4 —1,2; MgSO_4 —1,2; NaHCO_3 —25; CaCl_2 —2,5; глюкоза—11,5. В буфер добавляли ипразид ($6,10^{-4}$ М), аскорбиновую кислоту ($1,14 \cdot 10^{-3}$ М) для предотвращения распада НА. В K^+ -обогащенной среде (40 мМ) изотоничность среды достигалась изомолярным замещением NaCl на KCl.

Использовали [^3H]НА (35 $\text{K}_\text{и}/\text{мМ}$) фирмы «Amersham». Белок определяли по методу Lowry и соавт. [11].

Препараты кардиоактивных нейrogормонов выделены из состава низкомолекулярных соединений уксуснокислого экстракта обезжиренной гипоталамической ткани. Препараты очищали по разработанной схеме, включающей ИОХ на ДЭАЭ-ц, гель-фильтрацию через сефадекс G-25, распределительную хроматографию на бумаге FN-11 в системе растворителей бутанол-уксусная кислота-вода (4:1:5) и повторную гель-фильтрацию через глицинамидированный сефадекс [12].

За единицу активности (Е) иГ принимали количество препарата, которое ингибирует 1 миллиединицу ФДЭ сАМР гомогената мозга крысы за 1 мин. За одну биологическую дозу иК принимали такое количество препарата, которое увеличивает объем крови, оттекающей из венных сосудов сердца, на 100%.

Результаты и обсуждение

Влияние иГ на K^+ -вызванное высвобождение и специфический захват [^3H]НА в гипоталамических синапсах. Гипоталамические синапсы, инкубированные в присутствии [^3H]НА, промывали буфером и на 12-ой мин суперфузии добавляли K^+ -обогащенную среду, при котором выход [^3H]НА из синапсом усиливался на 93%. Затем к синапсам одновременно с K^+ добавляли иГ в концентрациях 5, 25, 50 и 100 мЕ/мл. Результаты исследований показали, что иГ в концентрации 5 мЕ/мл не изменяет K^+ -вызванное высвобождение [^3H]НА из синапсом, но после стимуляции при промывании синапсом буфером возвращение высвобождения [^3H]НА к его спонтанному уровню происходит медленно (рис. 1, а). Когда к синапсам вместе с K^+ добавляли иГ в концентрации 25 мЕ/мл, вызванное высвобождение [^3H]НА из синапсом значительно подавлялось и составляло 47% (рис. 1, б).

Дальнейшее увеличение концентрации иГ в 2 раза (50 мЕ/мл) привело к обратному эффекту—усилению K^+ -вызванного высвобождения [^3H]НА. Примечательно, что при промывании синапсом буфером после стимуляции в присутствии 50 мЕ/мл иГ высвобождение [^3H]НА из синапсом вновь усиливалось, достигая уровня максимального усиления (рис. 2, а, 2). В следующей серии опытов, когда иГ в концентрации 50 мЕ/мл добавляли до стимуляции синапсом, а затем со стимуляцией, спонтанное высвобождение [^3H]НА не изменялось, но усиления K^+ -вызванного высвобождения больше не наблюдалось (рис. 2, а, 3).

Большие концентрации нГ (100 мЕ/мл) не вызывали статистически достоверных изменений K^+ -вызванного высвобождения $[^3H]HA$ из синапсом (рис. 2, б).

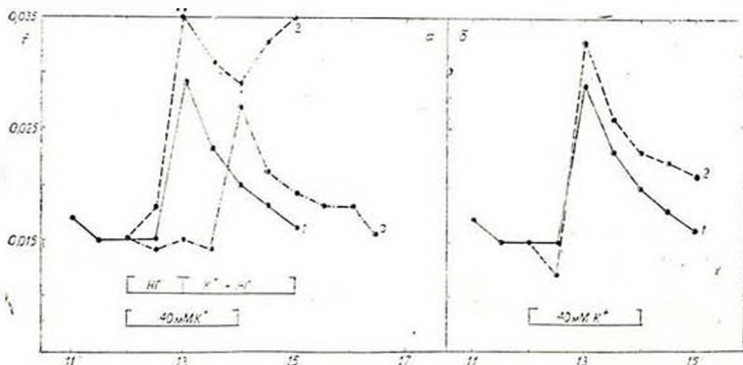


Рис. 2. Влияние 50 мЕ/мл (а) и 100 мЕ/мл (б) нейрогормона «Г» на K^+ -вызванное высвобождение $[^3H]$ -норадреналина из гипоталамических синапсом. 1—контроль. 2—нейрогормон «Г» добавлен вместе с K^+ . 3—нейрогормон «Г» добавлен до и вместе с K^+ . Средние данные 4—7 опытов; стандартное отклонение не более 10%; Обозначения те же, что и на рис. 1; $^{**}p < 0,01$

При изучении влияния нГ на специфический захват $[^3H]HA$ гипоталамическими синапсом применяли его в концентрациях 5: 10: 20: 50 и 100 мЕ/мл. Как видно из таблицы, захват $[^3H]HA$ в присутствии нГ увеличивается, однако статистически достоверное увеличение наблюдалось при применении 20 и 50 мЕ/мл нГ, что составляло 39 и 37% соответственно.

Влияние нК на K^+ -вызванное высвобождение и специфический захват $[^3H]HA$ в гипоталамических синапсом. Стимуляцию гипоталамических синапсом, предварительно инкубированных с $[^3H]HA$, проводили в присутствии 0,01: 0,025: 0,05: 0,1 Бд/мл нК. Как показали исследования, только в концентрации 0,05 Бд/мл нК стимулировал K^+ -вызванное высвобождение $[^3H]HA$ из синапсом (53%), остальные использованные нами дозы нК не вызывали статистически достоверных изменений этого процесса (рис. 3).

В вышеупомянутых концентрациях нК не изменял процесса специфического захвата $[^3H]HA$ гипоталамическими синапсом (таблица).

Таким образом, полученные нами результаты указывают на то, что нК стимулирует, а нГ, в зависимости от концентрации, подавляет или усиливает K^+ -вызванное высвобождение $[^3H]HA$ из гипоталамических синапсом. Однако не известно, каким механизмом осуществляется их действие на высвобождение НА.

Как уже отмечали, нК не действует, а нГ ингибирует активность

ФДЭ сАМР в мозгу. Но отсутствуют данные об их действии на активность аденилатциклазы, которые помогли бы в интерпретации полученных нами данных. Предполагается, что активация пресинаптических α -адренорецепторов влияет на вызванное деполяризацией высвобождение

Таблица

Влияние нейрого르몬ов «Г» и «К» на захват $[^3\text{H}]$ норадреналина (пмоль/мг белка) гипоталамическими синаптосомами

Контроль		1,32 $\pm$ 0,18 (4)	Контроль		1,95 $\pm$ 0,17 (5)
Нейрого르몬 «Г»	5 мЕ/мл	1,64 $\pm$ 0,07 (8)	Нейрого르몬 «К»	0,01 Бд/мл	1,91 $\pm$ 0,10 (6)
	10 мЕ/мл	1,56 $\pm$ 0,07 (6)		0,025 Бд/мл	2,08 $\pm$ 0,16 (5)
	20 мЕ/мл	1,84 $\pm$ 0,07 $p < 0,05$ (7)		0,05 Бд/мл	1,76 $\pm$ 0,14 (7)
	50 мЕ/мл	1,82 $\pm$ 0,07 $p < 0,05$ (8)		0,1 Бд/мл	1,70 $\pm$ 0,06 (6)
	100 мЕ/мл	1,31 $\pm$ 0,06 (9)		—	—

Примечание. В скобках указано число опытов.

НА посредством ингибирования аденилатциклазной системы, а активация β -адренорецепторов модулирует этот процесс посредством стимуляции аденилатциклазной системы [13—15]. Возможно, что в зависимости от концентрации нГ может ингибировать или стимулировать активность аденилатциклазы и выступать в роли агониста α - или β -адренорецеп-

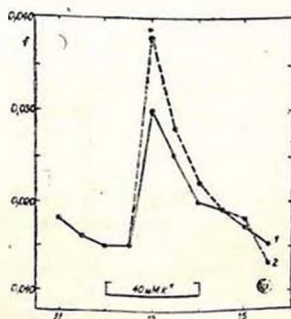


Рис. 3. Влияние нейрого르몬а «К» (0,05 Бд/мл) на K^+ -вызванное высвобождение ^3H -норадреналина из гипоталамических синапсом: 1—контроль, 2—нейрого르몬 «К». Средние данные 6—8 опытов; стандартное отклонение не более 10%; обозначения те же, что и на рис. 1.

торов. Отсутствие стимулирующего действия 50 мЕ/мл нГ при его длительном применении (до и вместе с K^+ , по всей вероятности, можно объяснить увеличением его концентраций в норадренергических окончаниях, а большие дозы нГ, как было показано, не оказывают действия на K^+ -вызванное высвобождение $[^3\text{H}]$ НА (рис. 3).

Наши исследования показали, что нК не влияет, а нГ в концентрации 20 и 50 мЕ/мл увеличивает захват $[^3\text{H}]$ НА гипоталамическими синапсосомами, несмотря на то, что эти концентрации оказывают разно-

направленное действие на вызванное высвобождение $[^3\text{H}]\text{НА}$. Полученные результаты свидетельствуют об участии исследуемых нейрогормонов в пресинаптической регуляции высвобождения НА в гипоталамусе.

EFFECT OF CARDIOACTIVE NEUROHORMONES „G“ AND „K“ ON THE RELEASE AND UPTAKE OF ^3H -NORADRENALINE IN HYPOTHALAMIC SYNAPTOSOMES

ARMENIAN A. R., ARAKELIAN L. N., SRAPIONIAN R. M., KARAPETIAN R. H., SAHAKIAN F. M., SAHAKIAN S. A., GALOYAN A. A.

Institute of Biochemistry, ArmSSR Acad. Sci., Yerevan

Effect of neurohormones „G“ and „K“ on the K^+ -evoked release and uptake of ^3H -noradrenaline (^3H -NA) in rat hypothalamic synaptosomes has been studied. In the presence of 25 I./Uml of neurohormone „G“ (added during stimulation) the K^+ -evoked (40 mM) release of ^3H -NA from synaptosomes reduced, being enhanced by 50 I./Uml of neurohormone „G“. The activatory effect of neurohormone „G“ was not observed when it is added before and during stimulation of synaptosomes. In the presence of 5 and 100 I./Uml of neurohormone „G“ the K^+ -evoked release of ^3H -NA was not altered. Neurohormone „G“ (20 and 50 I./U ml) enhanced the uptake of ^3H -NA by synaptosomes. Neurohormone „K“ (0.5 biol. dose/ml) increased K^+ -evoked release of ^3H -NA, but in 0.01–0.1 biol. dose/ml it exerted no effect on the uptake of ^3H -NA. Data obtained indicate that neurohormones may be involved in the presynaptic regulation of NA release in hypothalamus.

ЛИТЕРАТУРА

1. Галоян А. А. Докл. АН АрмССР, т. 34, с. 109–111, 1962.
2. Галоян А. А., Саакян Ф. М. Докл. АН АрмССР, т. 201, с. 483–485, 1971.
3. Галоян А. А., Оганян М. В., Геворкян Г. Г. Докл. АН АрмССР, т. 54, с. 255, 1971.
4. Галоян А. А., Срапионян Р. М. Докл. АН АрмССР, т. 42, с. 210–213, 1966.
5. Srapionian R. M., Sahakian F. M., Galoyan A. A. Neurochemical Research, v. 6, p. 1299–1307, 1981.
6. Галоян А. А. Вopr. биохимии мозга, т. 13, с. 9–38, 1978.
7. Срапионян Р. М., Арменян А. Р., Карапетян Р. О., Саакян Ф. М., Саакян С. А., Аракелян Л. Н., Галоян А. А. Тезисы докл. Международного симпозиума нейроэндокринологии, с. 129, Ленинград, 1935.
8. Hajos F. Brain Res., v. 93, p. 485–489, 1975.
9. Raiteri M., Angelini F., Levi G. Eur. J. Pharmacol., v. 25, p. 411–414, 1974.
10. Арменян А. Р., Чифлякян М. Д., Бунятыян Г. X. Вopr. биохимии мозга, т. 14, с. 135–142, 1980.
11. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., v. 193, p. 265–275, 1951.
12. Галоян А. А., Срапионян Р. М., Карапетян Р. О., Саакян С. А. Докл. АН АрмССР, т. 67, с. 176–179, 1978.
13. Rodball M. Nature, v. 254, p. 17–22, 1980.
14. Werner J., Schoffelemer A. N. M., Mulder A. H. J. Neurochem., v. 39, p. 349–356, 1982.
15. Fain J. N., Garcia-Satz J. A. Life Sci., v. 26, p. 1183–1194, 1950.

Поступила 17. IX 1986



УДК 612.82.821.2

О НЕКОТОРЫХ МЕХАНИЗМАХ ДЕЙСТВИЯ НЕЙРОПЕПТИДОВ И ИХ АНАЛОГОВ НА ПРОЦЕССЫ ОБУЧЕНИЯ И ПАМЯТИ

КРУГАНКОВ Р. И., ДИШ Т. И., КОШТОЯНЦ О. Х.,
МАРКАРОВА М. Ю., ПУЗЫРЕВА Т. Г.

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии АН СССР, Москва

На фоне системного введения нейропептидов различных семейств изучали холмическую и адренореактивность нейронов сенсорной коры и проницаемость ГЭБ для флуоресцирующего натрия.

Было выявлено перераспределение доли клеток, реагирующих активирующей, тормозящей и аргативной формами реакций на подводимые к ним АХ и коррадиации на фоне применения различных нейропептидов, что позволяет, в определенной мере, полагать, что неодинаковое влияние на процесс обучения и памяти обусловлено особенностями их действия на хемореактивные свойства мембран церебральных нейронов.

Изучение состояния ГЭБ на фоне действия нейропептидов показало, что защитная функция ГЭБ остается довольно устойчивой под действием нейропептидов, тогда как другие гистогематические барьеры претерпевают определенное изменение.

Многочисленные факты участия нейропептидов (НП) в процессах обучения и памяти выдвигают вопрос о механизмах этого явления. Направления поисков ответов на него вытекают из принципа взаимодействия химических субстратов, участвующих в обеспечении интегративной деятельности головного мозга. Одно из таких направлений состоит в исследовании роли «классических» нейромедиаторов и информационных макромолекул—нуклеиновых кислот и белков—в механизмах влияния НП на обучение и память. К настоящему времени получены убедительные доказательства зависимости поведенческих эффектов НП от состояния моноаминергических систем мозга [1—4]. Имеются указания и о влиянии НП на нейромедиаторные системы [4—7]. Поскольку такое влияние может играть существенную роль в механизмах участия НП в интегративной деятельности мозга, его целенаправленное изучение вызывает большой интерес. Функциональное же состояние нейромедиаторных систем определяется не только соотношением синтеза, секреции и инактивации нейромедиаторов, но и состоянием соответ-

ствующего рецепторного аппарата. Поэтому целесообразны исследования системных введений различных НП на чувствительность церебральных нейронов к «классическим» нейромедиаторам.

Для понимания центральных эффектов системно вводимых НП чрезвычайно существенно учитывать состояние гистогематических барьеров в целом и ГЭБ в особенности. В соответствии с этим задача настоящей работы состояла в исследовании влияния системного введения различных НП на чувствительность нейронов сенсомоторной коры крыс к АХ и норадреналину (НА) и на функциональное состояние гистогематических барьеров и ГЭБ.

Материалы и методы

Опыты по исследованию НП на хемореактивные свойства нейронов проводили на беспородных белых крысах массой до 250 г, обездвиженных α -тубокурарином. К черепу крепили миниатюрный микроманипулятор с помощью протакрила. 3-ствольный структурированный микроэлектрод погружали на уровень IV—VI слоев коры больших полушарий. Стволы электрода заполняли 3 М раствором NaCl (регистрирующий электрод), 2 М раствором АХ (рН 4) и 0,2 М раствором битартрата НА. Подведение АХ и НА к нейронам осуществляли током фореза при 10—40 нА в течение 30 с; сдерживающий ток не превышал 4—5 нА. Импульсную активность исследуемых нейронов регистрировали в течение 1,5 мин перед подведением АХ и НА, во время их подведения (30 с) и в течение 2 мин после подведения. Для анализа использовали 60-секундные интервалы записи импульсной активности до и после микроионофореза нейромедиаторов. Критерием реакций нейронов на ионофоретическое подведение АХ и НА служило изменение частоты импульсации нейронов не менее чем на 20%. Три исследуемых пептида—дес-глициларгининвазопрессин (ДГ-АВП), циклический аналог энкефалина (ЦАЭ) и представитель экзорфинов—казоморфин—вводили подкожно из расчета 10 мкг на крысу, а четвертый—даларгин—5 мкг. Определение хемореактивных свойств нейронов начиналось через 5 мин после введения пептида и продолжалось до 3 ч.

Флуоресценция натрия в ткани мозга и в крови крыс определяли по методу Утевской [8]. Животным за 10 мин до декапитации внутрибрюшинно вводили 25 мг/кг (5 мг в 1 мл H_2O) флуоресценции натрия. Ткань мозга гомогенизировали с 96° спиртом 15 мин, затем центрифугировали. Критерием проницаемости служило процентное отношение концентрации красителя в вытяжке из ткани мозга к его концентрации в спиртовом экстракте сыворотки одновременно взятой крови. Анализ экстрагируемого из мозга и крови красителя проводили в камере для определения флуоресцирующих веществ, предложенной Владимировым и Литвиновым, которая позволяет измерить содержание флуоресцирующих веществ в биологических жидкостях с точностью до 0,1 мкг.

Результаты и обсуждение

Было установлено, что влияние НП на нейромедиаторные системы головного мозга может осуществляться путем изменения хемореактивных свойств мембран церебральных нейронов. Так, при системном введении ряда НП—ДГ-АВП, ЦАЭ, даларгина и казоморфина наступали выраженные изменения хемореактивных свойств мембран церебральных нейронов, проявлявшиеся в изменениях соотношений возбуждавшихся, тормозившихся и ареактивных нейронов при микроионофоретическом подведении АХ и НА.

Таблица 1

Влияние системного введения десглицилларгинаиназапрессина, циклического аналога лизина, даларгина и казоморфина на чувствительность нейронов сенсомоторной коры к микроионофоретическому подведению норадреналина (НА) и ацетилхолина (АХ) (относительное количество активирующихся, ареактивных и тормозящихся нейронов, в %)

Медиа-тор	Реакция нейронов на подведенный нейромедиатор	Норма (111)	ДГ-АВП (63)	ЦАЭ (47)	Даларгин (29)	Казоморфин (25)
АХ	активация	42±5	52±7	57±7	55±9	40±10
	отсутствие реакции	24±4	21±5	34±7	17±7	52±10*
	торможение	34±4	27±6	9±4*	28±8	8±6*
НА	активация	41±5	25±6*	49±7	34±9	20±8*
	отсутствие реакции	22±4	35±6	34±7	21±8	65±10*
	торможение	37±5	40±6	17±6*	45±9	15±8*

Примечание. Здесь и в табл. 2 в скобках указано количество опытов * $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

При анализе полученных данных (табл. 1) обращает на себя внимание ряд фактов. Это прежде всего изменение хемореактивных свойств мембран церебральных нейронов при системном введении НП. Низкая проницаемость ГЭБ для НП [9—12] выдвигает вопрос о природе как описанного, так и других центральных эффектов НП. К его обсуждению мы вернемся ниже. Здесь же важно подчеркнуть, что вызываемые НП изменения чувствительности кортикальных нейронов к нейромедиаторам, наряду с другими механизмами, могут лежать в основе изменений процессов обучения и памяти. Обращает на себя внимание различие в эффектах различных НП. Как видно из данных табл. 1, одни НП (ДГ-АВП и ЦАЭ) оказывали выраженное влияние как на холино-, так и адреночувствительность кортикальных нейронов, у других НП (даларгин) это влияние было выражено значительно слабее. Помимо этого, разные НП неодинаково изменяли холино- и адренореактивные свойства нейронов. Так, под влиянием ДГ-АВП имело место увеличение доли клеток, реагирующих на подведение АХ повышением частоты импульсации, тогда как при подведении НА наблюдали снижение доли возбуждавшихся клеток и увеличение доли ареактивных нейронов. Возможно, что различия влияния разных НП на обучение и память в значительной мере обусловлены неоднозначностью их эффектов на хе-

морерактивные свойства церебральных нейронов. Вызываемая НП перестройка рецепторного аппарата нейронов, очевидно, связана с изменениями белкового метаболизма. И действительно, как показали ранее проведенные исследования, под влиянием Met- и Leu-энкефалина и ДГ-АВП изменяется синтез белка в ряде церебральных структур. В специальной серии экспериментов с использованием методики цитонинтерферометрии обнаружены достоверные изменения содержания белков в нейронах двигательной коры и гиппокампа. Направленность сдвига содержания белков в нейронах зависела от времени: увеличение содержания белков, через 10 мин после введения ЦАЭ, через 40 мин сменялось снижением их содержания [13].

Под влиянием другого НП—ДГ-АВП, который вводили в дозе 10 мкг на крысу, содержание и синтез РНК в гиппокампе и неокортексе возрастали. Этот эффект был более выражен при функциональной нагрузке (обучение). Одновременно наблюдали количественные изменения фракционного состава ядерных белков, обнаруженные с помощью электрофореза. Это означает, что под влиянием ДГ-АВП активировался генетический аппарат клеточных элементов мозга [14].

Одной из острейших и пока наименее исследованных проблем в механизмах центрального действия НП является выраженность их центральных эффектов с очень низкой проницаемостью ГЭБ для НП. По некоторым данным [5], через ГЭБ проникают доли процента от количества системно введенных НП. В этих условиях объяснение очевидных центральных эффектов оказывается весьма затруднительным. Иногда для этого привлекаются достаточно произвольно предположения о наличии «нейронов-мишеней», о каскадах, усиливающих биохимические реакции и т. д. Между тем, в центральных эффектах системно введенных НП существенную роль могут играть два реальных механизма. Первый из них состоит в том, что процессы обучения и памяти могут регулироваться событиями на периферии. Так, например, изменения содержания адреналина в крови критически влияют на фиксацию временных связей [15]. Вполне вероятно, что, даже не проникая в мозг, НП могут модулировать процессы обучения и памяти за счет периферических эффектов. Второй вероятный механизм состоит в изменениях проницаемости гистогематических барьеров, в том числе ГЭБ, под влиянием системного введения НП. Не проникая в мозг или проникая в него в ничтожных количествах, НП изменяют проницаемость барьера и тем самым могут способствовать или препятствовать проникновению в мозг и в ткани периферических органов различных веществ, влияющих на процессы обучения и памяти. По данным Egmişli и соавт. [16], под влиянием лизин-вазопрессина повышается проницаемость ГЭБ для ряда веществ, в том числе оротовой кислоты, что может способствовать процессу консолидации памяти. В свете этих данных представляется вполне вероятным, что приписываемое вазопрессину благотворное влияние на процесс консолидации в действительности обусловлено оротовой кислотой, проникающей из крови в мозг.

На основе изложенных выше соображений мы исследовали влияние различных НП и их аналогов на защитную функцию ГЭБ, которую оценивали с помощью нейтрального индикатора — флуоресцина натрия. В специальной серии экспериментов перед определением проницаемости ГЭБ проводилась перфузия мозга физиологическим раствором. Данные этой серии экспериментов по направленности наблюдавшихся сдвигов носили такой же характер, как и в экспериментах без перфузии мозга. Результаты этих экспериментов приведены в

Таблица 2

Влияние пептидов на проницаемость ГЭБ для флуоресцина натрия

Группы животных	Головной мозг		Сыворотка крови		Соотношение мозг/кровь (в %)
	содержание краски (в мкг/мг ткани)	%	содержание краски (в мкг/мг ткани)	%	
Контроль (13)	2.21 ± 0.13	100	135.57 ± 8.77	100	1.63 ± 0.15
ДГ-ПОВГ* (11)	$1.85 \pm 0.11^*$	83.71*	116.0 ± 10.64	85.63	1.59 ± 0.11
Контроль (9)	2.2 ± 0.21	100	220.75 ± 51.41	100	1.01 ± 0.13
ИОС-1860 (10)	2.42 ± 0.09	108.52	165.4 ± 27.57	75.37	1.45 ± 0.25
Контроль (7)	1.95 ± 0.14	100	159.4 ± 16.38	100	1.22 ± 0.14
Б-эндорфин (7)	1.67 ± 0.27	85.64	125.3 ± 14.40	79.29	1.32 ± 0.12
Контроль (9)	1.41 ± 0.15	100	96.8 ± 7.54	100	1.45 ± 0.10
АКТГ ₁₋₇ (14)	1.56 ± 0.05	110.64	101.50 ± 7.20	110.16	1.15 ± 0.11
Контроль (8)	2.27 ± 0.21	100	160.57 ± 19.4	100	1.11 ± 0.11
Даларгин (10)	2.24 ± 0.09	98.67	158.38 ± 12.43	98.64	1.41 ± 0.14

Примечание. * Дес-(9-глицин)-л-фенилаланин-8-орнитин/вазопрессин. В скобках указано количество опытов.

табл. 2. Они свидетельствуют о более выраженном влиянии НП на периферические гистогематические барьеры, чем на собственно ГЭБ. Такой факт сам по себе достаточно примечателен, так как свидетельствует о сравнительно высокой устойчивости защитной функции ГЭБ. Это дает основание предположить, что известное отрицательное влияние некоторых НП на обучение и память в основном обусловлено не проникновением в мозг под их влиянием чужеродных или вредных веществ, а участием иных механизмов, в том числе периферических эффектов НП [15]. В пользу этого вывода в определенной мере свидетельствуют данные о повышении проницаемости периферических гистогематических барьеров, что выражается в снижении концентрации индикатора в крови, обусловленном, очевидно, переходом его из кровяного русла в ткани и органы. Как следует из данных, приведенных в табл. 2, под влиянием ряда НП и их аналогов содержание индикатора в крови снижалось на 15—25%. Вместе с тем, сопоставление изменений содержания индикатора в крови и мозгу (по соотношению мозг/кровь) не дает оснований для заключения о существенном снижении проницаемости ГЭБ. Напротив, тенденция к возрастанию этого соотношения при воздействии некоторых аналогов НП может указывать даже на определенное снижение защитной функции ГЭБ. Отсюда следует, что в слож-

ном комплексном эффекте НП определенное место могут занимать вызываемые НП изменения защитной (а возможно, и регуляторной) функции ГЭБ и периферических гистогематических барьеров. Одним из частичных подтверждений справедливости этого положения могут служить данные о влиянии даларгина на обучение, память и защитную функцию ГЭБ. В специальной серии экспериментов было обнаружено, что интраперитонеальное введение крысам 10 мкг даларгина перед выработкой рефлекса двустороннего избегания практически не влияло на его выработку и сохранение. В то же время под влиянием этого аналога НП защитная функция ГЭБ изменялась лишь незначительно. По-видимому, такое совпадение не случайно, а является выражением функционирования одного из важных механизмов биологического действия НП.

Приведенные данные, наряду с литературными, свидетельствуют о необходимости первоочередного целенаправленного исследования роли гистогематических барьеров в механизмах центрального действия НП. Раскрытие этой роли будет способствовать выяснению одного из важнейших нейрохимических аспектов, лежащих в основе обучения и памяти.

EFFECT OF NEUROPEPTIDES AND THEIR ANALOGS ON THE CHEMOREACTIVE PROPERTIES OF CORTICAL NEURONS AND ON THE HISTOHEMATIC BARRIERS

KRUGLIKOV R. I., DISH T. N., KOSHTOYANTS O. Kh., MARKAROVA M. Yu., PUZYREVA T. G.

Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, USSR Acad. Med. Sci., Moscow.

On the background of systemic injection of neuropeptides of different families, cholino- and adrenoreactivity of the sensorimotor neurons and permeability of the blood-brain barrier (BBB) to Na-fluorescein have been studied. Redistribution was revealed of the part reacting by activating, inhibitory and areactive form of reaction to applied acetylcholine (ACh) and noradrenaline (NA) against the background of different neuropeptides, this allows, to a certain extent, to consider, that different effects of various neuropeptides on the process of learning and memory are determined by their different actions on chemoreactive properties of cerebral neurons' membranes.

Study of the effect of neuropeptides on BBB showed that protective function of BBB remained rather stable, while other histo-hematic barriers underwent a certain change. Data obtained allow to conclude that negative effect of the administered neuropeptides on learning and memory is basically determined not by the penetration in the brain of a number of biologically active substances under the influence of these neuropeptides, but by other mechanisms, including peripheral effects of neuropeptides.

1. Kovacs G., Bohus B., Versteeg D. H. G.—In: Progress in Brain Research, v. 53, p. 123—140, Amsterdam—N. Y., Elsevier North-Holland Biomedical Press, 1980.
2. Bohus B., Conti L., Kovacs G., Versteeg D. H. G.—In: Neuronal Plasticity and Memory Formation (eds. C. Ajmone Marsan, A. Matties), v. 9, p. 75—87, Rower Press, 1982.
3. Крутиков Р. И.—В кн.: Фармакология нейропептидов, с. 112—124, Москва, 1982.
4. Крутиков Р. И., Орлова Н. В., Гецова В. М., Мау В. Н. Нейрохимия, т. 1, с. 3—10, 1983.
5. Осиповский С. А., Полесская М. М. Успехи физиол. наук, т. 13, № 4, с. 74—89, 1982.
6. Буласв Е. А., Раковский К. С. Успехи физиол. наук, т. 13, № 2, с. 65—92, 1982.
7. Бакалкин Г. П., Таборко М. П. Бюл. Всесоюз. кардиол. центра АМН СССР, т. 4, № 2, с. 100—105, 1981.
8. Утевская А. Б.—В сб.: Гисто-гематические барьеры и ионизирующая радиация, с. 209, М., Изд-во АН СССР, 1963.
9. Mutsenberg Y., Simmons W. H. Life Sci., v. 32, p. 2611—2623, 1983.
10. Partridge W. M. Ann. Rev. Physiol., v. 43, p. 73—82, 1933.
11. Rappaport S. J., Vler W. A., Pettigrew K. D., Ohno K. Science, v. 207, p. 84—86, 1980.
12. Cernford E. M., Braun L. O., Crane P. D., Oldendorf W. H. Endocrinology, v. 103, № 4, p. 1297—1303, 1978.
13. Мау В. Н., Сизал О. А., Гецова В. М. В сб.: Адаптивные и компенсаторные процессы в головном мозге, с. 147—148, М., Институт мозга ВНИИПЗ, 1986.
14. Крутиков Р. И., Чиппанс Г. Н., Панченкин О. С. Изв. АН Латв. СССР, № 2, с. 81—87, 1986.
15. Gold P. E. Abstracts, v. 11, International neurobiological symposium, Magdeburg, 1985.
16. Ermish A., Landgraf R., Heindol G., Sterba G.—In: Neuronal Plasticity and Memory Formation (eds. C. Ajmone Marsan, N. Matthies), p. 147—152, N. Y., Raven Press, 1983.

Поступил 10. IX 1986



УДК 577.311.042.5+577.152.311.042.2

О ПРИРОДНЫХ ИНГИБИТОРАХ И АКТИВАТОРАХ ФОСФОДИЭСТЕРАЗ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ ИЗ ГИПОТАЛАМУСА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

САРИБЕКЯН Г. А., КИРАКОСОВА А. С., ГАЛФАЯН В. Т., ГАЛОЯН А. А.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Из гипоталамуса крупного рогатого скота выделен фактор, оказывающий ингибирующее влияние на Ca^{2+} -кальмодулинчувствительную и Ca^{2+} -кальмодулиннечувствительную формы фосфодиэстераз (ФДЭ) циклических нуклеотидов.

Ингибитор является низкомолекулярным термостабильным пептидом.

Приведены также данные по выделению кальмодулина (КМ) из гипоталамуса крупного рогатого скота с описанием его электрофоретической подвижности, величины M_r и способности активировать ФДЭ циклических нуклеотидов.

Гормоны, циклические нуклеотиды и ионы кальция являются тремя наиболее важными мессенджерами в клеточной регуляции млекопитающих [1].

Роль системы циклических нуклеотидов в механизме регуляции клеточных функций общезвестна. Ферментом, осуществляющим распад внутриклеточного мессенджера—сАМР, является ФДЭ циклических нуклеотидов. Существуют множественные формы ФДЭ в различных тканях [2, 3]. Ранее нами описаны такие множественные формы ФДЭ в гипоталамусе [4, 5].

Внутриклеточные регуляторы белковой природы занимают особое место в этой регуляции. К ним относится в первую очередь КМ—мультифункциональный Ca^{2+} -зависимый модуляторный белок [6, 7]. КМ обнаружен в большинстве тканей млекопитающих, включая различные отделы мозга [8, 9].

Учитывая важную роль КМ в регуляции активности ФДЭ и целого ряда других ферментов, в данной работе приводится выделение этого белка из гипоталамуса крупного рогатого скота и более подробное описание некоторых его свойств.

Важная роль в регуляции активности ФДЭ принадлежит также внутриклеточным белковым ингибиторам этого фермента. В настоящее время выделены и изучены как высокомолекулярные ингибиторы из

мозга, сердца и сетчатки глаза [10, 11], так и небольшие пептиды из гипоталамуса и мозга [12, 13].

Идентификация и исследование свойств таких низкомолекулярных соединений из НС, способных регулировать активность ФДЭ, изучены недостаточно полно и представляют значительный интерес, в особенности в связи с той ролью, которая придается в настоящее время ФДЭ в поддержании внутриклеточного уровня циклических нуклеотидов.

Ранее нами было установлено наличие в гипоталамусе крупного рогатого скота фактора, ингибирующего активность ФДЭ мозга [14, 15]. В настоящей работе приводятся данные, характеризующие природу и некоторые свойства этого ингибитора.

Материалы и методы

Гипоталамус и цельный мозг крупного рогатого скота получали сразу после забоя животных и хранили при -20° .

ФДЭ, лишенная КМ, была получена по методу Watterson и соавт. [16]. Активность ФДЭ циклических нуклеотидов определяли по количеству гидролизованного $[8-^3\text{H}]\text{сАМР}$ в процессе его инкубации с ферментом [17].

Реакционная смесь в объеме 10 мкл содержала следующие компоненты в мМ: трис- HCl буфер (pH 7.5)—100, MgCl_2 —3, CaCl_2 —1.5, сАМР —0.5, $5'\text{-AMP}$ —2, а также $[^3\text{H}]\text{сАМР}$ —0.2 мкКи и соответствующее количество фермента и КМ. В ряде опытов CaCl_2 отсутствовал.

Реакцию начинали добавлением ФДЭ. Инкубацию вели при 30° в течение 20 мин. Реакцию останавливали кипячением проб в водяной бане в течение 3 мин, затем их охлаждали до комнатной температуры, центрифугировали при 3000g 15 мин. Для разделения продуктов реакции 3 мкл супернатанта подвергали тонкослойной хроматографии на пластинках «Silufol UV-254» в системе н-бутанол—ацетон—аммиак (8:2:1). Пятна на хроматограмме идентифицировали с помощью свидетелей в ультрафиолете, фиксировали специальным клеем, приготовленным на основе ацетилцеллюлозы. Соответствующие участки вырезали и помещали в сцинтилляционные кюветы с толуольным сцинтиллятором, содержащим 4г РРО и 200 мкг РОРОР на 1 л толуола. Радиактивность подсчитывали в жидкостном сцинтилляционном спектрометре марки «Intertechnique SL-30» (Франция).

Электрофорез в ПААГ (7%) проводили по методу Davis [18] в щелочном буфере, pH 8.9 в течение 3 ч при силе тока 3 мА на трубку. Гели окрашивали 1%-ным раствором амидо-черного 10 В в 7%-ной уксусной кислоте в течение 20 мин и отмывали до обесцвечивания фона. Определение оптической плотности проводили на фотометре «Uvicord» («ЛКВ», Швеция), при 280 нм. Белок определяли по методу Lowry, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин [19].

КМ из гипоталамуса и цельного мозга крупного рогатого скота получали методом Burges и соавт. [20]. Все стадии очистки проводили

при 4 и включали фракционирование $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ИОХ и гель-филтрацию. КМ-содержащие фракции идентифицировали электрофорезом в ПААГ по способности активировать КМ-чувствительную форму ФДЭ.

В работе были использованы следующие реактивы: ДЭАЭ-сефадекс А-50 и сефадекс G-25 («Pharmacia», Швеция), этилендиаминтетрауксусная кислота и 3',5'-сАМР («Sigma», США), трис («Kochlight» Англия), реактивы для электрофореза ПААГ («Reanal», Венгрия), [8- ^3H]-сАМР («New England Nuclear», США), слудфоловые пластины UV-254 («Kavalier», СССР), остальные реактивы отечественного производства.

Результаты и обсуждение

КМ, выделенный из гипоталамуса крупного рогатого скота, был подвергнут гель-филтрации после предварительного фракционирования $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, кислотного осаждения и ИОХ (рис. 1). Фракции (91—98), содержащие КМ и активировавшие ФДЭ, объединяли, подвергали диализу против бидистиллированной воды и лиофилизировали. Аналогичным образом получали КМ из цельного мозга.

Оба КМ—из гипоталамуса и цельного мозга—примерно одинаково активируют ФДЭ, лишенную КМ (рис. 2).

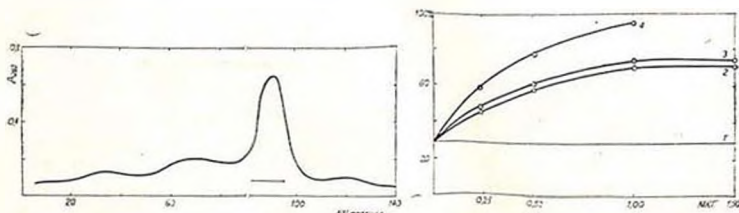


Рис. 1. Хроматография кальмодулина гипоталамуса на колонке с сефадексом G-100 (2×90 см), уравновешенной 10 мМ трис-НСl буфером, 7,5, содержащим 1 мМ ЭДТА, 1 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,1 М NaCl. Фракции в объеме 5 мл элюировали тем же буфером. Скорость элюции 10 мл/ч. По оси ординат—фракции, содержащие кальмодулин и активирующие ФДЭ, лишенную кальмодулина

Рис. 2. Активность ФДЭ в присутствии различных препаратов кальмодулина: 1—контроль, 2—кальмодулин из гипоталамуса, 3—кальмодулин из цельного мозга, 4—коммерческий препарат кальмодулина

Следует отметить, что для определения активирующего эффекта КМ необходимо использовать свежевыделенные препараты ФДЭ. По мере хранения препаратов фермента их чувствительность к активации КМ-ом терялась, хотя ферментативная активность самого препарата даже увеличивалась. По-видимому, это объясняется протеолизом фермента; так, известно, что обработка трипсином повышает активность ФДЭ.

При сопоставлении свойств КМ из гипоталамуса с КМ цельного мозга видно, что оба обладают сходной электрофоретической подвижностью в ПААГ (рис. 3).

Величину M_r гипоталамического КМ определяли двумя методами: по миграции в ПААГ при сопоставлении с белковыми стандартами известной величины M_r и коммерческим препаратом КМ мозга и гелефильтрацией на колонке с сефадексом G-100 (2×60 см), используя маркерные белки (альбумин быка—67 кД, ингибитор трипсина из сои—21,5 кД и цитохром С—12,4 кД). Величина M_r гипоталамического КМ оказалась равной 20 кД (рис. 4).



Рис. 3. Электрофорез кальмодулина гипоталамуса крупного рогатого скота в ПААГ: а—кальмодулин цельного мозга; б—кальмодулин гипоталамуса; в—исходный экстракт гипоталамуса

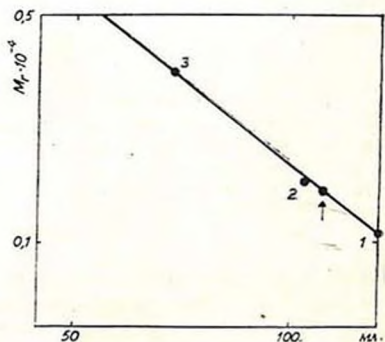


Рис. 4. Определение величины M_r кальмодулина гипоталамуса крупного рогатого скота геле-фильтрацией на сефадексе G-100. Стрелкой обозначен кальмодулин гипоталамуса; маркерные белки: 1—цитохром С (12,4 кД), 2—ингибитор трипсина из сои (21,5 кД), 3—бычий сывороточный альбумин (67 кД). По оси абсцисс—объем удержания, мл; по оси ординат— M_r

Таким образом, можно полагать, что белок, выделенный из гипоталамуса быка, является КМ: во-первых, по его электрофоретической подвижности на ПААГ, сопоставимой с таковой КМ мозга, выделенного нами, и коммерческим препаратом, во-вторых, по величине M_r и, в-третьих, по способности активировать ФДЭ, лишенную КМ.

Представленные данные согласуются с приведенными в литературе, полученными при выделении КМ из других источников, что указывает на консервативность его структуры [21]. В целом, наличие КМ в различных отделах мозга и, в частности, в гипоталамусе свидетельствует о

его важной роли в процессах нейроэндокринной регуляции функций организма.

Для выделения ингибитора ФДЭ ткань гипоталамуса была промыта в 0,9%-ном NaCl при 4°, разрезана на кусочки и гомогенизирована 5 мин в 1 М HCl (7 мл/г сырого веса ткани). Гомогенат экстрагировали в 5 объемах хлороформ-метанола (2:1) в течение ночи при -10°. Экстракт центрифугировали при 600 g 30 мин при 4° и отделяли верхнюю фазу, которую упаривали до небольшого объема на ротационном испарителе при комнатной температуре.

Осветленный центрифугированием экстракт фильтровали через Diaflo мембрану PM 10 и подвергали хроматографии на колонке (2×90 см) с сефадексом G-25, уравновешенной 0,9%-ным NaCl. Элюировали фракции тем же раствором и испытывали на ФДЭ активность.

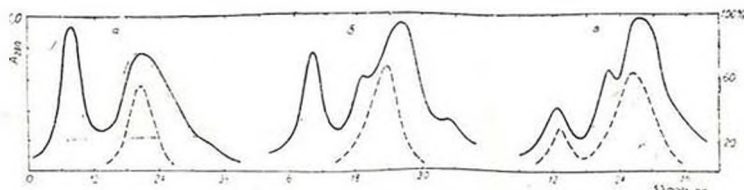


Рис. 5. Хроматография ингибитора из гипоталамуса (а), цельного мозга крыс (б) и крупного рогатого скота (в) на колонке с сефадексом G-25 (2×90 см), уравновешенной 0,9%-ным NaCl. Фракции были элюированы тем же раствором при скорости течения 33 мл/ч. Объем каждой фракции 11 мл. Испытывалось действие элюатов (3 мкл) каждой фракции на активность ФДЭ, лишенной кальмодулина: — поглощение при 280 нм; --- ингибирование ФДЭ в %.

На рис. 5, а представлен профиль элюции белка гипоталамуса с сефадекса G-25. При хроматографии гипоталамического экстракта выявляется два белковых пика, имеющих поглощение при 280 нм. Один из них обладал выраженной ингибирующей активностью на ФДЭ. Одновременно проводили выделение ингибирующего фактора из цельного мозга крыс и крупного рогатого скота (рис. 5, б, в). В этих случаях ингибирующая активность совпадала со вторым пиком для мозга крыс и с обоими белковыми пиками для мозга крупного рогатого скота.

Фракции, обладающие ингибирующей активностью, были объединены, обессолены и сконцентрированы методом ультрафильтрации на приборе формы «Amicon» (США) с мембраной UM-05.

Сравнение действия ингибиторов из трех различных источников показало, что они примерно с одинаковой эффективностью снижают активность ФДЭ из мозга крупного рогатого скота.

Необходимо отметить, что выделенный фактор оказывал ингибирующее влияние не только на Ca^{2+} -кальмодулинчувствительную форму фермента, но и Ca^{2+} -кальмодулиннечувствительную (рис. 6).

Поскольку ингибитор не задерживался мембраной РМ 10, его величина M_r не превышает 10 кД. Для более точного определения величины M_r гипоталамического фактора последний подвергался гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-25, откалиброванной стандартами известного молекулярного веса. Из рис. 7 видно, что величина M_r этого фактора ~ 1.3 кД.

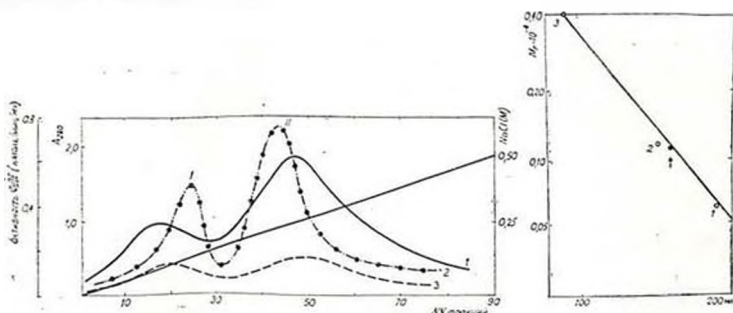


Рис. 6. ИОХ двух форм ФДЭ на колонке с ДЭАЭ-сефадексом А-50 (2×30 см): 1—поглощение при 280 нм; 2—базальная активность ФДЭ; 3—активность ФДЭ в присутствии 5 мкг гипоталамического ингибитора. 1— Ca^{2+} -кальмодулинчувствительная ФДЭ; 2— Ca^{2+} -кальмодулиннечувствительная ФДЭ

Рис. 7. Определение величины M_r гипоталамического ингибитора гель-фильтрацией на колонке (2×90 см) с сефадексом G-25, уравновешенной 0,05 М трис-НСl буфером (0,1 М NaCl), pH 7,5. Стрелкой обозначен ингибиторный фактор; маркерные пептиды: 1—лейцил-энкефалин (0,63 кД), 2—ангiotензин (1,18 кД), 3—АКТГ (4 кД). Остальные обозначения те же, что и на рис. 4

Для выяснения природы гипоталамического фактора проводили его гидролиз трипсином. После инкубации с 200 мкг/мл трипсина в течение 17 ч при 30° реакцию останавливали добавлением ингибитора трипсина из бобов сои. В результате такой обработки ингибиторная активность фактора полностью снималась, что свидетельствует о его белковой природе.

Гипоталамический пептид был стабилен к кипячению в течение 10 мин. Повторное замораживание и оттаивание не изменяло его активности.

Таким образом, в гипоталамусе крупного рогатого скота выявлено наличие термостабильного ингибиторного фактора и произведена его частичная очистка. Фактор является протеином, так как теряет активность под действием трипсина: его $M_r \sim 1.3$ кД. Ингибитор эффективно снижает активность Ca^{2+} -кальмодулинчувствительной и Ca^{2+} -кальмодулиннечувствительной ферментов.

Ранее рядом авторов было показано, что для активации ФДЭ мозга требуются значительно более высокие концентрации КМ, чем, например,

в сердце. Оказалось, что это обусловлено наличием термолабильного ингибиторного белка с M_r 11 кД [10]. В дальнейшем подобный ингибиторный белок был получен в гомогенном состоянии из мозга, и его величина M_r оказалась равной 80 кД [22].

В мозгу обнаружен также и термостабильный белок, ингибирующий активность ФДЭ лишь в присутствии КМ [23]. Значительный интерес представляет термостабильный ингибиторный белок с M_r 38 кД из сетчатки глаза млекопитающих [11]. Liu, Wang [24] также показали наличие термостабильного белка в сетчатке быка, который ингибирует базальную активность ФДЭ (без КМ).

Наряду с высокомолекулярными белковыми ингибиторами ФДЭ из гипоталамуса крупного рогатого скота выделен нейрогормон гликопептидной природы, регулирующий коронарный кровоток и оказывающий влияние на Ca^{2+} -кальмодулинчувствительную форму ФДЭ [12].

В 1982 г. был выделен низкомолекулярный ингибитор ФДЭ пептидной природы из мозга крыс и крупного рогатого скота [13], отличный от перечисленных выше белковых ингибиторов и таких пептидов, как АКТГ, холецистокинин, эндорфины, энкефалины, соматостатин и ряд других. Описанный авторами пептид ингибировал ФДЭ сАМР в гомогенате мозга.

Из приведенных нами экспериментальных данных можно заключить, что подобный пептид обнаруживается и в гипоталамусе и обладает способностью ингибировать активность как Ca^{2+} -кальмодулинчувствительной, так и Ca^{2+} -кальмодулиннечувствительной ФДЭ. Необходимы дальнейшие исследования свойств и механизма регуляции активности ФДЭ этим ингибитором.

ENDOGENOUS INHIBITORS AND ACTIVATORS OF CYCLIC NUCLEOTIDE PDE FROM CATTLE HYPOTHALAMUS

SARIBEKYAN G. A., KIRAKOSOVA A. Z., GALFAYAN V. T.,
GALOYAN A. A.

Institute of Biochemistry, ArmSSR Acad. Sci., Yerevan

A low M_r thermostable peptide has been purified from cattle hypothalamus that turned to inhibit both Ca^{2+} , calmodulin-dependent and independent forms of cyclic nucleotide PDE.

Data on the isolation and characteristics of calmodulin from cattle hypothalamus are also presented.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cheung W. Y. Science, v. 207, № 4426, p. 19—27, 1980.
2. Thompson W. J., Appleman M. M. Biochemistry, v. 10, p. 311—318, 1971.
3. Takemoto D. J., Hansen J., Takemoto L. J., Honslay M. D. J. Biol. Chem., v. 257, p. 14597—14599, 1982.
4. Galoyan A. A., Gurvitz B. Ya. Neurochem. Rev., v. 10, p. 11, 1985.

5. Gurrutz B. G., Galoyan A. A. 10th Meeting of IBBN, 1983, Moscow, p. 448, 1984.
6. Cheung W. Y. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 38, p. 533—538, 1970.
7. Kakiuchi S., Yamazaki R. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 41, p. 1104—1110, 1970.
8. Kakiuchi S., Yasuda S., Yamazaki R., Teshima Y., Kanda K., Kakiuchi R., Sobue K. J. Biochem., v. 92, p. 1041—1048, 1982.
9. Эттингер Р. Н. Нейрохимия, т. 3, № 4, с. 405—418, 1984.
10. Wang J. H., Desai R. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 72, p. 926—932, 1976.
11. Dumler I. L., Ettingof R. N. Biochim. et biophys. acta, v. 429, p. 474—484, 1976.
12. Galoyan A. A., Srapiorian R. M. Neurochem. Res., v. 8, p. 1511—1533, 1983.
13. Collier H. O. J., Butt N. M., Saeed S. A. J. Neurochem., v. 38, p. 275—277, 1932.
14. Сарибекян Г. А., Киракосова А. С., Галфаян В. Т. Тезисы докл. Всесоюзн. симпозиума «Циклические нуклеотиды и система регуляции ферментативных реакций», Рязань, 1985.
15. Saribekyan G. A., Kirakosova A. S., Galphayan V. T., Galoyan A. A. IBRO International Symposium on Neuroendocrinology, Leningrad, 1985.
16. Watterson D. M., Hurrelson W. G., Keller P. M., Sharief F., Vaneman T. G. J. Biol. Chem., v. 251, p. 4501—4513, 1976.
17. Galoyan A. A., Gurrutz B. Ya., Saribekyan G. A., Kirakosova A. S.—In Cyclic Nucleotides and Therapeutic Perspectives, N. Y., Pergamon Press, p. 165—181, 1979.
18. Davis B. J. Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 121, p. 404—427, 1964.
19. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
20. Burgess W. H., Jemolo D. K., Kretzinger R. H. Biochim. et biophys. acta, v. 623, p. 257—270, 1980.
21. Kakiuchi S., Sobue K., Yamazaki R., Kumbayashi J., Sakou M., Kosaki G. FEBS Lett., v. 126, p. 203—207, 1981.
22. Klee C. B., Krinks M. H. Biochemistry, v. 17, p. 120—126, 1978.
23. Sharma R. K., Wirtz E., Wang J. H. J. Biol. Chem., v. 253, p. 3575—3580, 1978.
24. Liu J. P., Wang J. G. Biochim. et biophys. acta, v. 553, p. 273—278, 1978.

Поступил 12. IV 1986



УДК 616.127—005.8:616.831.6.09.8.02:577.174.5

ТРАНСПОРТ Ca^{2+} В СИНАПТОСОМАХ МОЗГА
КРЫС С НЕКРОЗОМ МИОКАРДА

ДАВЫДОВ В. В., СКУРЫГИН В. П., ЯКУШЕВ В. С.

Запорожский государственный медицинский институт

Развитие экспериментального инфаркта миокарда сопровождается возникновением изменений в функционировании системы АТР-зависимого транспорта Ca^{2+} в синаптосомах коры больших полушарий головного мозга. Конкретный их характер зависит от особенностей воспроизведения некроза миокарда. Важную роль в возникновении описанных изменений может играть изменение фосфолипидной организации синапсомембран.

Известно, что при экспериментальном инфаркте миокарда происходит угнетение ряда высших функций головного мозга [1]. Поскольку формирование этого сдвига может быть связано с изменением функционирования синапсом, в настоящей работе изучали некоторые особенности состояния энергезависимого транспорта Ca^{2+} в них. Интерес к подобной постановке вопроса был связан с тем, что системы транспорта Ca^{2+} синапсомембран играют большую роль в электрофизиологических явлениях в нервных окончаниях [2]. Так как инфаркт миокарда часто развивается в условиях психоэмоционального возбуждения [3], одновременно исследовали животных, некроз миокарда у которых моделировали после предварительного эмоционального стресса.

Материалы и методы

В работе использовали крыс-самцов линии *Wistar*, массой 160—200 г. Всех животных делили на 4 группы: 1—интактные; 2—крысы, у которых воспроизводили эмоциональный стресс [4]; 3—крысы, у которых моделировали ишемический некроз миокарда [5]; 4—крысы, у которых некроз миокарда воспроизводили через 24 ч после стресса.

Эффективность воспроизведения ишемического некроза миокарда контролировали с помощью электрокардиографического и патоморфологических методов исследования.

Из полушарий головного мозга крыс методом дифференциального ультрацентрифугирования выделяли фракции синапсом [6], в кото-

рых определяли активность Ca^{2+} -зависимой АТРазы [2], скорость АТР-зависимого накопления Ca^{2+} в присутствии 10^{-4} М адреналина и без него [2], а также суммарное содержание фосфолипидов после их предварительной экстракции [7]. Полученные данные подвергали статистической обработке.

Результаты и обсуждение

Обнаружено, что на 2-е сутки развития ишемического некроза миокарда в синаптосомах коры больших полушарий головного мозга крыс не происходило изменения скорости АТР-зависимого накопления Ca^{2+} (табл. 1). При этом неизменной оставалась и активность Ca^{2+} -зависимой АТРазы синапсом.

Таблица 1

Активность Ca^{2+} -зависимой АТРазы синапсом и скорость накопления ими ^{45}Ca при различных вариантах воспроизведения некроза миокарда у крыс после стресса

Показатель, единицы измерения	Интактные	Эмоциональный стресс	Некроз миокарда (традиционный вариант)	Некроз миокарда после стресса
Скорость накопления ^{45}Ca ($\frac{\text{имп с}}{10^3 \text{ мкг белка} \cdot \text{с}}$)	528 ± 130 (6)	925 ± 145 (5)	604 ± 103 (5)	$1116 \pm 143^*$ (6)
Активность Ca^{2+} -зависимой АТРазы (мкг Р/мкг белка · с)	$0,017 \pm 0,005$ (4)	$0,011 \pm 0,004$ (3)	$0,016 \pm 0,002$ (7)	$0,021 \pm 0,006$ (6)

Примечание. Здесь и в табл. 2 $^*p < 0,05$ по сравнению с интактными животными. В скобках указано количество крыс, использованных в опыте.

Таким образом, проведенные исследования не выявили изменений со стороны функционирования системы активного транспорта Ca^{2+} в синаптосомах мозга при развитии ишемического некроза в сердце. Однако это не дает основания утверждать, что данная попереносная система в мозгу при инфаркте миокарда функционирует так же, как и у интактных животных. По-видимому, у крыс данной группы она может изменяться под влиянием каких-либо регуляторных факторов.

Известно, что активность транспортных АТРаз синапсом находится под контролем катехоламинов, и в частности, адреналина [8]. Учитывая это, в специальных экспериментах изучали некоторые особенности адренергической регуляции скорости поглощения ^{45}Ca синапсами интактных крыс и крыс с некрозом миокарда.

Проведенные исследования показали (рисунок), что инкубация синапсом интактных животных с адреналином сопровождалась снижением накопления радиоактивного кальция на 18% по сравнению с синапсами, которые инкубировались без него. При инкубации с адреналином синапсом, выделенных из мозга крыс с некрозом миокарда, скорость накопления ими ^{45}Ca снижалась уже на 42% по сравнению с синапсами, которые инкубировали в отсутствие данного медиатора.

Изучение некоторых особенностей функционирования системы активного транспорта Ca^{2+} в синаптосомах мозга у крыс с некрозом миокарда, воспроизведенным после стресса, выявило некоторые особенности. Было обнаружено, что развитие некроза миокарда после эмоционального стресса сопровождалось увеличением АТР-зависимой аккумуляции ^{45}Ca синаптосомами на 111% по сравнению с интактными живот-

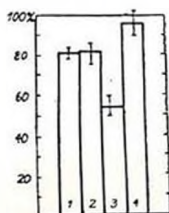


Рис. Изменение скорости накопления ^{45}Ca синаптосомами мозга крыс с различными вариантами воспроизведения некроза миокарда и после стресса 1.01 влиянием 10^{-3}M адреналина. Скорость накопления кальция в инкубационных средах, не содержащих адреналина, принята за 100%. 1—интактные; 2—синаптосомы крыс, перенесших стресс; 3—синаптосомы животных с некрозом миокарда; 4—синаптосомы крыс с некрозом миокарда, воспроизведенным после стресса

ными и на 84% по сравнению с крысами, у которых некроз миокарда воспроизводили в традиционном варианте. При этом одновременно выявлялась выраженная тенденция к увеличению активности Ca^{2+} -зависимой АТРазы на 22 и 31% соответственно по сравнению с интактными животными, а также с крысами с некрозом миокарда, воспроизведенным в традиционном варианте. Обращает на себя внимание и тот факт, что отмеченные сдвиги не сопровождались изменением чувствительности энергозависимого транспорта Ca^{2+} в синаптосомах к действию адреналина (рисунок).

При исследовании аналогичных показателей у контрольной группы крыс (2 суток после эмоционального стресса) было обнаружено, что скорость аккумуляции радиоактивного Ca^{2+} и активность Ca^{2+} -зависимой АТРазы у них достоверно не изменялась по сравнению с нормой. Но при этом у них все же выявлялась тенденция к увеличению скорости накопления Ca^{2+} на 110% по сравнению с исходной. У животных этой группы не было обнаружено и изменения чувствительности процесса АТР-зависимого транспорта Ca^{2+} к адреналину.

Таким образом, развитие инфаркта миокарда сопровождается изменениями в функционировании системы АТР-зависимого транспорта Ca^{2+} в синаптосомах коры больших полушарий головного мозга. Конкретный их характер зависит от особенностей воспроизведения экспериментального инфаркта миокарда: при традиционном варианте особую роль приобретает изменение регуляции активного транспорта Ca^{2+} адреналином, а при его воспроизведении после стресса—активация этого процесса.

Возможные причины изменения функциональной активности системы энергозависимого транспорта Ca^{2+} в синаптосомах коры головного мозга, вероятно, связаны с изменением липидной организации синапсомембран [10]. В связи с этим нами было проведено изучение спот-

вариантами воспроизведения некроза миокарда.

Обнаружено, что на 2-е сутки после воспроизведения некроза миокарда происходило уменьшение величины соотношения фосфолипиды/белок на 30% по сравнению с интактными крысами. При этом величина данного показателя у крыс с некрозом миокарда, воспроизведенным после стресса, достоверно не отличалась от интактных животных и в то же время была на 32% выше, чем у крыс с обычным вариантом его воспроизведения.

Таблица 2

Соотношение фосфолипиды/белок в синапсосомах коры полушарий головного мозга крыс с различными вариантами воспроизведения некроза миокарда и после стресса

Интактные	Эмоциональный стресс	Некроз миокарда (традиционный вариант)	Некроз миокарда после стресса
0,27±0,02 (6)	0,32±0,01 (4)	0,22±0,02* (6)	0,29±0,01 (4)

Таким образом, развитие некроза миокарда в острой стадии сопровождается увеличением чувствительности системы активного транспорта синапсом головного мозга к адреналину. Учитывая, что при инфаркте миокарда происходит увеличение концентрации адреналина в мозгу [9], можно полагать, что при этом создаются условия для нарушения транспорта Ca^{2+} в нервных окончаниях. Обнаруженные сдвиги в системе транспорта Ca^{2+} могут предопределять развитие функциональных расстройств со стороны ЦНС при некрозе миокарда, способствуя угнетению ее высших функций.

При формировании же некроза миокарда после стресса происходит активация АТФ-зависимого транспорта Ca^{2+} в синапсосомах. В свою очередь, это обусловлено предшествующим стрессом и, по-видимому, имеет компенсаторное значение.

Формирование сдвигов со стороны систем активного транспорта Ca^{2+} , возникающих в острой стадии развития некроза миокарда, сопровождается одновременно изменением соотношения фосфолипиды/белок в синапсосомах и, вероятно, может быть обусловлено изменением концентрации отдельных фосфолипидов в них. Изучению этого вопроса будут посвящены наши дальнейшие исследования.

TRANSPORT OF Ca^{2+} IN THE BRAIN SYNAPTOSOMES OF RATS WITH MYOCARDIAL INFARCTION

DAVYDOV V. V., SKURYGIN V. P., YAKUSHEV V. S.

State Medical School, Zaporozhye

Myocardial infarction is accompanied by alterations in ATP-dependent transport of calcium in synaptosomes of brain big hemisphere. The character of these alterations depends on the model of myocardial necrosis. Shifts in the phospholipid composition of synaptosomal membranes may be involved in the genesis of alterations observed.

ЛИТЕРАТУРА

1. Давыдов В. В., Желанов А. М., Красиков С. И., Якушев В. С. Журн. высш. перв. деят-сти, т. 34, № 6, с. 1174—1175, 1984.
2. Куликов С. А. Системы транспорта кальция в нервных клетках, Киев: Наукова Думка, 1983.
3. Sime W. E., Buel J. C. J. Cardiovasc. Pulm. Techn., v. 8, № 5, p. 27—41, 1980.
4. Desiderato O., Mackinnon I. R., Hissom H. J. J. Comp. Physiol. Psychol., v. 87, № 1, p. 208—214, 1974.
5. Козан А. Х. Патол. физиология и эксперим. терапия, т. 22, № 3, с. 79—82, 1979.
6. Осадчая Л. М.—В кн.: Методы биохимических исследований (под ред. М. И. Прехоровой), с. 36—42, Л., ЛГУ, 1982.
7. Кейтс М.—В кн.: Техника липидологии, с. 76—77, М., Мир, 1975.
8. Колетиани Э. П.—В кн.: Вопросы нейрхимии, с. 55—61, Л., Наука, 1977.
9. Трошин В. Д. Нервная система и коронарная болезнь, Горький, Волго-Вятское книжное издательство, 1974.
10. Бурлакова Е. Б., Джелябова М. И., Гвархия М. О., Глушенко Н. Н., Молочина Е. М., Штолько В. Н.—В кн.: Биоантисокислители в регуляции метаболизма в норме и при патологии. Труды МОИП, т. 57, с. 113—140, М., Наука, 1982.

Поступила 4. VIII 1986.

НОВЫЕ ЖУРНАЛЫ

Обзоры по электронной микроскопии. Субклеточное и биомолекулярное строение. Под ред. J. R. Harris, R. W. Horne, Pergamon Journals. *Biomolecular Structure. Ed. by J. R. Harris, R. W. Horne, Pergamon Journals.*

С 1988 г. намечается издание нового журнала «Обзоры по электронной микроскопии» (по 2 выпуска в год). В журнале будут публиковаться критические актуальные обзоры новых достижений в области трансмиссионной и сканирующей трансмиссионной микроскопии субклеточных органелл, фракций мембран, макромолекул и макромолекулярных ансамблей из клеток животных, растений, грибов и бактерий. В поле зрения редакции будут работы по внеклеточным белкам и опорным структурам, а также по вирусным частицам и их компонентам. Журнал приветствует поступление материалов, содержащих анализ и реконструкцию двух- и трехмерной картины изучаемых образований, а также такие работы, в которых биофизические, биохимические, иммунологические и другие сведения о структуре и функции сочетаются с данными электронной микроскопии. Высокое качество принимаемых к публикации рукописей будет обеспечено представительным составом редакторского коллегия, включающей видных специалистов в области электронной микроскопии, в числе которых W. Chill, J. Frank, J. S. Hanker (США), M. V. Nermut, D. M. Shotton (Англия), E. Delain (Франция), M. Kessel (Израиль), T. Koller (Швейцария) и др.



УДК 612.822.1:547.952

ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ РЕАКТИВНОСТЬ АНТИТЕЛ К ГАЛАКТОЦЕРЕБРОЗИДАМ МИЕЛИНА С РАЗЛИЧНЫМИ ПО ЛИПИДНОМУ СОСТАВУ АНТИГЕНАМИ

ТАРАНОВА Н. П., ЛУЧАКОВА О. С.

Институт физиологии им. И. П. Павлова АН СССР, Ленинград

Проведено исследование иммунологической реактивности сывороток, полученных при иммунизации кроликов галактоцереброзидами (ГалЦ), которые являются специфическими антигенами миелина и клеточной поверхности миелинообразующих клеток. При помощи реакции связывания комплемента с использованием двух различных по составу антигенов, содержащих варьирующее количество хроматографически чистых ГалЦ и вспомогательных липидов, показано, что противогалЦ антитела выявляются в широком диапазоне концентраций ГалЦ и вспомогательных липидов. Аутоантитела к ГалЦ обнаружены также в сыворотке крови больных с различными поражениями ЦНС, и при помощи кривых изотипизации продемонстрировано, что эти антитела идентичны противогалЦ антителам, полученным при иммунизации кроликов, и обладают одинаковой с ними иммунологической реактивностью.

Гликолипиды цереброзиды, построенные из аминокислота сфингозина, длинноцепочечной жирной кислоты и моносахарида галактозы, являются специфическими структурными компонентами миелиновых оболочек и плазматических мембран миелинформирующих клеток нервной ткани [1—3]. ГалЦ обладают выраженными антигенными свойствами, но из-за низкой величины M_r являются неполными антигенами, и для получения противогалЦ антител животных иммунизируют смесью ГалЦ с белком-носителем и полным адьювантом Фрейнда [2—6]. ГалЦ обладают более сильной иммуногенностью по сравнению с другими гликолипидными антигенами нервной ткани—ганглиозидами, сульфocereброзидами, моногалактозилдиглицеридом [7].

ПротивогалЦ антитела, получаемые в эксперименте, высокоспецифичны, так как направлены против единственной в молекуле ГалЦ антигенной детерминанты (β -D-галактоза) и не дают перекрестных реакций с гомогенатами и экстрактами никаких других органов и тканей, кроме нервной ткани и миелина [8]. Исследованиями на культуре нервной ткани показано, что эти антитела играют важную роль в развитии демиелинизации и задержке миелиногенеза [9—12]. Аналогичным дейст-

нием обладает также сыворотка крови некоторых больных с аутоиммунными демиелинизирующими заболеваниями НС [13, 14]. В связи с тем, что эти заболевания занимают значительное место среди тяжелых поражений НС, становится очевидной необходимость изучения иммунологической реактивности антител к ГалЦ и их роли в механизмах, участвующих в повреждении миелиновой оболочки.

Присутствие антител в организме обычно выявляют при помощи различных иммунологических реакций со специфическим антигеном, подбирая оптимальное соотношение антител и антигена. Выявление антител к липидным антигенам встречает дополнительные трудности в связи с тем, что они могут вступать во взаимодействие с антигеном только в присутствии «вспомогательных липидов» — холестерина и лецитина или других фосфолипидов, без которых эти антитела вообще не удастся обнаружить [7]. Мы исследовали иммунореактивность антител к ГалЦ в зависимости от содержания ГалЦ и состава и соотношения вспомогательных липидов в суспензии антигена. Кроме того, сравнительный анализ иммунологической реактивности противогалЦ антител животных и человека может дать дополнительную информацию о степени их идентичности и специфичности. В связи с этим проведено также сравнительное исследование иммунологической реактивности антител к ГалЦ, полученных в эксперименте на животных и обнаруженных в сыворотке крови больных с поражениями НС.

Материалы и методы

Опыты ставили на взрослых кроликах-самцах массой 2,4—2,8 кг, которых однократно иммунизировали путем введения эмульсии, содержащей 3 мг хроматографически чистых ГалЦ, 1,5 мг яичного альбумина, 1,0 мл 0,15 М фосфатного буфера, рН 7,4 и 1,0 мл полного адьюванта Фрейнда с содержанием микобактерий 2,5 мг/мл. Эмульсию вводили по 0,4 мл в подушечки задних лап, по 0,25 мл в подушечки передних лап, 0,3 мл внутрикожно в область спины и 0,4 мл подкожно в область шеи животного. Кровь брали до иммунизации и на 25—30-й день после иммунизации. Кроме того, использовали сыворотку 11 здоровых взрослых доноров и 40 неврологических больных, находившихся на лечении в различных стационарах Ленинграда. Для отбора больных использовали диагнозы, указанные в историях болезни.

Иммунореактивность обнаруженных противогалЦ антител исследовали в реакции связывания комплемента (РСК) [15] с использованием метода построения кривых изофиксации, предложенного Rapport, Graf [16]. РСК проводили в полистироловых панелях с визуальным учетом результатов реакции по 80—100%-ному гемолизу эритроцитов. Для проведения реакции применяли веронал-мединаловый буфер, рН 7,35 (0,1 М), бараньи эритроциты в растворе Олсвера, которые перед опытом, по меньшей мере три раза, отмывали буфером, центрифугируя по 15 мин при 500g, и затем 0,8 мл осадка разводили в 100 мл того же

буфера для приготовления 0,8%-ной суспензии. В реакции использовали «Сухую гемолитическую сыворотку» производства НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова МЗ СССР (Москва), имевшую титр 1:1200, и «Комплемент сухой» (морских свинок) производства НИИ вакцин и сывороток МЗ СССР (Пермь). Эти препараты разводили перед опытом согласно инструкциям.

В качестве антигенов в РСК использовали различные по липидному составу суспензии, приготовленные по методу Niedieck [17], но отличающиеся по содержанию ГалЦ и вспомогательных липидов. Антиген I: суспензия ГалЦ—холестерин—лецитин в весовом соотношении 0,18:0,62:0,60 мг/мл. Антиген II: суспензия ГалЦ—холестерин—фосфолипиды мозга в соотношении 0,18:0,25:0,14 мг/мл. Из исходных суспензий антигенов I и II готовили серии 2-кратных разведений от 1:2 до 1:256, с уменьшающимся содержанием ГалЦ от 90 до 0,7 мкг/мл суспензии антигена. Соответственно уменьшалось и содержание вспомогательных липидов в суспензии.

Для приготовления липидных суспензий антигенов I и II использовали очищенные ГалЦ, полученные хроматографией хлороформ-метанолового экстракта мозга быка в системе растворителей хлороформ—метанол— NH_4OH (80:20:0,4) на силикагеле марки «Woelm» (ФРГ). В этой системе липиды экстракта разделяются на 2 фракции фосфолипидов, 1, реже 2 фракции сульфocereброзидов, 3 фракции ГалЦ, фракцию холестерина и фракцию жирных кислот, которая движется с фронтом растворителя [18]. Обе фракции фосфолипидов после элюции разделяли повторным хроматографированием в смеси растворителей хлороформ—метанол—уксусная кислота— H_2O —петролейный эфир (50:25:7:3:15). Оказалось, что стартовая фракция фосфолипидов содержала в основном холинфосфатид (лецитин) с примесью сфингомиелина и в дальнейшем была использована нами как источник лецитина. Содержание ГалЦ в элюатах с хроматограмм определяли колориметрически модифицированным методом Radin [19], содержание фосфолипидов—по методу Bartlett [20]. В работе использован холестерин фирмы «Serva» (ФРГ).

Результаты и обсуждение

Определяли титры антител к ГалЦ в сыворотке крови в параллельных опытах одновременно с антигенами I и II. В преципитинной сыворотке кроликов против-ГалЦ антитела отсутствовали. Результаты, полученные при исследовании иммунных сывороток, свидетельствуют о том, что в реакции с антигеном I (табл. 1) антитела к ГалЦ выявляются в широком диапазоне концентраций ГалЦ, однако для выявления максимальной реактивности антител требуется концентрация не менее 11,2 мкг ГалЦ/мл при исследовании сывороток как с высокими, так и с низкими титрами антител.

Эта закономерность полностью подтвердилась в параллельных исследованиях, выполненных с антигеном II. Более того, выявлено близкое совпадение уровней титров против-ГалЦ антител при определении

их с антигеном I и антигеном II (табл. 1). При повышении концентрации ГалЦ до 45 мкг/мл (соответственно в антигене I повышается содержание лецитина до 150 мкг/мл и содержание холестерина до 155 мкг/мл, а в антигене II содержание фосфолипидов—до 35 мкг/мл, и содержание холестерина—до 63 мкг/мл) сохраняется максимальный уровень титров как в реакции с антигеном I, так и в реакции с антигеном II. Это позволяет сделать вывод, что при концентрациях ГалЦ свыше 11,2 мкг/мл противо-ГалЦ антитела проявляют максимальную иммунологическую реактивность в РСК, несмотря на варьирующий липидный состав анти-

Таблица 1

Титры противо-галактеробриозных антител, выявленные в реакции связывания комплемента в сыворотке кроликов, иммунизированных галактеробриозами (ГалЦ) при различных концентрациях в суспензии антигена

Содержание ГалЦ в суспензии антигена (мкг/мл)	Кролик 1		Кролик 2		Кролик 3	
	антиген		антиген		антиген	
	I	II	I	II	I	II
180	—	—	—	—	—	—
90	—	1:16	—	1:256	—	—
45	1:16	1:32	1:256	1:512	1:128	1:256
22,5	1:16	1:32	1:256	1:512	1:128	1:256
11,2	1:16	1:32	1:256	1:512	1:128	1:256
5,6	1:8	1:8	1:256	1:512	1:64	1:64
2,8	1:8	1:4	1:128	1:256	1:64	1:64
1,4	1:1*	1:2	1:4	1:16	нет данных	—
0,7	1:1	1:2	1:4	1:8	0	0

Примечание. *Здесь и в табл. 2 учет результатов невозможен из-за высоких антикомплементарных свойств суспензии антигена при данной концентрации липидов: —целая, неразведенная сыворотка.

гена в широком диапазоне концентраций ГалЦ и вспомогательных липидов в суспензии антигена, что обеспечивает надежность выявления противо-ГалЦ антител. Наглядно демонстрируют сходство иммунологической реактивности противо-ГалЦ антител с антигенами I и II кривые изофиксации, полученные в РСК с противо-ГалЦ сыворотками (рис. 1). Это сходство проявляется как при высокой, так и при низкой концентрации антител в сыворотке в реакциях с различными разведениями антигенов I и II. Кроме того, анализ кривых позволяет несколько расширить диапазон оптимальных концентраций ГалЦ до 6,0—50,0 мкг ГалЦ/мл суспензии антигена. При концентрации ГалЦ ниже, чем 6,0 мкг/мл антитела к ГалЦ выявляются не полностью (титры занижены), а при концентрации ГалЦ свыше 50 мкг/мл, фосфолипидов—свыше 39 мкг/мл, а холестерина—свыше 69 мкг/мл резко возрастают антикомплементарные свойства суспензии антигена, что делает невозможным полное определение противо-ГалЦ антител в РСК. По-видимому, при концентрации липидов в суспензии, превышающей указанные цифры, происходит инактивация комплемента за счет сорбции его компонентов

на липидных мицеллах [21], о чем свидетельствует отсутствие гемолиза эритроцитов при взаимодействии с антиэритроцитарной сывороткой, если концентрация липидов в суспензии антигена превышает названные пределы.

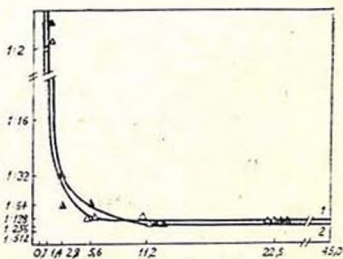
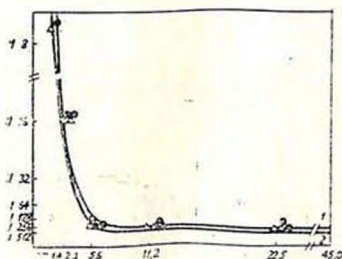
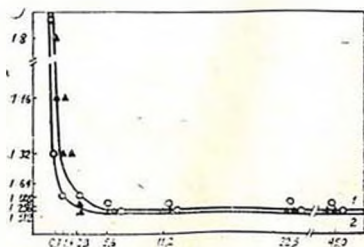


Рис. 1. Кривые изотитрования, полученные для противогалЦ сыворотки кролика с антигенами I (1) и II (2)

Рис. 2. Кривые изотитрования, полученные для сыворотки больного со спинномозговой травмой в РСК с антигенами I (1) и II (2)

Рис. 3. Кривые изотитрования, полученные для противогалЦ сыворотки кролика (1) и сыворотки больного рассеянным склерозом (2) в РСК с антигеном I

Таким образом, полученные результаты позволяют рекомендовать для оптимального выявления противогалЦ антител использование липидных суспензий антигена с содержанием галЦ от 6,0 до 50,0 мкг/мл, фосфолипидов—от 18,0 до 39 мкг/мл и холестерина—от 18,6 до 69 мкг/мл.

Собственные галЦ мозга не вызывают антителообразования в здоровом организме. Однако иммуногенные свойства собственных галЦ все же реализуются при некоторых патологических состояниях, приводя к образованию циркулирующих противогалЦ антител. Так, противогалЦ антитела обнаружены нами в сыворотке крови у 5 детей с инфекционными энцефаломиелиитами в титрах от 1:32 до 1:512, у 6 из 35 больных рассеянным склерозом в титрах от 1:8 до 1:32 и у больного с травмой спинного мозга в титре 1:512. Исследование иммунологической реактивности этих аутоантител установило, что в сыворотке больных противогалЦ антитела тоже выявляются в широком

диапазоне концентраций антигенов I и II (табл. 2) и проявляют максимальную иммунореактивность при концентрации ГалЦ не менее 11,2 мкг/мл, уровень которой сохраняется при 4-кратном повышении концентрации ГалЦ. Это подтверждается кривыми изофиксации, полученными с сыворотками этих больных в РСК с антигенами I и II (рис. 2). Эти кривые имеют полное сходство с кривыми, представленными на рис. 1. Таким образом, против-ГалЦ аутоантитела, обнаруженные в сыворотке больных, тоже проявляют сходную иммунологическую реактивность в РСК с различными по составу антигенами, несмотря на различную концентрацию антител в исследуемых сыворотках.

Таблица 2

Титры против-галактоцереброидных антител в реакции связывания комплемента в сыворотке больных людей при различных концентрациях галактоцереброидов (ГалЦ) в суспензии антигена

Содержание ГалЦ в суспензии антигена (мкг/мл)	Травма спинного мозга		Энцефаломиелит		Рассеянный склероз	
	антиген		антиген		антиген	
	I	II	I	II	I	II
180	—	—	—	—	—	—
90	—	—	—	—	—	—
45	1:512	1:128	нет данных	нет данных	1:256	1:128
22,5	1:512	1:512	1:32	1:32	1:256	1:256
11,2	1:512	1:512	1:32	1:32	1:128	1:256
5,6	1:128	1:256	1:32	1:32	1:128	1:128
2,8	1:16	1:16	1:4	1:2	1:4	1:128
1,4	1:2	1:4	нет данных	1:1**	1:4	1:1
0,7	0	нет данных	1:2	нет данных	1:1	1:2

Сравнение кривых изофиксации, полученных при параллельном исследовании против-ГалЦ сыворотки кролика и сыворотки крови больного рассеянным склерозом (содержащих одинаковую концентрацию против-ГалЦ антител) с одним и тем же антигеном I показало полное слияние кривых как в зоне избытка антител, так и в зоне избытка антигена (рис. 3). Это свидетельствует об идентичности и одинаковой специфичности против-ГалЦ антител, содержащихся в этих сыворотках, и об их одинаковой реактивности при взаимодействии с ГалЦ в реакции антиген—антитело. Такое же сходство иммунологической реактивности против-ГалЦ антител отмечено нами при исследовании сывороток больных острым энцефаломиелитом, рассеянным склерозом и травмой спинного мозга. Тот факт, что против-ГалЦ антитела, полученные при иммунизации животных ГалЦ, и аутоантитела, обнаруженные в сыворотке больных, имеют одинаковую иммунологическую реактивность при взаимодействии с варьирующими по составу суспензиями антигена, свидетельствует об идентичности и одинаковой специфичности этих антител.

Таким образом, проведенные исследования позволяют заключить, что в ряде патологических состояний в организме человека создаются условия, при которых ГалЦ, низкомолекулярные соединения, локализованные в мембранах олигодендроглиальных структур, изолированных в корме от иммунной системы, реализуют свои иммуногенные свойства и индуцируют образование циркулирующих антител. Какую роль играют против-ГалЦ аутоантитела, обнаруженные у больных, пока не ясно. Однако не исключено, что высокая иммунореактивность этих аутоантител может играть важную роль в патогенезе аутоиммунных демиелинизирующих заболеваний, поскольку ГалЦ локализованы в нативных мембранах миелина и олигодендроцитов таким образом, что антигенная детерминанта доступна для взаимодействия с антителами [7, 17, 22] и может сказаться вовлеченной в иммунологические реакции, развивающиеся *in situ* в самой нервной ткани и приводящие к ее разрушению.

IMMUNOLOGICAL REACTIVITY OF ANTIBODIES TO MYELIN GALACTOCEREBROSIDES WITH ANTIGEN SUSPENSIONS VARYING IN LIPID COMPOSITION

TARANOVA N. P., LUCHAKOVA O. S.

I. P. Pavlov Institute of Physiology, USSR Academy of Sciences, Leningrad

The immunological reactivity of antibodies against the specific glycolipid antigen of myelin and myelin-producing cells, galactocerebroside (GalC), was studied in complement fixation test (CFT). Two different antigen suspensions varying in lipid composition and content were used in CFT. It was shown that the antibody to GalC may be detected in the serum of GalC-immunized rabbits in CFT using a wide range of variations of lipids content and composition in antigen suspensions. The antibodies against GalC were also found in the serum of patients with some diseases of the nervous system. The isofixation curves with the used antigen suspensions have provided evidence for the identity and similar immunoreactivity of the anti-GalC antibodies detected in the patients serum and of the anti-GalC antibodies in the serum of GalC-immunized rabbits.

ЛИТЕРАТУРА

1. Таранова Н. П. Успехи соврем. биол., т. 80, № 6, с. 423—440, 1975.
2. Kishimoto J.—In: Handbook of neurochemistry, sec. ed., v. 3. Metabolism in the nervous system (ed. A. Lajtha), p. 179—199, New-York, London, Plenum Press, 1983.
3. Poduslo S. E. J. Neurochem., v. 24, p. 647—654, 1975.
4. Alving C. R., Fowble J. W., Joseph K. C. Immunochimistry, v. 11, № 8, p. 475—481, 1974.
5. Dorfman S. H., Fry J. M., Silberberg D. H., Grose C., Manning M. C. Brain Res., v. 147, p. 410—415, 1978.

6. *Fry J. M., Lisak R. P., Manning M. C., Silberberg D. H.* J. Immunol. Meth., v. 11, p. 183—185, 1976.
7. *Таранова Н. П.* Нейрохимия, т. 3, с. 419—433, 1984.
8. *Таранова Н. П., Курчик О. С.* Журн. невропатол. и психиатрии, т. 85, с. 1863—1872, 1985.
9. *Dubois-Dalcq M., Niedieck B., Buyse M.* Path. Europ., v. 5, p. 331—347, 1970.
10. *Fry J. M., Weissbarth S., Lehrer G. M., Bornstein M. B.* Science, v. 183, № 4124, p. 540—542, 1974.
11. *Johnson A. B., Bornstein M. B.* Brain Res., v. 159, № 1, p. 173—182, 1978.
12. *Saida T., Silberberg D. H., Fry J. M., Manning M. C.* Neuropathol. Exp. Neurol., v. 36, № 3, p. 627, 1977.
13. *Ulrich J., Lurgi H. J.* Neurol., v. 218, № 1, p. 7—16, 1978.
14. *Seil F. J.* Adv. Cell. Neurobiol., v. 3, p. 235—274, 1982.
15. *Зейфарт М.*—В кн.: Иммунологические методы (под ред. Х. Фримель), с. 136—140, М., Мир, 1979.
16. *Rapport M. M., Graf L.* Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 69, p. 608—632, 1957.
17. *Niedieck B.* Progr. Allergy, v. 18, p. 353—422, 1975.
18. *Таранова Н. П.* Вopr. мед. химии, т. 22, с. 567—569, 1976.
19. *Radin N. S., Lavlin F. B., Brown J. R.* J. Biol. Chem., v. 217, p. 789—796, 1955.
20. *Bartlett G. R.* J. Biol. Chem., v. 234, p. 466—471, 1959.
21. *Бродянский Ю. М.*—В кн.: Иммунологическая диагностика вирусных инфекций (под ред. Т. В. Перадзе, П. Халонен), с. 77—97, М., Мир, 1985.
22. *Dupoucy P., Billecocq A., Lefroit M.* Immunochemistry, v. 13, № 4, p. 289—294, 1976.

Поступила 17. VIII 1986



ВЛИЯНИЕ КАРДИОТРОПНЫХ НЕЙРОГОРМОНОВ ГИПОТАЛАМУСА НА Ca^{2+} -ТОКИ В НЕЙРОНАЛЬНОЙ МЕМБРАНЕ

АКОПЯН А. Р., СРАПИОНЯН Р. М., КАРАПЕТЯН Р. О., ГАЛОЯН А. А.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Из гипоталамической области мозга крупного рогатого скота выделены кардиоактивные нейрогормоны, условно обозначенные «К», «С» и «Г» [1, 2]. Ранее было установлено регулирующее влияние этих соединений на сердечную деятельность и коронарное кровообращение [3]. Кроме того, выявлено их участие в регуляции гликолитических процессов [4, 5], внутриклеточного уровня циклических нуклеотидов, посредством ингибирования фосфодиэстеразы cAMP [6], а также в высвобождении нейромедиаторов из синаптических окончаний [7].

Многообразие указанных и других внутриклеточных процессов, в регулирование которых вовлечен Ca^{2+} [8], предполагает множественность способов контроля за поступлением Ca^{2+} в клетку. Одним из основных путей поступления Ca^{2+} внутрь нервной клетки является его перенос по потенциалзависимым ионным каналам при генерации потенциала действия. В свете изложенного представлялось интересным исследовать влияние нейрогормонов «С» и «Г» на потенциалзависимые Ca^{2+} -токи в нейрональной мембране.

В работе использовали изолированные нейроны виноградной улитки, поскольку можно провести четкое разделение и измерение токов в условиях фиксации мембранного потенциала, а также, используя метод внутриклеточного диализа, проверить некоторые гипотезы о внутриклеточных механизмах действия нейромедиаторов и нейрогормонов [9]. Для регистрации Ca^{2+} -тока применяли метод фиксации мембранного потенциала в условиях внутриклеточного диализа нейронов на пластиковые присасывающих пипетках [10]. Состав внешнего физиологического раствора, pH—7.5 для определения Ca^{2+} -тока (в mM): CaCl_2 —20, трис-HCl—96, MgCl_2 —2. Внутриклеточный раствор содержал трис-HCl—130 mM, pH 7.3, смену производили через каждые 20 мин. Все

опыты проводили при комнатной температуре. Кривые регистрировали с частотой дискретизации 20 кГц.

При наружной аппликации нейрогормон «Г» (0,01 мЕ/мл) вызывал значительное ингибирование амплитуды потенциалзависимого Ca^{2+} -тока (рисунок, а) без существенного влияния на проводимость мембраны в покое. Эффект развивался через 5–10 мин после введения нейрогормона в наружный раствор и достигал максимального значения (почти полное ингибирование) примерно через 20–30 мин. В результате отмывки нейрогормона спад амплитуды Ca^{2+} -тока в большинстве случаев прекращался, но восстановление амплитуды при этом

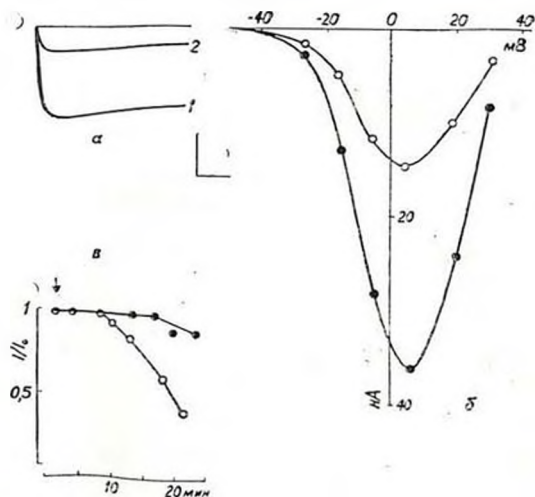


Рис. а—влияние нейрогормона «Г» (0,01 мЕ/мл) на электровозбудимый Ca^{2+} -ток: 1—контроль, 2—через 20 мин после введения нейрогормона в раствор; поддерживаемый потенциал—60 мВ, тестирующий потенциал—70 мВ; калибровка: 10 мкА, 20 нА; б—вольт-амперная характеристика Ca^{2+} -тока в норме (●) и в присутствии 0,01 мЕ/мл нейрогормона «Г» (○); в—временной ход изменения максимальной амплитуды Ca^{2+} -тока после введения нейрогормона «Г» в отсутствие (○) и присутствии (●) 10 мМ ЭГТА во внутриклеточном растворе. Поддерживаемый потенциал—60 мВ; тестирующий потенциал—70 мВ; 1_н и 1_г—обозначены пиковые амплитуды Ca^{2+} -тока а контроле и в присутствии нейрогормона соответственно

не наблюдалось в последующие 20–30 мин после начала отмывки. Уместно отметить, что снижение амплитуды не сопровождалось заметным изменением вольт-амперной характеристики Ca^{2+} -тока (рисунок, б). Аналогичный эффект на Ca^{2+} -ток был получен при введении нейрогормона «С» (0,02–0,1 мЕ/мл) в наружный раствор (рисунки не приводятся).

Для выяснения механизма действия указанных нейрогормонов на

Ca^{2+} -ток провели следующий эксперимент, пользуясь возможностями метода внутриклеточного анализа нейрона. Введением внутрь клетки 10 мМ ЭГТА мы увеличили буферную емкость для Ca^{2+} . Оказалось, что в присутствии ЭГТА ингибиторный эффект нейрогормонов на Ca^{2+} -ток резко снижается (рисунок, в). На основании полученных данных можно предложить следующий механизм действия нейрогормонов «С» и «Г» на Ca^{2+} -ток: проникая через плазматическую мембрану внутрь клетки, нейрогормоны вызывают высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных резервуаров (например, из саркоплазматического ретикулаума). Повышение таким путем внутриклеточного уровня Ca^{2+} приводит к инактивации Ca^{2+} -канала по известному механизму [11].

Это допущение подтверждается ранее полученным фактом [12] об ингибирующем воздействии нейрогормона «С» на процесс желатинирования белков саркоплазматического ретикулаума скелетной мышцы кролика, обусловленный, по-видимому, увеличением внутриклеточного Ca^{2+} .

Таким образом, в результате действия нейрогормонов «С» и «Г» поступление Ca^{2+} снаружи внутрь клетки через электровозбудимые каналы прекращается, но повышается внутриклеточный уровень за счет Ca^{2+} -содержащих клеточных органелл. Это дает основание предполагать, что некоторые биологические эффекты нейрогормонов могут быть обусловлены их способностью влиять на внутриклеточный уровень Ca^{2+} , который, как известно, тесно связан с множественными клеточными процессами.

Представляется интересным выяснение последовательности включения циклических нуклеотидов, фосфорилирования мембранных белков, обмена полифосфоинозитидов в механизмах регуляции уровня внутриклеточного Ca^{2+} под влиянием нейрогормонов «С» и «Г».

EFFECT OF CARDIOTROPIC NEUROHORMONES FROM HYPOTHALAMUS ON THE Ca^{2+} -CURRENTS IN NEURONAL MEMBRANE

AKOPYAN A. R., SRAPIONYAN R. M., KARAPETYAN R. O.,
GALOYAN A. A.

Institute of Biochemistry, ArmSSR Acad. Sci., Yerevan

Neurohormones „C“ and „G“ inhibit potential dependent Ca^{2+} -currents in the neuronal membrane of helix pomatia. Data obtained point to a possible mechanism of action of these cardiotropic neurohormones, i. e. penetration through the plasmatic membrane inside the cell, release of calcium from intracellular stores with subsequent inactivation of Ca^{2+} channel by a classic route.

ЛИТЕРАТУРА

1. Галоян А. А. Докл. АН АрмССР, т. 34, с. 109, 1962.
2. Галоян А. А. Вopr. биохимии мозга. Изд-во АН АрмССР, т. 3, с. 291—311, 1967.
3. Галоян А. А., Алексанян С. С. Докл. АН АрмССР, т. 58, с. 183—186, 1974.

4. Парсисян Г. К., Абселян Ж. Г., Галоян А. А. Докл. АН АрмССР, т. 66, с. 164—167, 1978.
5. Срапцонян Р. М., Саакян С. А., Абселян Ж. Г., Галоян А. А. Нейрохимия, т. 1, № 1, с. 36—42, 1982.
6. Галоян А. А., Гуринц Б. Я., Полюсян М. А. Вopr. биохимии мозга. Изд-во АН АрмССР, т. 11, с. 89—97, 1976.
7. Sraptonian R. M., Armenian A. R., Karapetian R. O., Sahakian F. M., Sahakian S. A., Arakelian L. N., Galoyan A. A. IBRO international symposium on Neuroendocrinology, p. 129, Leningrad, 1985.
8. Rasmussen H. Science, v. 170, p. 404—412, 1970.
9. Akopjan A. R., Chemeris N. K., Iljin V. Z. Brain Res, v. 326, p. 145—148, 1985.
10. Костюк П. Г., Кристаль О. А., Подопличко В. И. Докл. АН СССР, т. 238, с. 478, 1978.
11. Tillotson D. Neuroscience Abstr., v. 4, p. 239, 1978.
12. Галоян А. А., Александян С. С., Иванова И. И. Докл. АН АрмССР, т. 65, № 4, с. 238—241, 1977.

Поступила 14. IX 1986

Избирательная гибель нейронов. 126-й симпозиум фонда Ciba (англ.). J. Willey and Sons Ltd., 288 с., 1987.

Selective Neuronal death. Ciba Foundation Symposium 126 (Ed. by G. Bock and M. O'Connor). J. Willey and Sons Ltd., Baffins Lane, England, 288 p., 1987.

В сборнике содержатся материалы симпозиума по избирательной гибели нейронов (Лондон, 15—17 апреля 1986 г.). Авторами описываются причины и последовательность событий, приводящих к гибели нейронов в ограниченных участках головного мозга, при таких патологиях, как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, поражение моторных нейронов (амиотрофный латеральный склероз) и т. п. Среди затронутых вопросов—недавние достижения, объясняющие механизмы действия таких агентов, как тропные факторы, экзотоксины и яды, вызывающие гибель нейронов, примеры гибели нейронов в ходе нормального развития и участие в этих процессах эндокринных механизмов. Указанные вопросы рассматриваются в качестве возможных причин возникновения специфических болезней человека. Обращено внимание на тропные факторы, контролирующие выживание трансплантатов нервной ткани, что открывает новые перспективы в трансплантологии. Материалы этого междисциплинарного симпозиума суммируют информацию по указанным выше дегенеративным заболеваниям мозга и предлагают новые подходы для исследователей. Книга представляет интерес для нейробиологов, невропатологов, психиатров, геронтологов, специалистов в области клеточной и молекулярной биологии.



УДК 612.82+577.112+577.113

ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДНЫХ ФАКТОРОВ МОЗГА НА ВКЛЮЧЕНИЕ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ В ДНК И БЕЛОК КУЛЬТИВИРУЕМОЙ НЕРВНОЙ ТКАНИ

ВИТВИЦКИЙ В. Н., ВИКТОРОВ И. В., ШАШКОВА Н. А.

Институт общей генетики АН СССР, *НИИ мозга ВЦ
психического здоровья АМН СССР, Москва

В настоящее время можно считать твердо установленным фактом, что регуляция пролиферативных процессов в клетках животных происходит путем сложного взаимодействия систем активации и ингибирования деления клеток [1, 2]. В ряде работ описана большая группа активаторов и ингибиторов пролиферации, так называемых положительных и отрицательных ростовых факторов [3—5]. Например, стимулирование роста и деление клеток можно вызвать различными ионами, глюкозой и другими сахарами, некоторыми липидами, биогенными аминами, простагландинами, некоторыми гормонами и большой группой пептидных ростовых факторов, полученных из самых разных тканей и клеток (фибробластов, тромбоцитов, хряща, мышц, эпителия, мезодермы, эндокринных клеток, нейронов и глиальных клеток) [4, 5]. Все эти вещества имеют слабую тканевую специфичность и не обладают видовой специфичностью. Например, фактор роста нервной ткани [6—8], стимулирующий развитие симпатических нейронов и впервые обнаруженный в опухолевых клетках, синтезируется в наибольших количествах в слюнной, подчелюстной и предстательной железах животных и содержится лишь в очень небольших количествах в головном мозгу. Остается открытым вопрос о специфических тканевых регуляторах роста и пролиферации клеток нервной ткани, который в настоящее время приобретает все большее значение в связи с интенсивным развитием молекулярных и молекулярно-генетических исследований патологических процессов НС и разработкой проблемы трансплантации и регенерации ткани и клеток мозга.

В связи с тем, что биохимически идентифицированные факторы роста и пролиферации клеток мозга изучены наиболее слабо, нами была предпринята попытка выделения и индивидуального исследования от-

дельных веществ—регуляторов пролиферации. при этом мы исходили из известных фактов, что экстракты, выделенные из разных отделов мозга на стадиях активной клеточной пролиферации, способны стимулировать деление клеток этой же ткани в условиях клеточных или тканевых культур [9, 10]. С другой стороны, экстракты из тех структур мозга, для которых на данном этапе развития клеточная пролиферация не характерна, могут ингибировать пролиферацию [11, 12].

В наших предыдущих исследованиях [13—15] разработана процедура фракционирования экстрактов мозга, получены в чистом виде и частично охарактеризованы три группы активаторов и ингибиторов пролиферации клеток мозга.

Настоящая работа посвящена сравнительному изучению влияния выделенных нами активаторов пролиферации низкомолекулярного кислого пептида $pI=3.6$ и нейтрального белка $pI=6.8$ [15] на клетки мозга в реаггировавших культурах.

Фракционирование экстрактов коры мозга 15—17-дневных эмбрионов крыс или мозжечка 8—10-дневных крыс, то есть участок мозга, для которых на данной стадии развития характерны активные пролиферативные процессы, и получение кислого пептида $pI\ 3.6$ и нейтрального белка $pI\ 6.8$ включало процедуры ультрацентрифугирования, высаливания при возрастающих концентрациях сульфата аммония, гель-фильтрации и ИЭФ [13—15].

Первый этап очистки экстрактов представлял собой осаждение фракций, активирующих пролиферацию, с использованием возрастающих концентраций сульфата аммония (основная масса этих белков осаждается при концентрации соли от 60 до 100% насыщения). Затем белки, стимулирующие включение [3H]тимидина в ДНК клеток нервной ткани, очищали от солей на колонке с сефадексом G-25 и подвергали ИЭФ на колонке по модифицированному методу Weller и соавт. [16]. Отдельные фракции, снятые с колонки, подвергали диализу для очистки от амфилинов и сахарозы и добавляли к определенному количеству клеток нервной ткани, находящихся в среде Эрла, содержащей [3H]тимидин.

Глио-нейрональные агрегаты получали при культивировании в суспензии диссоциированных клеток головного мозга 16—19-дневных эмбрионов мышей линии C57B1 [17]. Питательная среда для культивирования состояла из 30% смеси равных объемов плацентарной человеческой и эмбриональной телячьей сыворотки, 50% минимальной среды Игла, 20% сбалансированного солевого раствора Симмса и содержала 600 мг% глюкозы, 0,2 ед/мл инсулина, 2 мМ глутамина. В экспериментальных сериях культур в среду вводили кислый ($pI\ 3.6$) или нейтральный ($pI\ 6.8$) пептиды в концентрациях 10, 30, 40 мкг/мл. Питательная среда в контрольных сериях содержала сывороточный альбумин в тех же концентрациях. Для определения скорости биосинтеза белка и ДНК в питательную среду добавляли [^{14}C]меченный гидролизат белка (10 мкг/мл с У.А. 40 Кп/мМ) и [3H]тимидин (50 мкг/мл с У.А.

59 Кн/мм). Взвесы клеток в среде, содержащей все вышеуказанные компоненты (по 3 мл), помещали во флаконы из-под антибиотиков и культивировали в портативной роллерной установке по методике, разработанной в нашей лаборатории [17]. Через 24, 48, 72, 96 ч культуры отбирали для дальнейших исследований и при необходимости сохраняли до обработки при $-16-20^{\circ}$.

Для определения включения метки в белки и нуклеиновые кислоты глио-нейрональные агрегаты отделяли от среды центрифугированием (800 об/мин. 5 мин), отмывали от невключившихся меченых предшественников в физиологическом растворе с последующим осаждением центрифугированием (3 раза) и лизировали в 1%-ном растворе ДДС-Na с последующим прогреванием (100° , 5 мин). В полученных лизатах спектрофотометрически определяли концентрацию белка и ДНК, растворяли их в определенном объеме тритон-толуольного сцинтиллятора для гомогенного счета и просчитывали на ^{14}C и на ^3H в счетчике «Intertecinique SL-4000» (Франция).

Как показали проведенные нами исследования [13—15], фракционирование экстрактов из участков мозга, в которых на данной стадии развития организма идет активная пролиферация клеток, дает возможность получить различные группы веществ, способных стимулировать пролиферацию клеток переживающих срезов мозга крыс и включение ^3H тимидина в репликативном синтезе ДНК. Первая группа была идентифицирована нами [14] как кислый низкомолекулярный пептид (рI 3.6), способный заметно усиливать синтез ДНК при добавлении его в систему *in vitro* в концентрации 1 мкг/мл. Вторая группа идентифицирована как нейтральный (рI 6.8) белок [15].

Выделенные нами пептидные факторы тестировали в культурах ре-агрегированных клеток эмбрионального мозга мышей. Проведенные исследования показали, что в процессе развития глио-нейрональных агрегатов в течение первых 4-х суток (96 ч) происходит интенсивное включение ^3H тимидина в ДНК и ^{14}C аминокислот в белки культивируемых клеток. В дальнейшем скорость включения метки постепенно снижалась, что, по-видимому, связано с процессами дегенерации части культивируемых клеток в результате истощения питательной среды. Добавление в среду инертного белка—сывoroточного альбумина (СА) в концентрации до 100 мкг/мл не меняло общей картины включения меченых предшественников (кривые со знаком «+» на рис. 1, 2).

Далее нами были проведены опыты по исследованию включения меченых предшественников в ДНК и белки культивируемых клеток мозга в присутствии описанных ранее пептидного и белкового активаторов пролиферации.

Типичная кривая, полученная в одном из таких опытов, приведена на рис.1. В качестве контроля использовали обычную суспензионную культуру глио-нейрональных агрегатов, в питательную среду которой добавляли СА в концентрации 100 мкг/мл. В питательную среду экспериментальных культур добавляли эквивалентное количество рI 3,6 пеп-

тида—активатора пролиферации. Как следует из результатов, приведенных на рис. 1, наличие в культуральной среде пептида рІ 3,6 значительно увеличивало включение $[^3\text{H}]$ тимидина в культивируемые клетки (рис. 1, а), однако присутствие этого фактора не сказывалось на скорости включения $[^{14}\text{C}]$ аминокислот в белки исследованных клеток (рис. 1, б).

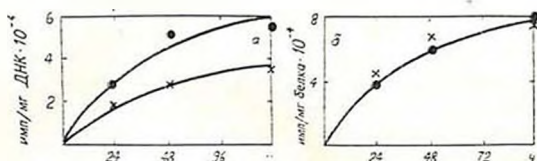


Рис. 1. Включение $[^3\text{H}]$ тимидина/мг ДНК (а) и $[^{14}\text{C}]$ меченых аминокислот/мг белка (б) культивируемых клеток при добавлении в среду рІ 3,6 пептида в концентрации 100 мкг/мл (●), или эквивалентного количества бычьего сывороточного альбумина (X)

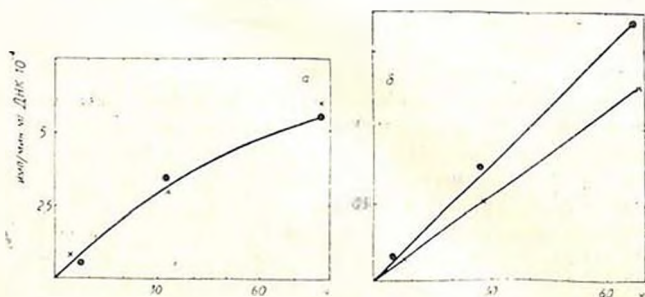


Рис. 2. Включение $[^3\text{H}]$ тимидина/мг ДНК культивируемых клеток (а), и включение $[^{14}\text{C}]$ меченых аминокислот/мг белка (б) при добавлении в среду рІ 6,8 белка в концентрации 100 мкг/мл (●), или соответствующего количества бычьего сывороточного альбумина (X)

Совершенно иначе ведет себя исследованный нами белковый фактор рІ 6,8 при добавлении его в той же концентрации в среду для культивирования глαιο-нейрональных агрегатов. Как видно из рис. 2, белок рІ 6,8 практически не влияет на включение $[^3\text{H}]$ тимидина в ДНК, но заметно повышает включение $[^{14}\text{C}]$ аминокислот в белки культивируемых клеток мозга.

Вряд ли можно сомневаться в наличии в развивающейся нервной ткани отдельных клеточных популяций, для которых характерно преобладание синтетических процессов на уровне ДНК или белка. Известно, что на разных стадиях клеточного цикла в развивающихся клетках последовательно включаются отдельные этапы процессов внутриклеточного синтеза. Например, S-фаза характеризуется главным образом уси-

лением синтеза ДНК и, по данным некоторых авторов, синтез белка на этой фазе значительно замедляется, тогда как на стадиях, связанных с «клеточным покоем», согласно литературным данным, значительно возрастает синтез белка [18]. С другой стороны, в несинхронизированных культивируемых клетках, с которыми мы имели дело в наших опытах, усиление одного из синтетических процессов, по-видимому, не может не сказываться на скорости вступления клетки в следующую фазу митотического цикла и должно привести к интенсификации других процессов синтеза. Остается неясным, почему в данном исследовании нам не удалось обнаружить прямой связи усиления синтеза ДНК с соответствующим повышением синтеза белковых компонентов клеток. Возможно, наличие избытка стимуляторов определенного синтеза при относительно коротком времени эксперимента обуславливает резкое преобладание одного из синтетических процессов над другими. Однако для более точного ответа на этот вопрос необходимы дополнительные исследования.

Использованные в настоящей работе методы биохимического анализа процессов синтеза ДНК и белка не позволяют с достаточной достоверностью ответить на вопрос о том, какие клетки, входящие в состав развивающихся глио-нейрональных агрегатов, служат мишенями изучаемых факторов. Предварительные данные, полученные методом компьютерной морфометрии на полутонких срезах глио-нейрональных агрегатов с использованием анализатора изображений типа ТАС [19], показали, что в присутствии фактора рI 3,6 увеличивается количество клеток, характеристики которых позволяют отнести их к нейроглиальным. В то же время, влияние фактора рI 6,8 сопровождается ускоренным по сравнению с контролем увеличением размеров тел клеток, составляющих глио-нейрональные агрегаты. В дальнейшем предполагается более детально изучить действие описанных факторов на разные типы глиальных клеток и нейроны, используя гистоавтордиографические методы, а также тестировать действие этих факторов в системе *in vivo* при введении их в ликвор желудочков мозга млекопитающих.

EFFECT OF PEPTIDE FACTORS FROM BRAIN ON THE INCLUSION OF PRECURSORS INTO DNA AND PROTEIN IN NERVOUS TISSUE CULTURE

*VITVITSKY V. N., VICTOROV I. V., SHASHKOVA N. A.

Institute of General Genetics Acad. Sci. USSR, Moscow. *Brain Research
Institute of the All-Union Center of Mental Health Acad. Med.]
Sci. USSR, Moscow

The acid (pI 3,6) low molecular weight peptide and neutral (pI 6,8) protein were obtained from the developing cerebellum of the rat's brain. The data obtained show that the peptide enhances significantly the incorporation of ^3H -thymidin into DNA of cultured cells of

the embryonic brain and doesn't influence the protein synthesis. The protein increases the rate of ^{14}C -amino acids incorporation into newly synthesized proteins and doesn't influence the synthesis of DNA of the cultured brain cells. The data obtained in the morphological studies on reaggregated cultures of the embryonic brain cells suggests that the acid peptide (pl 3,6) increases the mitotic activity of glial cells.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bullough W. S. Biol. Rev., v. 50, p. 99—127, 1975.
2. Bullough W. S.—In: Growth Kinetics and Biochemical Regulation of Normal and Malignant Cells (eds B. Brewinco, R. M. Hamphry), p. 77—89, Baltimore; Williams and Wilkins Co., 1975.
3. Rudland P. S., de Asua L. J. BBA, v. 560, № 1, p. 91—133, 1979.
4. Tissue Growth Factors (ed. R. Baserga), Springer-Verlag, 1981.
5. Holley R. W.—In: Funct. Regulat. Cell and Mol. Levels, Proc. Symp. Physiol., p. 41—45, New-York, 1982.
6. Molecular Genetic Neuroscience (eds. F. O. Schmitt, S. J. Bird, F. F. Bloom.), New-York, Raven Press, 1982.
7. Родионова В. М., Родионов И. М., Ярыгин Б. Н. Успехи соврем. биол., т. 76, вып. 2, № 5, с. 310—327, 1973.
8. Каюнов В. Н. Фактор роста нервной ткани, Минск, Наука и техника, 1984.
9. Barakat I., Sensenbrenner M. Developmental Brain Res., v. 1, p. 355, 1981.
10. De Vries G. R., Salaer J. L., Bunde R. P. Developmental Brain Res., v. 3, p. 295, 1982.
11. Kolar S., Fodvarka P., Zvakova E. Experientia, v. 39, № 2, p. 168, 1983.
12. Torok L. J., Toro J. Embriologia, v. 6, p. 319, 1962.
13. Витвицкий В. Н.—В сб.: Возбудимые клетки в культуре ткани. Материалы I Всесоюз. симпозиума, с. 145, Пушкино, 1984.
14. Витвицкий В. Н. Биохимия, т. 50, № 10, с. 1616—1620, 1985.
15. Витвицкий В. Н. Биологические науки, № 2, с. 102—106, 1986.
16. Weller D. L., Heaney A., Sjogren R. E. Biochim. et biophys. acta, v. 168, p. 576—581, 1968.
17. Викторова И. В., Лыжин А. А., Шашкова Н. А. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 99, № 5, с. 632—634, 1985.
18. Епифанова Е. О., Терских В. В., Полуновский В. А. Покоящиеся клетки. Свойства и функции в организме, М., Наука, 1983.
19. Hartman J., Faltin J., Lodin Z., Victorov I. V., Lisa V.—In: Proc. Symp. Neuro Ontogeneticum, Quartum, p. 36, Prague, 1985.

Поступила 28. IV 1986



УДК 612.82+612.766.2

СОДЕРЖАНИЕ ПОЛИАМИНОВ И СПЕЦИФИЧЕСКИХ КОМПОНЕНТОВ В РАЗЛИЧНЫХ ОТДЕЛАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ СТРЕССОРНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ.

1. ИММОБИЛИЗАЦИОННЫЙ СТРЕСС

ТИГРАНЯН Р. А., ДЕМИН Н. Н., КОВАЛЕВ В. Ю.

Институт по стандартизации и контролю лекарственных средств МЗ СССР, Москва;
*Институт физиологии им. И. П. Павлова АН СССР, Ленинград

Сдвиги функционального состояния головного мозга, в частности в экстремальных условиях, сопровождаются изменениями в системе биосинтеза белков и нуклеиновых кислот [1—3]. Эти изменения должны быть обусловлены сдвигами в системах регуляции процессов синтеза этих макромолекул, что может отражаться и на содержании в мозгу таких низкомолекулярных нейромодуляторов, как полиамины и ряд специфических компонентов мозга.

В связи с этим нами было проведено изучение содержания полиаминов и специфических компонентов в головном мозгу при адаптации к действию экстремальных факторов различной природы. К полиаминам относятся путресцин, спермидин и спермин. Спермин и спермидин являются производными путресцина—1,4-диаминобутана [4]. Полиамины участвуют в механизмах, определяющих интенсивность биосинтеза белков, стимулируя его на уровне транскрипции ДНК [4]. Гомокарнозин, путреанин и 1-цистатионин в основном содержатся в головном мозгу, вследствие чего получили название его специфических компонентов. Гомокарнозин и путреанин происходят из полиаминов при их окислении, причем синтез гомокарнозина осуществляется через стадию образования ГАМК [6, 7]. Предшественники синтеза 1-цистатионина—метионин и S-аденозилметионин являются общими с полиаминами [8]. Показано, что процессы метаболизма специфических компонентов и полиаминов в мозгу непосредственно связаны друг с другом [6—8] и играют важную роль в других биохимических превращениях, происходящих в ЦНС [4, 9, 10].

В настоящем сообщении представлены данные о содержании полиаминов и специфических компонентов в различных отделах головного мозга крыс при воздействии иммобилизационного стресса.

Работу проводили на крысах-самцах линии *Wistar* массой 200—250 г. В качестве модели стрессорного воздействия использовали иммобилизацию (ИММ), которую проводили по модифицированному методу Selye [11]; этот способ ограничения подвижности основан на фиксации животных с помощью специальных раздвижных металлических столиков. Продолжительность ИММ составляла 5, 15, 30, 60 и 180 мин. Исследовали продолговатый мозг, мозжечок, гипоталамическую область и большие полушария мозга; в этих отделах, выделенных по специальной схеме [12], определяли концентрацию полиаминов [13], гомокарнозина [14], путреанина [15] и 1-цистатионина [16]. Полученные данные обрабатывали методом вариационной статистики с использованием *t*-теста Стьюдента.

Результаты проведенных исследований в виде средних данных представлены в графической форме на рис. 1 и 2.

В продолговатом мозгу уже на 5-й мин ИММ было отмечено значительное снижение концентрации путресцина (на 30%) и спермидина (на 35%) при одновременном повышении содержания гомокарнозина и 1-цистатионина (на 25 и 17% соответственно). На 15-й мин происходило более выраженное снижение количества путресцина (на 39%) и особенно спермидина (на 59%). содержание гомокарнозина и путреанина уменьшалось по сравнению с контролем более чем в 2 раза, а концентрация 1-цистатионина—почти в 2 раза. При 30-минутной ИММ выявилось лишь столь же низкое содержание спермидина (на 54% ниже контроля) при нормализации остальных показателей, а при 60-минутной—увеличение (выше нормы) концентрации путресцина (на 46%), спермина (на 27%), путреанина (на 32%) и 1-цистатионина (на 16%) на фоне продолжавшегося, но несколько меньшего снижения содержания спермидина (на 25%); 3-часовое воздействие ИММ приводило к уменьшению концентрации путресцина (на 33% ниже нормы) и спермидина (на 50%) на фоне резкого повышения содержания спермина (в 2,1 раза) и путреанина (на 84%).

В мозжечке 5-минутная ИММ сопровождалась повышением содержания путреанина (на 21%) и 1-цистатионина (на 20%); на 15-й мин было отмечено выраженное повышение концентрации путресцина (в 2 раза), спермина (в 2,3 раза) и гомокарнозина (на 30%), а также дополнительное увеличение количества путреанина (до 36% выше нормы) и 1-цистатионина (до 66%) при одновременном снижении содержания спермидина (на 22%), а на 30-й мин—снижение (ниже контроля) количества гомокарнозина (на 18%) и еще большее повышение (в 2,4 раза) содержания спермина при нормализации количества путресцина, спермидина, путреанина и 1-цистатионина. На 60-й мин ИММ имело место повышение концентрации путресцина (на 55%), спермидина (на 20%) и особенно спермина (в 2,9 раза) при одновременном дополнительном снижении содержания гомокарнозина (до 24% ниже нормы), а на 180-й мин—еще более значительное повышение концентрации путресцина (почти в 2 раза) и резкое возрастание концентрации спер-

мидина (в 3,2 раза) и спермина (в 6 раз), в то время как количество путреанина снижалось (до 36% ниже нормы).

В гипоталамической области уже на 5-й мин ИММ происходило существенное уменьшение концентрации всех исследованных полиаминов—путресцина, спермидина и спермина (на 44, 66 и 41% соответ-

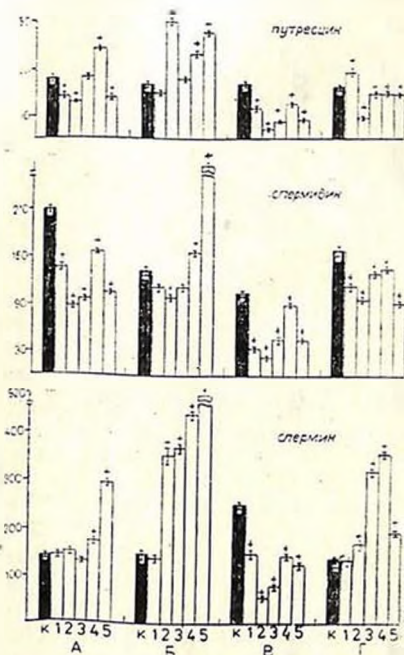


Рис. 1. Содержание полиаминов (нмоль/г ткани) в различных отделах головного мозга крыс при иммобилизации: а—продолговатый мозг, б—мозжечок, в—гипоталамическая область, г—большие полушария; К—контроль, 1, 2, 3, 4 и 5—соответственно 5-, 15-, 30-, 60- и 180-я мин иммобилизации. Крестиками отмечены достоверные отличия по сравнению с контролем

ственно) при одновременном повышении содержания гомокарнозина, путреанина и 1-цистатионина (на 22, 37 и 28% соответственно); на 15-й мин имело место еще более резкое уменьшение концентрации путресцина (в 5,3 раза по сравнению с нормой), спермидина (в 4,2 раза) и спермина (в 4,4 раза) наряду с продолжавшимся увеличением содержания гомокарнозина (до 81%), 1-цистатионина (до 59%) и особенно путреанина (в 2,5 раза). На 30-й мин ИММ снижение (против нормы) концентрации путресцина несколько сокращалось (до 3,2 раза), спермидина (до 2,3 раза) и спермина (до 3,1 раза) при сохранении по-

вышенного (ниже нормы), хотя и сокращенного содержания путрецина (в 2,2 раза) и 1-цистатионина (до 23%). На 60-й мин ИММ все еще сохранялось понижение концентрации путресцина, спермидина и спермина (на 38, 15 и 42% соответственно) на фоне повышенного содержания путреанина (на 19% выше нормы) и 1-цистатионина (на 23%), а

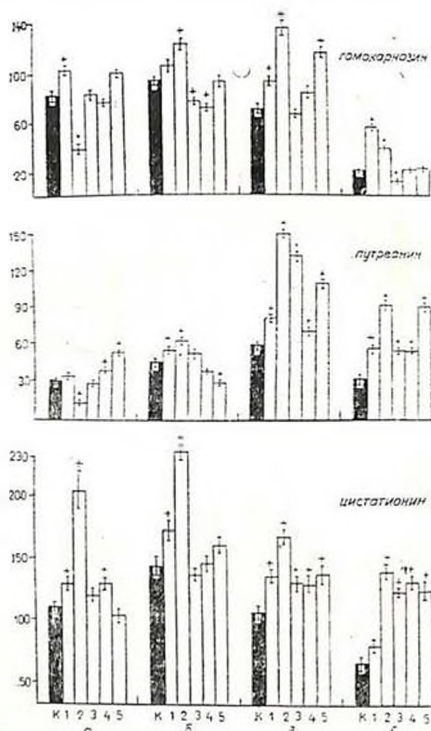


Рис. 2. Содержание специфических компонентов (μмоль/г ткани) в различных отделах головного мозга крыс при иммобилизации. Обозначения те же, что и на рис. 1

3-часовая ИММ вновь приводила к значительному снижению концентрации полиаминов—путресцина до 66%, спермидина до 58% и спермина до 48%—при одновременном повышении содержания гомокарнозина (до 53%), путреанина (до 86%) и 1-цистатионина (до 29%).

В больших полушариях мозга 5-минутное воздействие ИММ сопровождалось повышением концентрации путресцина (на 26%), путреанина (на 34%) и особенно гомокарнозина (в 2,9 раза) при одновременном снижении содержания спермидина (на 29%). На 15-й мин ИММ

было отмечено еще более значительное снижение концентрации путресцина (до 58%) и спермидина (до 39%) наряду с повышением содержания спермина (на 20%), дальнейшим увеличением количества путресцина (до 2,1 раза ниже нормы) и 1-цистатионина (в 2,2 раза) при некотором снижении количества гомокарнозина (до 2,2 раза выше контроля). На 30-й мин происходило повышение концентрации путресцина (до 15% ниже нормы), спермидина (до 19%) и спермина (до 2,2 раза выше нормы) при снижении количества гомокарнозина (до 22% ниже нормы), путресцина (до 28% выше нормы) и 1-цистатионина (до 93% выше нормы). На 60-й мин сохранялось снижение концентрации путресцина (на 13%) и спермидина (на 15%) при увеличении концентрации путресцина (на 28%), 1-цистатионина (в 2 раза) и спермина (в 2,5 раза). На 180-й мин ИММ наблюдали сохранение низкой концентрации путресцина (на 17% ниже нормы) и спермидина (на 42% ниже нормы) при некотором падении количества спермина (до 39% выше нормы) и 1-цистатионина (до 95%) с увеличением концентрации путресцина (до 2,1 раза по сравнению с контролем).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что ИММ оказывала выраженное воздействие на метаболизм в ЦНС опытных крыс, на что указывают значительные неоднозначные изменения концентрации полиаминов и специфических компонентов, причем неодинаковые в различных отделах головного мозга.

Обращает на себя внимание статистически достоверное снижение концентрации исследованных полиаминов на всех избранных нами сроках иммобилизационного стресса в гипоталамической области (рис. 1), что коррелирует с соответствующим повышением количества биологически активных метаболитов полиаминов [6, 7]—путресцина и 1-цистатионина, а также и гомокарнозина (рис. 2). Следует отметить, что в данной структуре головного мозга сосредоточены нейросекреторные ядра, входящие в гипоталамо-гипофизарно-адреналовую систему, и другие важные нейрорегуляторные центры, принимающие активное участие в организации состояния стресса. Описанные нами сдвиги в содержании полиаминов и специфических компонентов могут указывать как на увеличение катаболизма полиаминов в условиях ИММ, так и на адаптационный характер накопления исследованных специфических компонентов головного мозга в гипоталамусе. Максимальное снижение содержания полиаминов в гипоталамической области было констатировано на 15-й мин ИММ. Это согласуется с имеющимися данными [17] о значительном падении также и количества норадреналина в nn. ventromedialis и supraopticus гипоталамуса на 15–20-й мин ИММ.

Вызывает интерес также противоположное явление при ИММ—тенденция к накоплению полиаминов на более поздних сроках эксперимента, особенно спермина (более всего в мозжечке). При этом количество специфических компонентов в больших полушариях также повышалось. Видимо, это свидетельствует о значительной интенсификации метаболизма полиаминов—как их катаболизма, так и биосинтеза—в оп-

ределенных отделах мозга при ИММ. В то же время высокое содержание спермина при ИММ во всех исследованных отделах мозга (за исключением гипоталамической области) также может указывать на важное значение этого полиамина в процессах биосинтеза белков, в связи с чем в ЦНС и поддерживается высокий уровень содержания спермина и при резко выраженном стрессорном состоянии.

Накопление L-цистатинина в различных отделах мозга при ИММ подтверждает предположение о том, что в условиях стресса L-цистатинин может выступать как медиатор торможения [18].

POLYAMINE AND SPECIFIC COMPONENT CONTENT IN THE VARIOUS PARTS OF RAT BRAIN UNDER STRESSOR INFLUENCES. I. IMMOBILIZATION

TIGRANYAN R. A., *DOEMIN N. N., KOVALEV V. Yu.

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

*I. P. Pavlov Institute of Physiology, USSR Acad. Sci., Leningrad

Influence of the immobilization various duration on the polyamine (putrescine, spermidine, spermine) and the brain specific component (homocarnosine, putrescine, L-cystathionine) content in medulla oblongata, cerebellum, hypothalamic area and large hemispheres of rats has been studied. It has been shown that the immobilization stress led to considerable changes in the concentration of the compounds mentioned in all brain parts investigated. The most pronounced changes were revealed on the 15th min of the immobilization. In most cases the drop in polyamine content correlated with the increase of the content in the specific components.

ЛИТЕРАТУРА

1. Палладин А. В., Белик Я. В., Полякова Н. М. Белки головного мозга и их обмен, Киев, Наукова Думка, 1972.
2. Демин Н. Н., Котик А. Б., Моисеева Н. И. Нейрофизиология и нейрохимия сна, А., Наука, 1978.
3. Хайдарлиу С. Х. Функциональная биохимия адаптации, Кишинев, Штиинца, 1984.
4. Tabor C. W., Tabor H. Ann. Rev. Biochem., v. 53, p. 749—790, 1980.
5. Кричевская А. А., Бондаренко Т. Н., Маклецова М. Г. Нейрохимия, т. 4, с. 314—326, 1985.
6. Konishi H., Nakajima T., Sano I. J. Biochem., v. 81, p. 200—205, 1977.
7. Asatoor A. M. Biochim. et biophys. acta, v. 586, p. 55—62, 1979.
8. Finkelstein J. D. Metabolism, v. 23, p. 387—398, 1974.
9. Werman R., Davidoff R. A., Aprison M. H. Life Sci., v. 5, p. 1431—1440, 1966.
10. Adriaenssens K., Allen R. J., Lowenthal A., Mardens Y., Tourtellotte W. W. J. Genet. Hum., v. 17, p. 223—230, 1969.
11. Květnanský R., Mtkulaj L. Endocrinology, v. 87, p. 738—743, 1970.
12. Cicero T., Sharpe L., Robins E., Grote S. J. Neurochem., v. 19, p. 2241—2243, 1972.

13. Inoue H., Mizutani A. *Anal. Biochem.*, v. 56, p. 408—416, 1973.
14. Kozawa A., Sano I. *J. Neurochem.*, v. 14, p. 211—214, 1967.
15. Kakimoto Y., Nakajima T., Kumon A., Matsuoka Y., Imaoka N., Sano I. *J. Biol. Chem.*, v. 244, p. 6003—6007, 1969.
16. Shimizu H., Kakimoto Y., Sano I. *J. Neurochem.*, v. 13, p. 65—73, 1966.
17. Kvetnansky R., Mitró A., Palkovits M., Brownstein M., Torda T., Vidas M., Mikulaj L.—In: *Catecholamines and stress* (eds. E. Usdin, R. Kvetnansky, I. Kopin), p. 39—50, Oxford, Pergamon Press, 1976.
18. Takeuchi H., Meri A., Kinsaka M., Ohmori S. *Brain Res.*, v. 67, p. 342—348, 1974.

Поступила 14. V 1986

Г. Хиллман. *Клеточная структура нервной системы млекопитающих (Harold Hillman. Cellular Structure of the Mammalian Nervous System)*, Великобритания, Lancaster, MTP Press Lim., Kluwer Academic Publ., 1985. 320 с.

Harold Hillman—профессор физиологии и заведующий лабораторией прикладной нейробиологии Суррейского университета (г. Гилдфорд, Англия). В монографии подытожены результаты 23-летних исследований автора и его сотрудников; многие из этих работ ранее не были опубликованы. Книга содержит историю развития представлений о клеточной структуре ЦНС, критический анализ методов изучения нейронов и различных глиицитов с помощью световой и электронной микроскопии, окрашивания, культуры ткани, фракционирования, а также физиологических методов. Автор пришел к выводу, что в ЦНС как по объему, так и по физиологическим, биохимическим и фармакологическим свойствам доминирует синцитиальная структура. В связи с полученными данными он радикально пересмотрел модели мембран по Davison-Danielli и Singer-Nicholson, модель миелинизации по Geren, представления о мембранном транспорте, морфологии и физиологии синапсов, аксональном транспорте, ГЭБ и другие основные нейробиологические положения, которые непосредственно важны и для функциональной нейробиологии. Предложены новые теории о распространении возбуждения в ЦНС, рецепторах, природе внеклеточного пространства, новая классификация нормальных и опухолевых клеток в ЦНС. Особый раздел посвящен практическим методам исследования.

Книга содержит 82 рисунка, 30 таблиц и около 1000 библиографических ссылок.

Монография предназначена для широкого круга нейробиологов разных специальностей.

13. Inoue H., Mizutani A. *Anal. Biochem.*, v. 56, p. 408—416, 1973.
14. Kawanawa A., Sano I. *J. Neurochem.*, v. 14, p. 211—214, 1967.
15. Kakimoto Y., Nakajima T., Kumon A., Matsuoka Y., Imaoka N., Sano I. *J. Biol. Chem.*, v. 244, p. 6003—6007, 1969.
16. Shimizu H., Kakimoto Y., Sano I. *J. Neurochem.*, v. 13, p. 65—73, 1966.
17. Kvetnansky R., Mitro A., Palkovits M., Brownstein M., Torda T., Vidas M., Mikulaj L.—In: *Catecholamines and stress* (eds. E. Usdin, R. Kvetnansky, I. Kopin), p. 39—50, Oxford, Pergamon Press, 1976.
18. Takeuchi H., Meri A., Kinsaka M., Ohmori S. *Brain Res.*, v. 67, p. 342—348, 1974.

Поступила 14. V 1986

Г. Хиллман. *Клеточная структура нервной системы млекопитающих* (Harold Hillman. *Cellular Structure of the Mammalian Nervous System*), Великобритания, Lancaster, MTP Press Lim., Kluwer Academic Publ., 1985. 320 с.

Harold Hillman—профессор физиологии и заведующий лабораторией прикладной нейробиологии Суррейского университета (г. Гилдфорд, Англия). В монографии подытожены результаты 23-летних исследований автора и его сотрудников; многие из этих работ ранее не были опубликованы. Книга содержит историю развития представлений о клеточной структуре ЦНС, критический анализ методов изучения нейронов и различных глиицитов с помощью световой и электронной микроскопии, окрашивания, культуры ткани, фракционирования, а также физиологических методов. Автор пришел к выводу, что в ЦНС как по объему, так и по физиологическим, биохимическим и фармакологическим свойствам доминирует синцитиальная структура. В связи с полученными данными он радикально пересмотрел модели мембран по Davison-Danielli и Singer-Nicholson, модель миелинизации по Geren, представления о мембранном транспорте, морфологии и физиологии синапсов, аксональном транспорте, ГЭБ и другие основные нейробиологические положения, которые непосредственно важны и для функциональной нейробиологии. Предложены новые теории о распространении возбуждения в ЦНС, рецепторах, природе внеклеточного пространства, новая классификация нормальных и опухолевых клеток в ЦНС. Особый раздел посвящен практическим методам исследования.

Книга содержит 82 рисунка, 30 таблиц и около 1000 библиографических ссылок.

Монография предназначена для широкого круга нейробиологов разных специальностей.



УДК 612.822.1:612.57

НЕЙРОМЕДИАТОРНЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ И ПЕПТИДЫ И
МЕТАБОЛИЗМ БЕЛКОВ ПРИ ГИПОТЕРМИИ
И ЗИМНЕЙ СПЯЧКЕ

ЭМИРБЕКОВ Э. З.

Дагестанский государственный университет им. В. И. Ленина, Махачкала

Метод общего охлаждения организма с целью снижения интенсивности метаболизма находит применение в экспериментальной биологии [1] и в медицинской практике [2]. Однако при искусственной гипотермии теплокровных животных равномерного замедления всех биохимических реакций не происходит. При этом в результате дискоординации ферментативных процессов развивается ряд патологических процессов в разных органах и тканях, и прежде всего в головном мозгу [1, 3]. При естественном снижении температуры тела, при гипобнозе у зимоспящих животных во время зимней спячки даже при более низких температурах тела, чем при искусственной гипотермии, происходит плановая перестройка метаболизма и сохраняется регулирующая деятельность ЦНС [4]. Для выяснения механизмов резистентности организма к низкой температуре и прогнозирования возможных осложнений первоочередное значение имеет изучение специфических и неспецифических реакций головного мозга на искусственную гипотермию и развивающихся в нем явлений, среди которых центральное место принадлежит регуляторным процессам. В адаптационно-компенсаторных нейрохимических механизмах при этом доминирующая роль принадлежит синаптическим нейромедиаторным системам.

Целью настоящей работы явилось изучение динамики содержания в мозгу таких нейромедиаторных аминокислот, как глутамат, аспартат, ГАМК, таурин и дипептидов—цистатинина и гомокарнозина, а также физико-химических характеристик белков различных фракций при гипотермии и зимней спячке.

Опыты проводили на белых крысах и кавказских малых сусликах (*Citellus pygmaeus* Pallas), отловленных в изменной части Дагестана в июне-июле 1984—85 гг. Гипотермию у крыс вызывали в специальных камерах с циркулирующей холодной водой 4—5°. Ректаль-

ную температуру снижали в камере до 19—20° в течение 55—60 мин. В отдельной серии опытов состояние гипотермии с температурой 19—20° поддерживали 2 ч. Для вызывания зимней спячки сусликов в ноябре их помещали в индивидуальные клетки, создавая условия, близкие к естественным для этого сезона, и переносили в темную комнату с температурой 5—6°. Животные впадали в зимнюю спячку с температурой тела 8—9°. Исследования проводили на сусликах, которых забивали в 1-й день, через 1 неделю, 2, 3 месяца после начала спячки. Контрольных и подопытных животных декапитировали, голову целиком замораживали в жидком воздухе и на холоду доставали большие полушария мозга. В безбелковом экстракте мозга количественное содержание исследуемых компонентов определяли на автоматическом анализаторе аминокислот ААА-881 (ЧССР). Содержание гомокарнозина определяли методом электрофореза на бумаге, как описано Ен Рюлом и Эмирбековым [5].

Таблица 1

Содержание нейромедиаторных аминокислот (мкмоль/г свежей ткани) и дипептидов (нмоль/г свежей ткани) в больших полушариях головного мозга крыс при гипотермии с температурой 19—20° (n=7—10)

Компоненты	Контроль (нормотермия)	55—60-минут- ная гипотермия	2-часовая гипотермия
Глутамат	9,14±0,39	10,67±0,44*	7,23±0,64*
Аспартат	3,21±0,25	2,23±0,35*	3,28±0,14
ГАМК	2,54±0,17	1,82±0,14*	2,97±0,16
Таурин	4,21±0,20	5,10±0,21*	5,48±0,21*
Цистатионин	142±14	130±17	124±19*
Гомокарнозин	22,40±0,63	19,3±0,5*	13,40±0,45*

Примечание. Здесь и в табл. 2 * $p < 0,05$ — достоверные различия по сравнению с контролем.

Проведенные эксперименты показали (табл. 1), что принудительное охлаждение крыс до температуры тела 19—20° приводит к значительному изменению содержания исследуемых нейромедиаторных аминокислот и нейропептидов. Так, количество глутаминовой кислоты в больших полушариях мозга при 55—60-минутной гипотермии увеличилось на 16,7%, а при 2-часовой снижалось на 20,9% по сравнению с таковым у контрольных крыс. В то же время, сниженное (на 30,5%) содержание аспарагиновой кислоты при 55—60-минутной гипотермии после дальнейшего ее продолжения до 2 ч увеличивалось до контрольного уровня. По-разному влияет снижение температуры тела крыс и на содержание тормозных нейромедиаторных аминокислот — ГАМК и таурин. При кратковременной гипотермии с 19—20° содержание ГАМК в больших полушариях мозга снижалось на 28,3%, при длительной же — повышалось почти до уровня контроля. Содержание в мозгу таурина увеличивалось как при кратковременной (на 21,1%), так и продолжительной гипотермии (на 30,2%). Состояние «холодового наркоза»

Таблица 2

Содержание нейромедиаторных аминокислот и дипептидов в больших полушариях головного мозга сусликов (*Citellus pygmaeus* Pallas) при зимней спячке (n=6-8)

Длительность спячки	Аминокислоты, мкмоль/г свежей ткани				Дипептиды, нмоль/г свежей ткани	
	глутамат	аспартат	ГАМК	таурин	цистатионин	гомокарнозин
Контроль (бодрствование перед впадением в спячку)	9,95 $\pm$ 0,45	2,40 $\pm$ 0,15	2,17 $\pm$ 0,12	2,78 $\pm$ 0,21	152 $\pm$ 24	48,0 $\pm$ 1,0
1 день	8,34 $\pm$ 0,39*	1,41 $\pm$ 0,12*	2,83 $\pm$ 0,12*	4,53 $\pm$ 0,30*	218 $\pm$ 15*	51,1 $\pm$ 0,7*
7 дней	8,54 $\pm$ 0,41*	1,00 $\pm$ 0,09*	2,90 $\pm$ 0,14*	4,98 $\pm$ 0,27*	222 $\pm$ 26*	56,0 $\pm$ 1,6*
30 дней	8,42 $\pm$ 0,40*	1,15 $\pm$ 0,10*	2,87 $\pm$ 0,13*	4,70 $\pm$ 0,36*	221 $\pm$ 27*	56,0 $\pm$ 1,5*
90 дней	7,25 $\pm$ 0,36*	1,10 $\pm$ 0,08*	2,91 $\pm$ 0,16*	4,30 $\pm$ 0,28*	173 $\pm$ 16*	—
Бодрствование после выхода из спячки сразу	8,79 $\pm$ 0,37*	1,20 $\pm$ 0,09*	2,71 $\pm$ 0,17*	3,93 $\pm$ 0,17*	164 $\pm$ 22	47,8 $\pm$ 0,8
Через 3 дня	9,05 $\pm$ 0,41	2,00 $\pm$ 0,01	2,47 $\pm$ 0,18	3,43 $\pm$ 0,21*	145 $\pm$ 14	49,3 $\pm$ 0,9

крыс, вызванное гипотермией ($19-20^{\circ}$), сопровождалось снижением количества тормозных нейромедиаторных дипептидов—цистатинина и гомокарнозина в зависимости от длительности действия низкой температуры.

Анализ полученных данных показывает, что при глубокой гипотермии у крыс величина соотношения суммы нейромедиаторных возбуждающих (глутамат+аспартат) и тормозных (ГАМК+таурин) аминокислот изменялась от 1,9 (при кратковременной гипотермии) до 1,2.

Как видно из табл. 2, низкая температура тела при зимней спячке сопровождалась не такими сдвигами содержания исследуемых нейромедиаторных аминокислот и дипептидов, как при ее снижении путем принудительного охлаждения гомойотермного организма.

Так, при наступлении зимней спячки у сусликов содержание глутамата и аспартата в больших полушариях мозга снижалось соответственно на 16,2 и 41,2% и в течение 3 месяцев оставалось пониженным. При этом происходило устойчивое повышение количества как ГАМК, так и таурина. В отличие от искусственной гипотермии, в динамике зимней спячки соотношение глутамат+аспартат/ГАМК+таурин почти не изменялось и равнялось во все периоды спячки $\sim 1,2$. Коррелятивное изменение содержания нейромедиаторов у гетеротермов во время зимней спячки, в отличие от такового при гипотермии гомойотермов, видимо, объясняется тем, что принудительное охлаждение организма приводит к нарушению соотношения метаболического и медиаторного пулов исследованных аминокислот и дипептидов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при зимней спячке достоверно активна температурная регуляция синаптической, метаболической и модуляторной функции нейроактивных компонентов мозга.

Наши исследования [1] показали, что как при глубокой ($19-20^{\circ}$) гипотермии, так и при зимней спячке происходит снижение метаболизма белков. На примере глутаминазы мозга было показано, что при гипотермии модифицируются сами молекулы белков-ферментов, а при зимней спячке их активность регулируется под влиянием низкомолекулярных модуляторов.

При этих состояниях мы измеряли также пептидгидролазную активность белков мозга, степень их амидированности, субклеточное перераспределение и электрофоретическую подвижность. Обнаружено, что при глубокой гипотермии вследствие нарушения структуры мембран лизосом усиливался выход пептидгидролаз и соответственно повышался распад клеточных белков. Во время же зимней спячки, в отличие от принудительного охлаждения организма, в мозгу распадались в первую очередь «дефектные» молекулы белков. Ферментативное дезамидирование белков (за счет глутаминового остатка) в мозгу в динамике зимней спячки сусликов подвергалось определенной регуляции, а при гипотермии нарушалось.

NEUROTRANSMITTER AMINO ACIDS AND PEPTIDES AND PROTEIN METABOLISM DURING HYPOTHERMIA AND HIBERNATION

EMIRBEKOV E. Z.

V. I. Lenin Daghestan State University, Makhachkala, USSR

Hypothermia (19–20 °C) led to a decrease in aspartic acid and GABA and increase in glutamate and taurine content in the big cerebral hemispheres. When hypothermia continues for 2h the amount of aspartate and GABA rose to control level, glutamate content, on the contrary, reduced, and that of taurine remained increased. Deep hypothermia was accompanied by reduction of inhibitory neurotransmitter dipeptides, cistathionine and homocarnosine. Low body temperature during hibernation of caucasian small ground squirrels led to the shifts in neurotransmitter amino acids and dipeptides content studied different from those observed at forced cooling of homothermal organism. Unlike artificial hypothermia in the dynamics of hibernation the ratio of glutamate+aspartate/GABA+taurine almost did not change and equaled 1,2 at all periods of hibernation. Proteolysis and desamidation of proteins in brain during hibernation was subjected to certain regulation that failed during hypothermia.

ЛИТЕРАТУРА

1. Эмирбеков Э. З., Львова С. П. Механизмы биохимических изменений при низких температурах тела, Ростов-на-Дону, Изд-во РГУ, 1985.
2. II Всесоюз. конф. «Механизмы криповреждения и криозащиты биологических объектов», Харьков, Изд-во АН УССР, 1984.
3. Эмирбеков Э. З., Львова С. П., Абдуллаев Р. А. Успехи физиол. наук, т. 15, № 4, с. 85–99, 1984.
4. Штарк М. Б. Мозг зимне спящих, Новосибирск, Наука, 1970.
5. Ким Ен Рюл, Эмирбеков Э. Э. Укр. биохим. журн., т. 58, № 5, с. 72–75, 1986.

Поступила 10. IX 1986.



УДК 577.15+577.3+591.39

ВЛИЯНИЕ НЕЙРОСПЕЦИФИЧЕСКОГО БЕЛКА S-100 НА
АТРАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ МОЗГА

СИМОНЯН А. А., БОДЬЕ Ж., **ХАГЛИД К. Г.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

*Лаборатория физики Института фармацевтических наук, Страсбург, Франция

**Институт нейробиологии Гетеборгского университета, Швеция

Благодаря фундаментальным исследованиям, проведенным в лаборатории Н. Hyden, была обнаружена функциональная взаимосвязь между белком S-100, окислительным фосфорилированием и процессом трансмембранного переноса ряда ионов и аминокислот [1]. Было высказано предположение о возможном взаимодействии белка S-100 и Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы, которое нашло экспериментальное подтверждение [2].

Далее было обнаружено, что нейроспецифический белок S-100 повышает фосфорилирование определенной группы белков [3] и стимулирует активность АТФазы во фракции мембран ядер [4, 5] головного мозга.

Первоначально предполагалось, что белок S-100 является гомогенным, однако позднее выяснилось, что он состоит из двух компонентов, относящихся к Ca^{2+} -зависимым (S-100a) и Zn^{2+} -зависимым (S-100b) белкам [6—7]. Определение величины M_r в присутствии ДДС-На показало, что белок S-100b состоит из двух идентичных β -субъединиц, а белок S-100a из субъединиц α и β с M_r 10,5 кД каждая [6]. Таким образом, оба белка содержат β -субъединицу в качестве общего структурного компонента, хотя не исключены аминокислотные различия в структуре β -субъединицы из белков S-100a и S-100b. Первичная структура α -субъединицы гомологична таковой β -субъединицы, но характеризуется наличием единичного триптофана и цистеина [6]. Добавление Ca^{2+} изменяет конформацию белка S-100 [4, 5], при этом происходит образование дисульфидных мостиков между двумя из трех молекул цистеина, входящих в его состав [8].

С целью изучения роли нейроспецифических белков S-100a и S-100b в энергетическом метаболизме нервной ткани в данной работе было исследовано их влияние на АТРАЗНУЮ активность в различных

субклеточных фракциях (митохондрии, синапсомы, миелин) мозга монгольской песчанки.

Опыты проводили на самцах монгольских песчанок массой 100—120 г. Методы гомогенизации ткани мозга, выделения субклеточных фракций приведены в предыдущей работе [9]. Об активности АТРа́зы судили по нарастанию P_i в следующей инкубационной среде: Ca^{2+} —0,1—0,5 мМ, АТР—1,2 мг в пробу и субклеточные фракции, соответствующие 0,5—1,0 мг белка; объем смеси—1,0 мл. Время инкубации—30 мин при 37°. P_i определяли спектрофотометрическим методом Lowry, Lopez [10]. Полученные данные пересчитывали на мг белка, который определяли по Lowry и соавт. [11].

Белок S-100 был выделен и очищен из ткани мозга быка методом Moore [12] и Nika и соавт. [13, 14]. Белок S-100a получен по Isobe и соавт. [15] и Deinum и соавт. [16] с некоторыми модификациями Baudier и соавт. [17]. Белок S-100b получен Zn-зависимой аффинной хроматографией по Baudier и соавт. [18]. Чистоту антигенных препаратов контролировали электрофорезом в 20%-ном ПААГ с мочевиной и ДДС-Na [17].

Таблица 1

Влияние белков S-100a и S-100b на АТРа́зную активность (ΔP в мкатомах/мг белка) в субклеточных фракциях мозга монгольской песчанки

Условия опыта	Мозг						Печень
	митохондрии	% активации	синапсомы	% активации	миелин	% активации	митохондрии
Контроль	25,9 $\pm$ 2,1 (8)		39,5 $\pm$ 2,8 (8)		29,1 $\pm$ 4,2 (9)		13,8 $\pm$ 1,0 (8)
Белок S-100a	52,4 $\pm$ 4,6 (16) $p < 0,001$	102,5	43,1 $\pm$ 2,3 (12)	9,1	64,1 $\pm$ 6,9 (18) $p < 0,001$	120,4	13,7 $\pm$ 0,5 (16)
Белок S-100b	72,1 $\pm$ 7,6 (16) $p < 0,001$	178,4	46,0 $\pm$ 2,4 (12)	16,6	60,3 $\pm$ 3,4 (18) $p < 0,001$	107,2	14,4 $\pm$ 0,5 (16)

Примечание. Белок S-100a или белок S-100b добавляли в количестве $1,4 \cdot 10^{-6}$ М ($10 \mu\text{г/мл}$) на 0,5—1,0 мг белка. Здесь и в табл. 2 в скобках указано количество опытов.

Полученные результаты (табл. 1) показывают, что под влиянием белка S-100a активность АТРа́зы в митохондриях мозга повышается более чем в 2 раза. В присутствии такого же количества белка S-100b активность фермента составляет 178,4% по сравнению с контролем. Активирующее влияние белков S-100a и S-100b в синапсомной фракции АТРа́зы значительно менее выражено и составляет всего 9,1 и 16,6% соответственно. Заметный эффект активирования белком S-100 отмечался в отношении АТРа́зы миелиновой фракции мозга. В опытах с белком S-100a активирование составляло 120,4%; более чем вдвое повышалась активность фермента в присутствии добавленного белка S-100b.

Представляло интерес сравнительное изучение влияния нейроспецифического белка S-100 на активность АТРа́зы в изолированных мит-

хондриях печени монгольской песчанки. Данные, приведенные в табл. 1, показывают, что добавление белков S-100a или S-100b не вызывает сдвигов в активности фермента в митохондриях печени и не оказывает влияния на активность АТФазы митохондриальной фракции печени также при совместном добавлении с Ca^{2+} или Zn^{2+} (табл. 2). Это дает основание полагать, что активирование АТФазы в субклеточных образованиях мозга белками S-100a и S-100b является специфическим процессом, присущим только нервным клеткам.

Интересные результаты получены при использовании белков S-100a и S-100b в качестве активатора АТФазы в отдельных фракциях мозга с Ca^{2+} и Zn^{2+} соответственно. Как показывают результаты этих исследований (табл. 2), при совместном добавлении Ca^{2+} и белка S-100a активность АТФазы в митохондриях мозга монгольской песчанки повышается на 32,5% по сравнению с пробами, содержащими только Ca^{2+} . В этих же условиях активирование фермента в присутствии Zn^{2+} и белка S-100b составляет 12,8 и 11,9% (при концентрации цинка 0,5 и 0,1 мМ соответственно).

В синапсосомной фракции мозга по существу не отмечается активирования АТФазы при совместном добавлении соответствующих ионов и белка S-100a и S-100b.

Совместное добавление белка S-100a и S-100b и Ca^{2+} или Zn^{2+} достоверно повышает активность АТФазы в миелиновой фракции мозга. Так, активирование фермента в присутствии Ca^{2+} и S-100a составляет 29,0% по сравнению с Ca^{2+} . Активирование фермента белком S-100b в присутствии Zn^{2+} обратно пропорционально концентрации добавленного цинка: при добавлении 0,5 мМ Zn^{2+} оно составляет 35%, а в присутствии 0,1 мМ достигает 85%.

Таблица 2

Влияние белков S-100a и S-100b и двухвалентных катионов на АТФазную активность (ΔP в мкатомах/мг белка) в субклеточных фракциях мозга монгольской песчанки

Условия опыта	Мозг					Печень
	митохон- дрии	% акти- вации	синапсосомы	миелин	% акти- вации	митохон- дрии
Ca^{2+} 0,5 мМ	76,2±9,5 (16)		51,7±2,5 (12)	107,0±12,2 (18)		23,3±0,6 (16)
Ca^{2+} 0,5 мМ S-100a	101,0±7,9 (16) $p < 0,05$	32,5	53,3±2,7 (12)	138,1±8,6 (18) $p < 0,05$	29,0	23,9±0,9 (16)
Zn^{2+} 0,5 мМ	142,7±7,7 (16)		52,5±1,7 (8)	45,1±5,3 (18)		19,7±0,6 (16)
Zn^{2+} 0,5 мМ S-100b	161,0±8,3 (16)	12,8	55,8±1,9 (8)	128,4±13,2 (18) $p = 0,025$	35,0	19,5±1,0 (16)
Zn^{2+} 0,1 мМ	119,7±7,5 (16)		54,4±2,7 (8)	73,4±7,5 (16)		17,4±0,5 (16)
Zn^{2+} 0,1 мМ S-100b	134,0±9,7 (16) $p < 0,4$	11,9	58,3±2,8 (8)	135,8±23,3 (16) $p < 0,01$	85,0	18,4±0,6 (16)

Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что под влиянием белка S-100 заметно активируется катаболизм макроэргов головного мозга. Этот процесс интенсивно протекает в изолированных митохондриях и миелиновой фракции и гораздо менее заметно — в синапсосомах мозга.

Авторы выражают признательность д-ру А. Хамберггеру за советы и содействие при выполнении работы.

EFFECT OF S-100 PROTEIN ON THE ATPase ACTIVITY IN BRAIN

SIMONIAN A. A. *BAUDIER J. **HAGLID K. G.

Institute of Biochemistry, ArmSSR Acad. Sci., Yerevan

*Institute of Neurobiology, University of Goteborg, Sweden

**Laboratoire de Physique, ERA, UER des Sciences Pharmaceutiques,
Strasbourg, France

The effect of the purified components of S-100 protein—S-100a and S-100b—on the ATPase activity was examined in mitochondria, myeline and synaptosomes of the mongolian gerbils brain. S-100a protein significantly activates the Ca^{2+} -dependent ATPase in mitochondria and myeline; the same is the effect of S-100 on the activity of Zn^{2+} -dependent ATPase. Data obtained are discussed in view of the possible involvement of S-100 protein in nervous tissue bioenergetics.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hyden H.—In: Biological Psychiatry Today, p. 177—188, Amsterdam, Elsevier, 1979.
2. Подстаев А. В., Грудень М. А. Нейрохимия, т. 4, № 3, с. 245—253, 1985.
3. Тюленев В. И., Капралов А. А., Смерчинская Л. С., Белик Я. В. Биохимия, т. 48, № 5, с. 827—831, 1983.
4. Капралов А. А., Тюленев В. И., Назаренко В. И. Нейрохимия, т. 5, № 2, с. 219—220, 1986 (деп. в ВИНИТИ, № 3112—В86).
5. Капралов А. А., Тюленев В. И., Белик Я. В. Нейрохимия, т. 5, № 4, с. 365—370, 1986.
6. Isobe T., Ishioka N., Okuyama T. Eur. J. Biochem., v. 115, p. 469—474, 1981.
7. Isobe T., Okuyama T. J. Neurochem., v. 37, p. 522—524, 1981.
8. Палладин А. В., Смерчинская Л. С. Укр. биохим. журн., т. 41, № 5, с. 398—406, 1971.
9. Симонян А. А., Степанян Р. А., Восканян Л. О. Биол. журн. Армения, т. 31, № 11, с. 1181—1186, 1978.
10. Lowry O. H., Lopez J. A. J. Biol. Chem., v. 162, p. 421, 1946.
11. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Furr A. L., Randall R. J. Biol. Chem., v. 193, p. 265, 1951.
12. Moore B. W. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 19, p. 739—744, 1965.
13. Nika H., Haglid K. G., Wronsky A., Hansson H. A. J. Neurochem., v. 39, p. 601—612, 1982.

14. Niku H., Haglid K. G., Wronsky A., Hansson H. A.—In: *Proteins of the Biological Fluids*, Proceedings of the thirtieth colloquium, p. 33—42, N. Y., Pergamon Press, 1982.
15. Isobe T., Nakajima G., Okuyama T. *Biochim. et Biophys. acta*, v. 494, p. 222—231, 1977.
16. Deinum J., Baudier J., Briving C., Rosengren L., Wallin M., Gerard D., Haglid K. *FEBS Lett.*, v. 163, № 2, p. 287—291, 1983.
17. Baudier J., Mandel P. G., Gerard D. *J. Neurochem.*, v. 40, p. 145—152, 1983.
18. Baudier J., Holtzschner Ch., Gerard D. *FEBS Lett.*, v. 149, № 2, p. 231—234, 1982.

Поступила 15. VIII 1986.

Антидепрессанты и функция рецепторов. 123-й симпозиум фонда Ciba (пер. с англ.). J. Willey and Sons, 302 с., 1986.

Antidepressants and Receptor Function. Ciba Foundation Symposium 123 (Ed. by R. Portera and G. Bock). J. Willey and Sons Ltd., Baffins Lane, England, 302 p., 1986.

В книге представлены труды симпозиума по антидепрессантам и функции рецепторов (Лондон, 19—21 ноября 1985 г.). Описываются различные методы исследования связей между системами моноаминов, депрессией и применяемыми для ее лечения антидепрессантами. Обсуждаются новые данные о рецепторах и участках, по которым осуществляется захват моноаминов в мозгу и периферических тканях. Особое внимание уделено α - и β -адренорецепторам, участкам связывания [^3H]имипрамина и серотониновым рецепторам. Приводятся данные мониторинга аминометаболитов в спинномозговой жидкости и результатов изучения нейроэндокринных, физиологических и поведенческих реакций в ответ на введение фармакологических агентов, что служит источником информации о моноаминергических функциях у больных, страдающих депрессией, и у подопытных животных в ходе и после лечения антидепрессантами или электроконвульсивным шоком. Рассмотрено значение генетических факторов в степени доступности рецепторов при лечении депрессивных состояний, для чего использованы подходящие модели заболеваний на подопытных животных, например, обусловленное стрессом подавление поведенческих реакций у крыс или воздействие социальных стрессоров на макаку-резус. Книга предназначена для нейрофармакологов, психофармакологов и специалистов, изучающих поведенческие реакции.



УДК 612.822.1

ВЛИЯНИЕ ПИРАМЕМА НА МЕТАБОЛИЗМ ЯДЕРНЫХ БЕЛКОВ НЕЙРОНОВ И ГЛИОЦИТОВ НЕКОТОРЫХ СТРУКТУР ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫ В НОРМЕ И ПРИ ЛИШЕНИИ ПАРАДОКСАЛЬНОЙ ФАЗЫ СНА

КЛЕНИКОВА В. А., ГЛУЩЕНКО Т. С., ТЕНЧЕВА Ц.

Институт физиологии им. И. П. Павлова АН СССР, Ленинград

В последнее время в клинической и экспериментальной практике находят применение структурные аналоги и производные ГАМК различного строения. Один из таких аналогов—ноотропный препарат пирамема (международное название пирацетам), относящийся по последней классификации психотропных средств к атипичным психостимуляторам, влияет на функции ЦНС, действуя на разные звенья синаптической передачи нервного возбуждения, способствуя повышению устойчивости условных рефлексов, облегчению обучения и запоминания, удлинению периода бодрствования и уменьшая потребность в сне [1, 2]. В то же время известно, что избирательное лишение парадоксальной фазы сна (ПФС), по электрофизиологическим данным, приводит к увеличению возбудимости нейронов [3], вызывает амнезирующий эффект на долговременную память, на сохранение полученной информации [4].

По экспериментальным данным, пластические репаративные процессы в нейронах и нейроглии в течение сна тесно связаны прежде всего с метаболизмом РНК и белков [3]. Нарушение же цикла бодрствования—сон у крыс, в частности лишение их ПФС, приводило к сдвигам метаболизма РНК и белков в нейронах и глиоцитах стволовой части мозга [3, 5]. Было показано, что клеточные структуры дорзальной части шва (ДЯШ) имеют прямое отношение к организации сна [5]. При этом следует отметить, что с помощью анализа вызванной нейронной активности были выявлены связи этого ядра с зоной САз гиппокампа [6].

В системе *in vitro* пирамема повышал скорость включения меченых предшественников в РНК и белки в клеточные структуры коры больших полушарий [7]. Ранее было показано, что этот препарат при оральном введении увеличивает синтез ядерных РНК и белков в головном мозгу крыс *in vitro* [10].

В связи с вышеизложенным представляло интерес выяснить влияние пирамема на метаболизм белков разных отделов головного мозга на клеточном уровне в норме и в условиях лишения ПФС. Объектами исследования были ДЯШ, синее пятно (СП) и зона СА₃ гиппокампа.

Опыты были поставлены на взрослых крысах-самцах линии Wistar массой 180—200 г. Пирамем вводили по ранее апробированной схеме [7]. Исследовали 4 группы животных: 1) крысы, лишенные ПФС в течение 24 ч по методу Youvet; 2) крысы, которым орально вводили пирамем, растворенный в дистиллированной воде в дозе 100 мг/кг три раза в течение 24 ч; 3) контрольная группа крыс, которым вводили физиологический раствор в том же объеме, что и пирамем, и содержали в клетках в стандартных условиях; 4) крысы, получавшие пирамем по той же схеме, что и вторая группа, на фоне лишения ПФС в течение 24 ч. Для определения интенсивности белкового синтеза всем крысам за 1 ч до окончания эксперимента внутривенно вводили DL-³H-фенилаланин (У. А. 31.3 Ки/мМоль, В/О «Изотоп») в дозе 10 мКи/г. Головной мозг после быстрой декапитации фиксировали в охлажденной жидкости Карнуа и подвергали общепринятой гистологической обработке [15]. Каждая группа состояла из 4—5 животных. Методами количественной цитофотометрии и автордиографии в параллельных срезах исследованных отделов головного мозга определяли содержание суммарных белков и интенсивность включения метки в них в расчете на одно ядро нейрона и глиоцита. Детали использованных методов описаны ранее [10, 15]. Средние арифметические величины находили по данным фотометрии или подсчета зерен серебра от 60—100 клеток по 20—25 клеток от каждого животного. Весь цифровой материал обрабатывали статистически по непараметрическому критерию Розенбаума Q [11].

Полученные результаты представлены на рисунке. Введение пирамема по сравнению с контрольной группой животных приводило к активированию включения меченой аминокислоты в ядерные белки нейронов ДЯШ, но в глиоцитах ДЯШ достоверных изменений не обнаружено. В другом ядре ствола мозга—СП, так же как в зоне СА₃ гиппокампа, при введении пирамема в условиях наших экспериментов по сравнению с контролем достоверных изменений в интенсивности включения метки не выявлено. Количество белков увеличивалось в ядрах нейронов и глиоцитов ДЯШ и в глиоцитах СП.

24-часовое избирательное лишение ПФС по сравнению с контролем активировало белковый метаболизм мозга, что подтверждается данными по скорости включения метки в белки и по содержанию суммарных белков в ядрах нейронов и глиоцитов ДЯШ [9]. В зоне СА₃ гиппокампа отмечали повышение интенсивности включения меченой аминокислоты только в ядерные белки нейронов без каких-либо достоверных сдвигов в глиоцитах и клеточных структурах СП. Содержание суммарных белков в ядрах нейронов и глиоцитов зоны СА₃ гиппокампа и СП при этом не изменялось.

По сравнению с животными, находящимися в состоянии относительного физиологического покоя, введение пирамета крысам, подвергавшимся 24-часовому избирательному лишению ПФС, сопровождалось более значительным увеличением скорости включения меченой аминокислоты в ядерные белки нейронов ДЯШ без изменений в глиоцитах, при этом и содержание суммарных белков увеличивалось в нейронах ДЯШ. Анало-

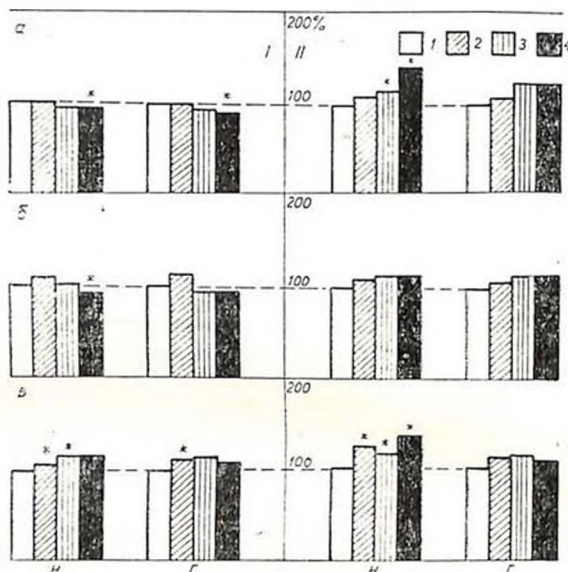


Рис. Влияние пирамета на содержание (I) и интенсивность включения $[^3\text{H}]$ фенилаланина (II) в ядерные белки нейронов (н) и глиоцитов (г) гиппокампа (а), синего пятна (б) и дорзального ядра шва (в) на фоне 24 ч лишения парадоксальной фазы сна. По оси ординат—изменения в % по отношению к контролю, принятому за 100%; 1—контроль, 2—пирамет, 3—лишение ПФС, 4—пирамет+лишение ПФС

гичное повышение интенсивности включения меченой аминокислоты отмечено в ядрах нейронов зоны СА₃ гиппокампа, но оно наблюдалось на фоне незначительного, но достоверного снижения содержания суммарных белков в ядрах нейронов и глиоцитов. В СП выявлено достоверное снижение содержания суммарных белков в ядрах нейронов без каких-либо изменений в глиоцитах; сдвиги интенсивности включения меченой аминокислоты отсутствовали. Выявленное снижение содержания суммарных ядерных белков в нейронах и глиоцитах гиппокампа и нейронах СП позволяет предполагать более высокую скорость распада белков по сравнению со скоростью их синтеза.

Таким образом, по полученным данным, в неодинаковых по своей морфофункциональной организации нейронах выявлен метаболический ответ на разные фазы сна и на нейрофармакологическое воздействие, что согласуется с данными литературы [3, 12].

Высокая реактивность ядра, его белковый синтез обеспечивает основное течение метаболических процессов всей клетки [13].

Причины функционально обусловленных изменений содержания нуклеиновых кислот и белков в нейронах неоднократно обсуждались [14]. Колебания уровня содержания макромолекул могут быть связаны с изменениями скорости их синтеза и распада, транспортом внутри клетки.

По данным Демина и соавт. [3, 14], при нарушениях сна происходит биохимическая модификация мембранных структур в ткани разных отделов головного мозга.

Таким образом, у контрольных животных пирамеом при использовании схемы введения активировал белковый метаболизм ДЯШ. Объяснить такое избирательное действие пирамема на данную структуру пока трудно, требуются дальнейшие экспериментальные исследования в динамике.

Изменения белкового метаболизма при 24-часовом избирательном лишении ПФС подтверждают данные, полученные ранее, и свидетельствуют о прямом участии ДЯШ в организации цикла бодрствование—сон и метаболической связи этого ядра с зоной СА₃ гиппокампа [5, 15].

Введение пирамема на фоне 24-часового лишения ПФС приводило к более значительному активизированию белкового метаболизма в ДЯШ и гиппокампе по сравнению с действием препарата на контрольных животных. Это указывает на различные метаболические эффекты пирамема на белковый метаболизм в разных структурах мозга и в различных физиологических условиях—нормы и депривации сна. Возможно, что уже в таких дозах пирамеом переводит всю НС на более высокий уровень функционирования [1], способствуя восстановлению метаболизма всего мозга, измененного нарушением нормального цикла бодрствование—сон.

EFFECTS OF PYRAMEM ON METABOLISM OF NUCLEAR PROTEINS OF THE NEURONS AND GLYOCYTES IN SOME BRAIN STRUCTURES OF NORMAL AND REM-SLEEP DEPRIVATED RATS

KLENIKOVA V. A., GLUSHCHENKO T. S., TENCHEVA Z.

I. P. Pavlov Institute of Physiology USSR Acad. Sci., Leningrad

By means of autoradiography and double wave-length cytophotometry it was revealed that pyramem activated protein metabolism only in n. raphe dorsalis (NRD)-neurons. The incorporation of labelled phenylalanine in the proteins and the content of the total protein were increased in the neuronal and glial nuclei of NRD in the case of 24 h sleep deprivation in comparison with the control rats. Administration

of pyramem to 24 h REM-sleep deprived rats led to more effective incorporation of the label into nuclear proteins of NRD-neurons without changes in the glial cells, content of the total protein was increased in NRD-neurons. The same increase of intensivity of incorporation of the label takes place in the hippocampal neurons nuclei. Factors that mediate the effect of pyramem on the neuronal membranes are discussed.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лаврская Э. Ф. Фармакологическая регуляция психических процессов (отв. ред. А. А. Пирузян), М., Наука, 1985.
2. Машковский М. Д., Ноцина Л. Ф., Полежаева Н. С., Арцунян Г. С., Зайцева К. А., Медведев Б. А. Хим.-фармацевт. журн., т. 11, № 8, с. 132—138, 1977.
3. Демин Н. Н., Козан А. Б., Моисеева Н. И. Нейрофизиология и нейрохимия сна, Л., Наука, 1978.
4. Fishbein W., Gutwein B. M. Behav. Biol., v. 19, № 4, p. 425—464, 1977.
5. Панов А. Н., Маликов У. М. Цитология, т. 23, № 12, с. 1381—1385, 1981.
6. Чиковани Т. А., Гловели Т. Б. Материалы II конф. молодых физиологов Закавказья, Ереван, с. 233—237, 1981.
7. Tuneva C., Tencheva Z. Science, v. 32, № 2, p. 261—264, 1979.
8. Tencheva Z., Tuneva C., Tyutyulkova N. Comp. rond. de l'Acad. Bulgdes Sci., v. 32, № 6, p. 817—820, 1979.
9. Кленикова В. А., Глуценко Т. С. Тезисы симпозиума «Функция нейроглии», Тбилиси, с. 70, 1984.
10. Грачева Н. Д. Авторадиография (отв. ред. А. Н. Жинкин), Л., Наука, 1968.
11. Sidak Z. Y., Vondrocek S. Applic. math., v. 2, № 3, p. 41—48, 1957.
12. Ротенберг В. С. Адаптивная функция сна, причины и проявление ее нарушения (отв. ред. М. Г. Айрапетянц), М., Наука, 1982.
13. Бродский В. Я. Трофика клетки (отв. ред. А. Н. Белозерский), М., Наука, 1966.
14. Демин Н. Н. Нейрохимия, т. 1, № 1, с. 20—27, 1982.
15. Кленикова В. А., Глуценко Т. С., Тенчева Ц. Физиол. журн. СССР, т. 68, № 1, с. 9—11, 1982.

Поступила 20. III 1987



УДК 612.017+577.158.2

СУПЕРОКСИДИСМУТАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ И УРОВЕНЬ
МАЛОНОВОГО ДИАЛЬДЕГИДА В МОЗГУ КРЫС
«СПОСОБНОЙ» И «НЕСПОСОБНОЙ» ЛИНИЙ ТРАЙОНА:
СВЯЗЬ С УСТОЙЧИВОСТЬЮ К СТРЕССУ

ГУЛЯЕВА Н. В., ХОНИЧЕВА Н. М., ОБИДИН А. Б.

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии АН СССР, Москва

Крысы линий Трайона, селектированные по признаку высокой („*maze-bright*“) и низкой („*maze-dull*“) обучаемости в Т-образном лабиринте [1], характеризуются соответственно слабым и сильным типом НС, а также низкой и высокой устойчивостью в стрессовых ситуациях, возникающих в период формирования иерархических отношений [2]. Изменения содержания глюкозы в крови животных при стрессе, вызванном введением адреналина, свидетельствуют о лучших мобилизационных способностях организма в этих условиях у крыс линии *dull* по сравнению с крысами линии *bright* [3]. Таким образом, длительный отбор крыс на высокую и низкую способность к обучению в лабиринте привел к появлению у них наследственно закрепленных физиологических и поведенческих различий, в частности в реакции крыс этих линий на стрессовые ситуации. В связи с этим крыс линии Трайона можно рассматривать как модель наследственной устойчивости (*dull*) и неустойчивости (*bright*) к стрессу.

Одним из важнейших звеньев повреждающего действия стресса на уровне мозга является активация свободнорадикального окисления, в частности перекисного окисления липидов [4]. Существенную роль в регуляции уровня перекисного окисления в настоящее время отводят ферменту антирадикальной защиты организма супероксиддисмутазе (СОД), (К. Ф. 1.15.1.1), осуществляющей дисмутацию супероксидного анион-радикала [5]. В настоящей работе исследован уровень перекисного окисления липидов и СОД-активность в мозгу крыс линии Трайона. Полученные данные сопоставлены с показателями поведения этих животных в стрессовых ситуациях.

В работе использовали 14 крыс-самцов линии *dull* и 12 крыс-самцов линии *bright*. В качестве контроля дополнительно исследовали 15 белых

беспородных крыс-самцов в возрасте 3-х месяцев. После исследования поведения животных декапитировали, извлекали и быстро охлаждали мозг, гомогенизировали кору больших полушарий и в супернатанте определяли уровень малонового диальдегида в реакции с тиобарбитуровой кислотой [6], а также СОД-активность по торможению реакции ауто-окисления адреналина [7] и в системе NADH-феназин-м-сульфат с нитросиним тетразолиевым [8] (во всех случаях при исследовании СОД-активности по обеим методикам были получены сходные результаты).

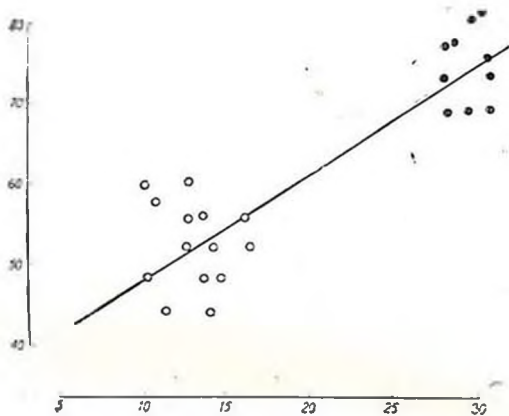


Рис. Содержание малонового диальдегида и СОД-активность в мозге крыс *dull* (○) и *bright* (●). По оси абсцисс—содержание малонового диальдегида (нмоль/г сырого веса мозга), по оси ординат—СОД-активность (ед/г сырого веса мозга)

При исследовании поведения крыс по методике «эмоционально-резонанса» [9] у крыс линии *bright* преобладала реакция предпочтения закрытого пространства (тип избегания сигналов болевого раздражения партнера), а у крыс *dull* преобладал тип беспокойного поведения. В тесте «открытое поле» у крыс *bright* наблюдали низкую двигательную активность и значительную дефекацию, а у крыс *dull* высокую двигательную активность при низком уровне дефекации. Таким образом, в стрессовых ситуациях крысы *bright* характеризуются более низкой поведенческой стрессоустойчивостью, что соответствует данным литературы [2, 3].

СОД-активность в мозгу крыс *bright* была в 1,5 раза выше, а уровень малонового диальдегида в 2 раза выше (различия достоверны при $p < 0,001$), чем у крыс *dull* (у последних значения изученных параметров совпадали с таковыми для белых беспородных крыс). Обнаружена корреляция ($r = 0,74$) СОД-активности и уровня малонового диальдегида в мозгу крыс *bright* и *dull* (см. рисунок).

Полученные данные свидетельствуют о том, что неустойчивость к стрессу у крыс *bright* сопровождается повышенным уровнем малонового диальдегида в мозгу. Известно, что уровень материала, реагирующего с тиобарбитуровой кислотой, свидетельствует не о содержании «предобразованного» малонового диальдегида в ткани, то есть не отражает его уровень *in vivo* [10], но может быть интерпретирован как интегративный показатель, отражающий способность липидов подвергаться перекисному окислению (в частности, при индукции свободнорадикального окисления в условиях инкубации образца с тиобарбитуровой кислотой при нагревании в кислой среде). Повышенная чувствительность липидов мозга крыс *bright* к перекисному окислению может быть обусловлена дефицитом эндогенных антиоксидантов и/или аномальным составом мембранных фосфолипидов (повышением доли легкоокисляемых липидов).

Выявленная нами корреляция уровня малонового диальдегида и СОД-активности позволяет выдвинуть предположение о тесной связи этих показателей. В работах Симоняна и соавт. [11—13] убедительно продемонстрирована ферментативная генерация супероксида медьсодержащей СОД в восстановленном состоянии, то есть возможность «обращения» действия СОД. Особого внимания заслуживает тот факт, что генерация супероксидного анион-радикала происходит в присутствии высоких концентраций перекисей [12]. Высказывается также предположение о том, что супероксид-анион не восстанавливает медь в активном центре СОД, но образует стабильный комплекс с медью, обладающий свойствами сильного окислителя [14]. В этом случае СОД работает как окислительный фермент, использующий супероксид в качестве кофактора и способный оказывать селективное повреждающее действие на компоненты живой клетки. Данные работ [11—14] позволяют предположить, что в определенных (главным образом, патологических) состояниях действие СОД в организме может иметь не «антиоксидантную», а «прооксидантную» направленность. Возможно, что именно этот феномен лежит в основе наблюдаемого у крыс *bright* высокого содержания малонового диальдегида в мозгу при повышенной СОД-активности.

SUPEROXIDE DISMUTASE ACTIVITY AND LEVEL OF MALONDIALDEHYDE IN THE BRAIN OF „MAZE-BRIGHT“ AND „MAZE-DULL“ TRYON STRAINS OF RATS: RELATIONSHIP WITH THE RESISTENCE TO STRESS

GULYAEVA N. V., KHECHISHEVA N. M., OBIDIN A. B.

Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, USSR
Acad. Sci., Moscow

Differences in behavioral patterns of able („maze-bright“) and disable („maze-dull“) Tryon strains of rats have been demonstrated indicating higher resistance of dull rats to stress situations. Levels of superoxide dismutase activity and of thiobarbituric acid-reactive mate-

rial were much higher in brains of «bright» rats. A positive correlation existed between superoxide dismutase activity and α -malondialdehyde content. A possible «prooxidant» role of superoxide dismutase in certain pathological condition is discussed.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tryon R. C. J. Comp. Psychol., v. 32, p. 407—412, 1941.
2. Дмитриева И. А., Крушинская Н. А., Семехина Е. Н.—В сб.: «Грызуны» (Материалы VI Всесоюзн. совещания), с. 257. А., Наука, 1984.
3. Золотарева Н. Н., Дмитриева И. А., Крушинская Н. А.—В сб.: Материалы IV Всесоюзн. съезда териологического общества, т. 3, с. 261, М., 1986.
4. Месерсон Ф. Э. Адаптация, стресс, профилактика, М., Наука, 1981.
5. Fridovich I.—In: Oxygen and living processes. An interdisciplinary approach. (ed. Gilbert D. L.), p. 250—275. New York. Springer Verlag, et al., 1981.
6. Ohkawa H., Ohishi N., Kunio J. Analyt. Biochem., v. 95, p. 351—353, 1979.
7. Misra H. P., Fridovich I. J. Biochem., v. 247, p. 3170—3175, 1972.
8. Nishikimi N., Rao N. A., Yagi K. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 46, p. 849—853, 1972.
9. Симонов П. В.—В сб.: Нейрофизиологический подход к анализу внутривидового поведения, с. 6—18, М., Наука, 1976.
10. Костюк В. А., Потапович А. Н.—В сб.: Кислородные радикалы в химии и биологии, Минск, с. 49—53, Наука и техника, 1984.
11. Symonjan M. A., Nalbandyan R. M. Biochim. et biophys. acta, v. 533, p. 279—286, 1979.
12. Симонян М. А. Биохимия, т. 49, с. 1792—1798, 1984.
13. Symonjan M. A., Nalbandyan R. M. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 71, p. 1131—1138, 1976.
14. Osman R., Basch H.—In: Oxy Radicals and Their Scavenger Systems (eds. Cohen G., Greenwald R. A.), v. 1, p. 187—192, Amsterdam. Elsevier Publishing Co, Inc., 1983.

Поступила 17. VIII 1986



МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

УДК 578.087.9

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТА НАТРИЯ ДЛЯ СОЛЮБИЛИЗАЦИИ ПЕРЕЖИВАЮЩИХ СРЕЗОВ МОЗГА

БУДАНЦЕВ А. Ю.

Институт биологической физики АН СССР, Пушкино

Солюбилизация переживающих срезов мозга в 0,5%-ном растворе ДДС-На (4 ч, 50—60°) дает возможность в параллельных аликвотах одновременно определять белок по Lowry, уровень радиоактивности с диоксановым сцинтиллятором и осуществлять электрофоретическое разделение белков в ПААГ.

Для изучения различных физико-химических процессов в нервных клетках (высвобождение и захват нейротрансмиттеров, фармакологические исследования синаптической передачи, метаболические процессы в нервных клетках и т. д.) широко используется метод переживающих срезов мозга. Подавляющее большинство работ с применением этого метода выполнено с различными физиологически активными соединениями, мечеными изотопами. Один из важных этапов работы с переживающими срезами заключается в экстракции из срезов изучаемых соединений. Для этой цели используются специальные экстрагирующие растворы или солюбилизация срезов. В последнем случае проводится, например, кипячение в щелочах [1] или растворение срезов в фирменных солюбилизаторах [2—6].

В настоящей работе описан способ солюбилизации переживающих срезов ткани в ДДС-На, позволяющий в отличие от известных методов в параллельных аликвотах солюбилизата срезов определять белок по Lowry [7], проводить счет радиоактивности с диоксановым сцинтиллятором и электрофоретическое исследование тканевых белков в ПААГ.

Материалы и методы

Изготовление срезов. В опытах использовали крыс-самцов линии «Wistar», массой 150—200 г. Срезы размером 5×5 мм и толщиной 350 мкм изготавливали на микротоме МНТ-84 [8], затем из них специальным пробойником в области головки хвостатого ядра вырезали цилиндры диаметром 2 мм (масса одного среза около 1,5 мг). Все ма-

инкуляции со срезами проводили в среде следующего состава (в mM): NaCl—120; KCl—3,0; NaH_2PO_4 —1,2; MgSO_4 —1,2; CaCl_2 —2,6; NaHCO_3 —25; глюкоза—10. Среду предварительно насыщали смесью $\text{CO}_2:\text{O}_2$ в соотношении 5%: 95% до pH 7,4 [9]. После пренинкуляции в указанном растворе (15 мин) срезы помещали в эту же среду, содержащую в конечном объеме (0,5 мл) следующую смесь: ГАМК (10^{-5} М) + $[^3\text{H}]$ ГАМК (10^{-8} М). Пренинкуляцию и инкуляцию (15 мин) проводили при 37°. После инкуляции срезы промывали холодным (4°) 0,9%-ным NaCl, переносили в сосуды, содержащие 2 мл 0,5%-ного раствора ДДС-Na на бидистиллированной воде и помещали в термостат (+50°) на 4—6 ч. После охлаждения раствора солиобилизованных срезов отбирались аликвоты на счет радиоактивности, для определения белка по Lowry и электрофорез.

Экстракцию $[^3\text{H}]$ ГАМК из срезов проводили согласно методу Balcom и соавт. [10] с небольшими модификациями. Срезы (масса ткани 10 мг) после пренинкуляции и инкуляции с $[^3\text{H}]$ ГАМК, как указано выше, гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком в 1 мл 80%-ного этанола, охлажденного в течение 1—1,5 мин, центрифугировали при 3000g, 4°, 10 мин. Супернатант (S_1) сливали, осадок ресуспендировали в 1 мл 75%-ного этанола, охлажденного также до температуры льда, и повторно центрифугировали. Супернатант (S_2) сливали. Аликвоты из S_1 и S_2 объемом 0,5 мл добавляли к 5 мл смеси Брея. Контрольные срезы солиобилизовали после заката $[^3\text{H}]$ ГАМК в 0,5%-ном ДДС-Na.

Счет радиоактивности. 0,5 мл солиобилизата срезов в 0,5%-ном ДДС-Na переносили в сцинтилляционный пузырек с 5 мл диоксанового сцинтиллятора (раствор Брея).

В одной серии опытов по 0,025 мл водного раствора $[^3\text{H}]$ ГАМК ($3 \cdot 10^{-8}$ — $6 \cdot 10^{-12}$ ммоль, 15—0,003 мкКи) помещали в сцинтилляционные пузырьки, добавляли по 0,5 мл 0,5%-ного раствора ДДС-Na на бидистиллированной воде или диметилсульфоксиде. В ряде опытов к указанному водному раствору $[^3\text{H}]$ ГАМК в 0,5%-ном растворе ДДС-Na добавляли разные количества бычьего сывороточного альбумина (30, 100, 300 мкг) до измерения радиоактивности. Во всех случаях в сцинтилляционные пузырьки добавляли раствор Брея (соотношение по объему с исследуемыми растворами 10:1), счет радиоактивности проводили на жидкостном счетчике «Intertechnique SL-30» (Франция).

Определение белка проводили по методу Lowry и соавт. [7]. Стандартные растворы бычьего сывороточного альбумина (БСА) готовили на бидистиллированной воде или 0,5%-ном растворе ДДС-Na.

Электрофорез в ПААГ. Подготовку солиобилизата срезов мозга проводили в двух вариантах: а) после гомогенизации в стеклянном гомогенизаторе срезы мозга (общая масса—10 мг) солиобилизовали в ДДС-Na в присутствии меркаптоэтанола с кипячением при 100° в течение 3 мин согласно методу Laemmli [11]; б) срезы мозга без гомогенизации солиобилизовали в 1 мл 0,5%-ного ДДС-Na в течение

4—6 ч при 50°. Пробы солюбилизата объемом 30—60 мкл (20—50 мкг белка) наносили в концентрирующий гель длиной 20 мм и проводили электрофорез в ПААГ как описано Laemmli [11]. Электрофореграммы денситометрировали на микроденситометре «Jouze-Loebl» Mark III (Англия).

Реактивы: ДДС-На («Serva», ФРГ), БСА («Sigma», США), [³H] ГАМК («Amersham», Англия), ГАМК («Serva», ФРГ), РРО, РОРОР, нафталин, диоксан для сцинтилляторов («Реахим», СССР), реактивы для ПААГ («Reanal», Венгрия), Кумасси R-250 («Serva», ФРГ).

Результаты и обсуждение

Влияние ДДС-На на счет радиоактивности. Величина счета радиоактивности линейно зависела от концентрации [³H]ГАМК в присутствии 0.5%-ного раствора ДДС-На в пределах 10²—10⁵ имп/мин (рис. 1). Присутствие в растворе [³H]ГАМК в 0.5%-ном ДДС-На 30, 100 или 300 мкг БСА существенно не влияло на абсолютные значения величины счета радиоактивности и соответственно на линейность зависимости счета от концентрации [³H]ГАМК. В специальной серии измерений фонового счета раствора Брея с добавлением 0.5%-ного ДДС-На или раствора солюбилизированных срезов в 0.5%-ном водном растворе ДДС-На (10:1 по объему) показано, что хемилюминесценция отсутствует. Увеличение концентрации ДДС-На от 1 до 4% значительно усиливало тушение сцинтилляции и соответственно уменьшало величину счета радиоактивности (на 20—25%). Раствор ДДС-На в диметилсульфоксиде значительно уменьшал величину счета радиоактивности (на 50%).

Нам не известны данные об использовании ДДС-На для солюбилизации переживающих срезов ткани и влиянии ДДС-На на счет радиоактивности в солюбилизатах с использованием раствора Брея, хотя описана солюбилизация синапсом в 1%-ном ДДС-На (10 мин. при 60°) после захвата синапсом [14C] глутамата и [14C] аспартата и последующего счета радиоактивности [12]. Добавление неионного детергента—третона X-100 в толуольный сцинтиллятор, наряду с улучшением ряда параметров сцинтилляционной смеси («Тригезол»), приводило к небольшому снижению эффективности счета радиоактивности [13].

Анализ счета радиоактивности при экстракции [³H]ГАМК из срезов этанолом, когда, согласно Valcom и соавт. [10], происходит 100%-ная экстракция с солюбилизацией срезов в ДДС-На, показал хорошо сравнимые результаты (экстракция этанолом, S₁+S₂ (срм): 16236±745; солюбилизация в ДДС-На 14369±871, n=7, разница не достоверна по критерию Стюдента). Таким образом, солюбилизация срезов в 0.5%-ном растворе ДДС-На является эффективным способом экстракции радиоактивных соединений из срезов, в частности свободных аминокислот.

Влияние ДДС-Na на измерение белка по методу Lowry. Зависимость оптической плотности растворов белка, обработанных по методу Lowry в присутствии и в отсутствие ДДС-Na, является линейной в пределах 20—100 мкг белка. Абсолютная величина оптической плотно-

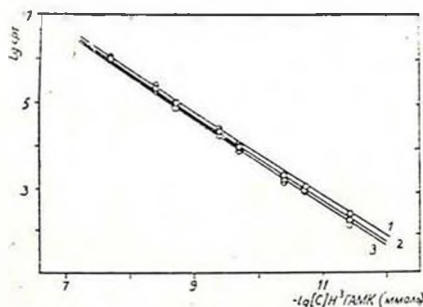


Рис. 1. Зависимость счета радиоактивности (срп) от концентрации ГАМК: 1 — $[^3\text{H}]$ ГАМК + 0,5%-ный ДДС-Na; 2 — $[^3\text{H}]$ ГАМК + 0,5%-ный ДДС-Na + 30 мкл БСА. 3 — контроль — водный раствор $[^3\text{H}]$ ГАМК. Величина ошибки средней составляет около 1% ($n=5$)

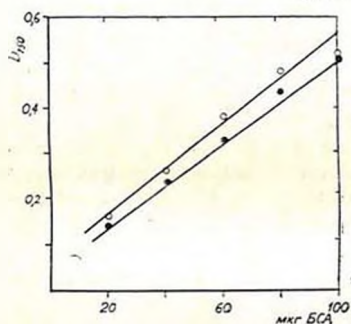


Рис. 2. Зависимость оптической плотности (D_{750}) при определении белка (БСА) методом Lowry в присутствии 0,5%-ного ДДС-Na (O) и в контроле (●). Величина ошибки средней составляет около 1% ($n=5$)

сти продукта реакции белка с реактивом Фолина в присутствии 0,5%-ного ДДС-Na выше, чем в стандартном методе Lowry (рис. 2).

В работе Lees, Rahman [14] описана модификация метода Lowry с использованием растворения белков в 5%-ном растворе ДДС-Na на 0,5 н. NaOH и показано, что линейность определения белка сохраняется в пределах 40—80 мкг. Отмечено, что при этом можно определять не только белки, но и протеолипиды [15].

В ряде работ проводилось изучение влияния разных детергентов на определение белков по методу Lowry. Например, в работе Wang, Smith [16] показано, что для определения белка по методу Lowry в присутствии тритона X-100, необходимо введение 10%-ного раствора ДДС-Na, который предотвращает выпадение осадка в процессе определения белка. Линейность определения белка (бычий сывороточный альбумин) сохранялась в пределах 40—120 мкг. Аналогичные данные приведены в работе Dulley, Grieve [17]. Обзор модификаций метода Lowry, в частности с использованием ДДС-Na, дан в работе Peterson [18].

При измерении белка с красителем амидо-черным в разбавленных

растворах (для определения в растворах низкой концентрации белка—0,75 мкг/мл) ДДС-Na в концентрациях от 0,2 до 1% также не влиял на определение белка [19].

Электрофорез в ПААГ солюбилизированных в ДДС-Na срезов ткани мозга. На рис. 3 приведены денситограммы белков солюбилизированных срезов ткани, разделенных электрофорезом в ПААГ. Коли-

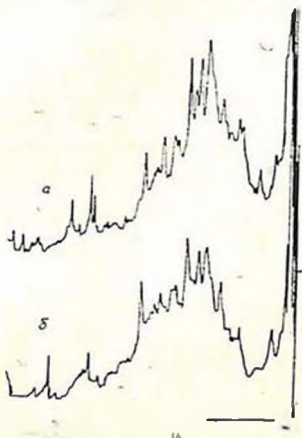


Рис. 3. Денситограммы белков переживающих срезов после электрофореза в ПААГ: а—солюбилизация в ДДС-Na по методу Laemmli; б—солюбилизация срезов в 0,5%-ном ДДС-Na

чество белковых полос при солюбилизации только в 0,5%-ном растворе ДДС-Na (рис. 3, б) меньше, чем в случае дополнительного использования меркаптоэтанола и кипячения при 100°. Это объясняется тем, что ДДС-Na приводит к диссоциации не всех белков [20], и поэтому дополнительная обработка сульфгидрильными препаратами и кипячение приводят к более полному выявлению белков в ПААГ. В связи с этим целесообразно в аликвоту раствора солюбилизированных срезов вносить реактивы, способные к более полной диссоциации белков например, как в методе Laemmli [11] или методе Weber и соавт. [21].

Таким образом, растворение переживающих срезов в 0,5%-ном растворе ДДС-Na имеет несомненное преимущество по сравнению с другими солюбилизаторами в том, что позволяет одновременно, в параллельных аликвотах определять белок по Lowry, проводить изотопный анализ и электрофорез белков в ПААГ.

SOLUBILIZATION OF BRAIN SLICES WITH SODIUM DODECYLSULPHATE

BUDANTSEV A. Yu.

Institute of Biological Physics, USSR Acad. Sci., Poustchino,
Moscow Region

Solubilization of brain slices with sodium dodecylsulphate (0.5%, 4h, 50—60°) makes it possible to assay simultaneously the parallel aliquots for protein content (Lowry et al.), count of radioactivity and electrophoresis in PAG.

1. Schousboe A., Lisy V., Hertz L. *J. Neurochem.*, v. 26, p. 1023—1027, 1976.
2. Gold B. J., Kyle J. T. *Neurochem. Res.*, v. 6, p. 949—958, 1981.
3. Chan P. H., Fishman R. A., Lee J. L., Quinn S. C. *Neurochem. Res.*, v. 5, p. 629—640, 1980.
4. Starr M. S. *Neurochem. Int.*, v. 4, p. 233—240, 1982.
5. Ferris R.—In: *Liquid Scintillation, Science and Technology* (eds. Nonjaim A. A., Ediss C., Weibe L. J.), p. 309—312, New York, Academic Press, San-Francisco, London, 1976.
6. Остерман А. А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радионуклидными методами. М., Наука, 1983.
7. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265—275, 1951.
8. Буданцев А. Ю. Микротом МНТ-84—среды нативной ткани—прижизненные исследования на молекулярно-клеточном уровне. Информационный материал, Пушкино, 1985.
9. Birsel S., Szerb J. C. *Can J. Physiol. and Pharmacol.*, v. 58, p. 1158—1166, 1980.
10. Balcom G. J., Lenox R. H., Meyerhoff J. L. *J. Neurochem.*, v. 24, p. 609—613, 1975.
11. Luemmler U. K. *Nature*, v. 227, p. 680—685, 1970.
12. Sandoval M. E., Horsch P., Cotman C. W. *Brain Res.*, v. 142, p. 285—299, 1978.
13. Fricke U. *Anal. Biochem.*, v. 63, p. 555—558, 1975.
14. Lees M. B., Paxman S. *Anal. Biochem.*, v. 47, p. 184—192, 1972.
15. Murkwell M. A. K., Huss S. M., Bieber L. L., Tolbert N. C. *Anal. Biochem.*, v. 87, p. 206—210, 1978.
16. Wang C. S., Smith R. L. *Anal. Biochem.*, v. 63, p. 414—417, 1975.
17. Dulley J. R., Grieve P. A. *Anal. Biochem.*, v. 64, p. 135—141, 1975.
18. Peterson G. L. *Anal. Biochem.*, v. 100, p. 201—220, 1979.
19. Schaffner W., Weissmann C. *Anal. Biochem.*, v. 56, p. 502—514, 1973.
20. Дани М., Мэди Э.—В кн.: Биохимическое исследование мембран, М., Мир, 1979.
21. Weber K., Pringle J., Osborne M.—In: *Methods in Enzymology* (eds. Hirs C., Timasheff S.), p. 3—28, New York, Academic Press, 1972.

Поступила 20. IX 1986



ОБЗОРЫ

УДК 612.82.012:612.67

НЕЙРОПЕПТИДЫ ПРИ СТАРЕНИИ

БУРЧИНСКИЙ С. Г., ФРОЛЬКИС М. В.

НИИ геронтологии АМН СССР, Киев

Обобщены и проанализированы современные представления об особенностях нейропептидной регуляции при старении. Рассмотрены различные аспекты влияния нейропептидов на медиаторные системы мозга. Обсуждены возможные механизмы их модулирующего действия на отдельные звенья центральной нейрогуморальной регуляции в старости и роль в развитии возрастной патологии.

В настоящем обзоре рассматриваются исключительно важные для нейробиологии вопросы анализа путей и механизмов действия нейропептидов как медиаторов и модуляторов функций ЦНС при старении. Подобно тому, как открытие нейропептидов ознаменовало новый этап в познании центральных механизмов нейрогуморальной регуляции, выяснение роли этих веществ в процессах старения мозга и развития возрастной патологии может стать важным звеном в поиске путей и средств направленной коррекции функций ЦНС в старости.

Возрастная динамика содержания нейропептидов в различных отделах ЦНС

Наиболее изученными медиаторными пептидами в ЦНС в настоящее время можно считать эндогенные опиаты—энкефалины и эндорфины. Met- и Leu-энкефалины представляют собой пентапептиды, а выделенный позже β -эндорфин—полипептид, включающий в себя молекулу Met-энкефалина. Распределение опиатных пептидов в ЦНС имеет определенные закономерности. Так, областями мозга, наиболее богатыми энкефалинами, являются базальные ганглии и отделы лимбической системы и в меньшей степени гипоталамус, гипофиз и кора [1], причем во всех названных областях Met-энкефалин содержится в больших количествах, чем Leu-энкефалин. Основное содержание β -эндорфина приходится на гипофиз (среднюю долю) и гипоталамус [2]. Все эти данные указывают на участие эндогенных опиатов, помимо регуляции болевой чувствительности, также в контроле эмоциональных, поведенческих и

гормональных реакций. В дальнейшем группу окисидных пептидов дополнили другие типы эндорфинов (α -, γ -), динорфин, неоэндорфин и др. (из-за отсутствия данных об их возрастной динамике они не рассматриваются в настоящем обзоре).

Если принять во внимание то огромное количество фактического материала, который накоплен исследователями о содержании и функциях опиоидных пептидов в мозгу, возрастной аспект этой проблемы представлен более чем скромно. Но уже первые полученные данные весьма важны для изучения старения ЦНС. Большинство из имеющихся на сегодняшний день работ по этому вопросу посвящено сравнительному изучению содержания энкефалинов и эндорфинов в гипоталамусе и гипофизе. Общим итогом этих исследований является установление факта разнонаправленности изменений концентраций этих пептидов в данных регионах ЦНС. Содержание энкефалинов [3, 4] и β -эндорфина [5, 6] в гипоталамусе при старении снижается. Имеющиеся данные о неизменности [7] и повышении [8] содержания Met-энкефалина в гипоталамусе с возрастом получены при изучении целого гипоталамуса. В то же время анализ возрастной динамики содержания этого пептида в различных гипоталамических ядрах показал гетерогенность изменений концентраций Met-энкефалина [3], то есть ее снижение только в некоторых из них и неизменность в других ядрах. Подобное исследование для β -эндорфина показало снижение его содержания во всех ядрах гипоталамуса, кроме срединного возвышения [5].

В то же время в гипофизе содержание Met-энкефалина [4] и β -эндорфина [6, 7] значительно повышается в старости, что связывают с увеличением их биосинтеза [7]. Разнонаправленные изменения концентрации этих пептидов в системе гипоталамус—гипофиз свидетельствуют о наличии различных механизмов пептидной регуляции в ее разных частях, а также позволяют рассматривать гетерогенность возрастных изменений этих пептидов и возникновение дисбаланса между ними как важный фактор снижения в старости гормональной реакции на стресс [6].

Отмечено также снижение содержания β -эндорфина [4] в стриатуме, снижение содержания Met-энкефалина в коре и шейном и грудном отделах спинного мозга [9] и отсутствие изменений концентраций Met-энкефалина в коре, стволе мозга и гиппокампе [4].

Значительно менее изучена возрастная динамика других нейропептидов в ЦНС. Среди них привлекают внимание работы, посвященные такому пептиду, как субстанция Р. Первоначально ее функции сводили к участию в проведении болевой чувствительности, однако уже сейчас ясно, что этот нейропептид участвует в обеспечении различных функций в ЦНС и периферической НС, вегетативных реакциях и т. д. [10]. Наибольшие концентрации субстанции Р обнаружены в подкорковых ядрах, в том числе в черном веществе и бледном шаре, меньше—в гипоталамусе [11]. При старении отмечено снижение содержания этого пептида в подкорковых ядрах, особенно в бледном шаре, но не в коре.

таламусе и гипоталамусе у людей и отсутствие изменений у крыс, за исключением снижения содержания в гипоталамусе [3, 12, 13].

Мало работ, посвященных изменениям с возрастом других нейропептидов. Так, отмечено снижение содержания соматостатина в стриатуме и нейротензина в коре у старых крыс [13] и нейротензина в черном веществе наряду с отсутствием изменений в уровне соматостатина у людей [12, 13], а также нормальное содержание соматостатина, холецистокинина и нейротензина у людей [14].

Изменение регуляторной функции нейропептидов при старении

Несмотря на стремительный рост в последние годы числа исследований рецепторов пептидов в ЦНС, эта проблема в геронтологическом плане остается, по существу, неразработанной. Имеются лишь данные о возрастной динамике опиатных рецепторов. Однако именно благодаря этим работам стало возможным выяснение механизмов взаимосвязи эндогенных опиатов с другими медиаторными системами мозга, в основном катехоламинергическими [15].

Сейчас является общепризнанным тот факт, что как анальгетическое, так и вегетативное действие морфина и эндогенных опиатов реализуется через систему специфических опиатных рецепторов [16]. Связывание опиатов с рецепторами является стереоспецифическим и опосредуется через систему cAMP и cGMP с участием Ca^{2+} [16]. Распределение этих рецепторов в ЦНС тесно коррелирует с содержанием энкефалинов и эндорфинов, то есть наиболее богаты ими гипоталамус, гипофиз, лимбическая и стриопаллидарная системы и кора [17]. При этом обращает на себя внимание выраженная взаимосвязь как распределения опиатных рецепторов, так и содержания самих опиоидных пептидов с распределением дофаминергических нейронов и дофаминовых рецепторов [18]. В частности, в стриатуме опиатные рецепторы в значительной своей части локализованы пресинаптически на терминалях дофаминергических нейронов [19, 20]. Морфин и эндогенные опиаты, выступая в роли нейромодуляторов, оказывают ингибирующее действие на высвобождение дофамина из нейронов [19], вызывая при экзогенном введении симптомы дефицита дофамина в ЦНС—кататонию и ригидность. При дегенерации дофаминергических нейронов введением 6-гидроксидофамина значительно снижается число опиатных рецепторов и соответственно ослабевают фармакологические эффекты морфина и эндогенных опиатов [18]. Известно, что дофаминергическая система нейромедиации в наибольшей степени страдает при старении [21], вследствие чего значительно ослабевают дофаминергические влияния, что тесно связано с возрастными процессами дегенерации дофаминергических нейронов, особенно в подкорковых ядрах. Поэтому в данных условиях изучение динамики опиатных рецепторов представляет особый интерес как попытка установить степень сохранности модулирующего эффекта опиатов на первично повреждаемую медиаторную систему.

При старении одной из характерных особенностей опиатных рецепторов является разная их подверженность возрастным изменениям у самцов и самок. Так, у самцов крыс отмечено уменьшение количества мест связывания [^3H]дигидроморфина, но с повышением их сродства в стриатуме, то есть в области мозга, наиболее богатым дофамином [22]. Поскольку значительное количество рецепторов опиатов локализовано в подкорковых ядрах пресинаптически, то возможно, что сами по себе опиатные рецепторы у самцов не подвержены возрастным изменениям, а уменьшение их количества связано с первичными нарушениями и снижением числа дофаминергических нейронов, учитывая нормальную компенсаторную реакцию на ослабление медиаторных влияний—повышение сродства сохранившихся рецепторов у старых крыс. С этим предположением согласуются и данные о прямой корреляции связывания другого лиганда опиатных рецепторов—[^3H]эторфина у старых крыс-самцов с ослаблением их поведенческих реакций и ответа на стрессовые воздействия, опосредуемые через дофаминергические механизмы [22]. Косвенно это подтверждается исследованиями Chop, Lai и Kavaliers и соавт. [23, 24], в которых показано снижение анальгетического эффекта морфина у старых крыс-самцов, в значительной мере опосредованного через дофамин- и холинергические нейромедиаторные системы. Однако имеются и сведения о снижении количества опиатных рецепторов у самцов крыс при старении в лимбической системе и стриатуме без изменения их сродства [25], сочетающееся с повышением толерантности к действию морфина.

В то же время у самок снижено количество опиатных рецепторов в таламусе, среднем мозгу и коре, но не в стриатуме, причем более выражено, чем у самцов [26]. Также у самок крыс в старости отмечается наличие рецепторов со «средним» сродством [27], в отличие от молодых крыс, имеющих два типа опиатных рецепторов—высокого и низкого сродства к [^3H]дигидроморфину, то есть компенсаторного увеличения сродства у самок не наблюдается, что подтверждается также данными других авторов [28]. В данном процессе на роль дофаминергических механизмов указывает и то обстоятельство, что при дегенерации дофаминергических нейронов в первую очередь снижается количество именно опиатных рецепторов высокого сродства [29], что и имеет место при старении. Большая повреждаемость опиатных рецепторов у самок, возможно, объясняется изменениями гормональных функций, опосредованных через опиатные рецепторы и ослабленных при старении [30].

Во многом аналогичные результаты получены и при изучении связывания лигандов опиатных рецепторов в висцеральном ганглии двусторчатого моллюска *Mytilus edulis* при старении, в частности, обнаружено снижение числа рецепторов высокого сродства [31], что доказывает ослабление опиатной регуляции с возрастом не только у позвоночных, но и у беспозвоночных животных.

Для молекулярных механизмов рецептор-эффektorных реакций при действии пептидов на синаптическую мембрану при старении характер-

ным является снижение содержания кальмодулина у старых интактных крыс, а также, в отличие от молодых, уменьшение уровня гуанилатциклазы и активности Na^+ , K^+ -АТФазы в стриатуме под влиянием опиатов [32], однако значение этих факторов для реализации конечных физиологических эффектов опиоидных пептидов в стареющем мозгу остается пока неясным.

Помимо опиатных рецепторов, в возрастном плане представляют интерес и данные о рецептор-рецепторном взаимодействии в подкорковых ядрах дофамина и пептида холецистокинина, где последний выступает в роли нейромодулятора, оказывая, в отличие от опиатов, активирующее действие на дофаминергические нейроны [33]. Под влиянием холецистокинина у молодых крыс отмечается снижение количества и повышение сродства дофаминовых рецепторов стриатума, в то время как у старых животных наблюдается качественно иная реакция—увеличение числа рецепторов без изменения их сродства [34]. Этот факт рассматривается как один из возможных механизмов возрастных нарушений интегративной функции дофаминергических синапсов в ЦНС, хотя можно предположить компенсаторное увеличение под влиянием холецистокинина числа дофаминовых рецепторов стриатума в условиях сниженного их количества при старении [21].

Все вышеприведенные синаптические механизмы нарушения пептидной регуляции ЦНС в старости неизбежно приводят к изменению функций, опосредуемых этими веществами.

Одним из таких примеров может служить увеличение с возрастом порога болевой чувствительности, то есть снижение восприятия боли [35]. Казалось бы, этот факт входит в противоречие с данными о снижении количества опиатных рецепторов и уровней энкефалинов и эндорфинов в ЦНС. В то же время значительная роль в механизмах ноцицепции в настоящее время отводится такому пептиду как субстанция Р, реализующему свое влияние на проведение болевых импульсов через стимуляцию дофаминергических влияний в базальных ганглиях [36]. Выше уже упоминалось о снижении содержания этого пептида у людей с возрастом в различных подкорковых структурах [3, 12, 13]. Значимость этого снижения на синаптическом уровне доказывается тем, что при электрофизиологическом анализе Р-ергические нейроны у старых крыс вдвое чувствительнее к экзогенно введенной субстанции Р, то есть отмечается рецепторная гиперчувствительность нейрональной мембраны в ответ на дефицит медиатора в синаптической щели [37]. Ослабление Р-ергической нейромедиации в сочетании с угнетением дофаминергических влияний может явиться существенным фактором возрастного снижения восприятия боли. Значительное число функциональных нарушений в старости может быть связано с опиатными рецепторами. Известно, что наркотические анальгетики оказывают влияние на двигательную активность, причем у молодых животных эта реакция является двухфазной—сначала подавление, а затем активация двигательных реакций [38]. В старости же отмечается только стимуляция этих реакций,

однако значительно менее выраженная, чем у молодых крыс [38], что, очевидно, связано как с уменьшением числа опиатных рецепторов в подкорковых ядрах, так и с изменениями функциональных взаимосвязей нейромедиаторных систем в этом регионе ЦНС. В итоге можно предположить значимость ослабления опиатной регуляции в возрастных нарушениях двигательной активности.

При старении извращаются также терморегуляторные эффекты опиатов. У старых крыс наблюдается более выраженная толерантность к развитию гипотермического эффекта при применении больших доз морфина, что связывают с нарушением синаптических механизмов центральной терморегуляции [39]. В то же время при использовании малых доз морфина [39] или экзогенно введенного β -эндорфина [40] у старых крыс отмечена более выраженная гипотермическая реакция, возможно, связанная с нарушением межцентральных взаимоотношений терморегуляторных центров гипоталамуса, опосредуемых опиоидными пептидами.

В старости ослабляется также пищевое поведение, регулирующееся опиатной системой, поскольку агонисты опиатов активируют его, а налуксон тормозит [41]. Авторы отмечают важную роль в механизмах возрастных изменений пищевых реакций снижения количества опиатных рецепторов, опосредующих данную функцию.

Приведенные примеры иллюстрируют, что в результате изменения синаптических механизмов пептидной регуляции в ЦНС при старении нарушаются самые разнообразные физиологические реакции в организме. Однако нейропептиды играют и еще одну важнейшую роль—они обеспечивают механизмы памяти, в значительной степени определяющие старение ЦНС.

Нейропептиды и механизмы памяти при старении

В настоящее время достаточно убедительно показано влияние различных нейропептидов на механизмы нейрональной пластичности, определяющей процессы обучения и памяти [42—44]. Этими свойствами обладают вазопрессин, АКТГ и опиоидные пептиды [42], причем влиянием на интегративную функцию мозга обладает виегипофизарный пул этих пептидов, не имеющих отношения к их гормональным влияниям, а действующий именно как модулятор памяти и обучения, как составная часть их естественных механизмов. Действие вазопрессина на память, очевидно, не является специфическим и связано, с одной стороны, с общестимулирующим действием метаболического типа, сходного с ноотропными средствами, а с другой стороны—с влиянием на катехоламины и серотонинергические нейромедиаторные системы [43]. Содержание вазопрессина уменьшается при старении в гипоталамусе [45, 46] и не изменяется в гипофизе [45], что связывают с нарушением процессов биосинтеза вазопрессина при полноценности его депонирования в гипофизе. С этой точки зрения представляют определенный интерес попытки исполь-

зования этого пептида для коррекции процессов обучения и памяти в старости. Необходимо отметить, что результаты этих исследований на животных представляются гораздо более оптимистичными, чем в клинической практике, что связывают с трудностью учета сопутствующей возрастной патологии у людей и возможными межвидовыми различиями в концентрации и механизмах действия этого нейропептида. В целом, экзогенно вводимый вазопрессин оказывал менее выраженное в человеческом организме и более выраженное у животных положительное влияние на ослабленные при старении механизмы памяти [44, 47]. При этом вазопрессин оказывался эффективным прежде всего на тестах, требующих смысловой переработки информации, а не механического запоминания, а также при выработке условных рефлексов [48].

Пока еще невозможно утверждать, что дефицит вазопрессина в ЦНС непосредственно ответствен за нарушения памяти при старении. Несомненно, что не меньшую роль здесь играют возрастные изменения и в других медиаторных системах, особенно катехол- и холинергических. Однако важным представляется вывод о том, что эффективность вазопрессина как корректора процессов обучения и памяти связана не с диффузной активацией катехоламинных рецепторов в ЦНС, а только тех из них, которые обеспечивают данную функцию мозга [48].

Что касается действия остальных пептидов как регуляторов высшей нервной деятельности в возрастном аспекте, то такие данные крайне немногочисленны. Данные об эффективности фрагментов АКГГ на процессы обучения в старости [44, 49] носят эмпирический характер, так как практически отсутствуют исследования динамики и особенностей регуляции негормональной фракции АКГГ при старении. Влияние энкефалинов и эндорфинов на обучение и память в настоящее время представляется достаточно спорным—показано как активирующее, так и угнетающее их действие на эти процессы [50], что, вероятно, зависит от их влияния на различные медиаторные системы, дозы и продолжительности курсового введения. Однако использование антагониста опиатов—наллоксона как фактора регуляции старческих нарушений памяти у людей показало его высокую эффективность [51], что, возможно, связано с активацией дофамин- и адренергических систем мозга вследствие устранения ингибирующего влияния опиатов. Очевидно, этот путь стимуляции ослабленных при старении медиаторных процессов следует признать достаточно перспективным.

Нейропептиды в регуляции функции сердечно-сосудистой системы в старости

При старении наступают существенные изменения нейрогуморальной регуляции сердечно-сосудистой системы. Это приводит к изменению характера реакций системы кровообращения—увеличивается их латентный период, реакции приобретают волнообразный, застойный характер, нередко возникает застойный ответ на действие раздражителя [52].

Стрессовые ситуации нередко ведут к срыву регуляции функций кровообращения, становясь основой развития патологии. В механизме изменений реакций сердечно-сосудистой системы при старении большое значение уделяется сдвигам в центральном звене регуляции функций [53]. Важными при этом представляются изменения в системе нейропептидов. Выше уже упоминалось о гетерогенности возрастных изменений динамики опиатов в различных структурах мозга, в частности—в гипоталамусе [3]. С этим коррелируют данные о неравномерном изменении гемодинамически активных структур гипоталамуса в старости—возбудимость одних из них растет, других—падает, третьих—не изменяется [61]. Можно полагать, что одним из нейрохимических механизмов этих сдвигов является неравномерное изменение обмена нейропептидов. Разнонаправленные изменения возбудимости разных структур гемодинамического центра могут приводить к срыву регуляции функции кровообращения в старости.

С помощью иммуногистохимических и автордиографических методов показано скопление энкефалиноподобных веществ в VII пластине серого вещества спинного мозга, где расположены преганглионарные симпатические нейроны [54], в ядре солитарного тракта, в области дна IV желудочка, в двойном ядре, являющихся центральными звеньями барорецептивного рефлекса [55], в гипофизе [4, 6], некоторых ядрах гипоталамуса [3], то есть в зонах мозга, имеющих непосредственное отношение к вазомоторной регуляции.

Как уже указывалось, при старении выявлены разнонаправленные изменения концентраций эндорфинов и энкефалинов в гипоталамусе и гипофизе. Возможно, этой гетерогенностью концентрации опиоидов во многом объясняется известный факт нарушения центральной регуляции сердечно-сосудистой системы в старости.

Показано присутствие в сердце многочисленных опиоидных рецепторов, участвующих в периферическом контроле сердечной функции и коронарного кровообращения [56].

В различных исследованиях установлена высокая активность энкефалинов и эндорфинов в отношении сердечно-сосудистой системы у животных и человека [57]. Внутривенное введение опиоидных пептидов сопровождается типичной депрессорной реакцией. Гипотензия, вызванная введением энкефалинов, развивается быстро и длится 5—10 мин. Брадикардия сохраняется дольше, чем гипотензивная реакция. Гипотензивное действие опиоидов в равной степени связано с понижением общего периферического сопротивления и снижением минутного объема крови [58].

Показано, что опиоиды снижают артериальное давление за счет влияния на специфические рецепторы в ЦНС. Они нарушают передачу возбуждения в барорефлекторных путях, воздействуя на ядра автономной системы в стволе мозга [59]. Не исключена и периферическая локализация их гипотензивного действия. Опиоидные пептиды стимули-

руют легочные хеморецепторы, что может привести к брадикардии и гипотензии [60]. С этим в определенной мере связано ослабление рефлексов с барорецепторов в старости.

Известно, что наряду со старением в ходе возрастного развития возникает процесс витаукта, направленный на стабилизацию жизнеспособности организма, на сохранение его адаптационных возможностей [61].

Опиоидные пептиды, по-видимому, являются мощной системой, поддерживающей постоянство внутренней среды и компенсацию при возникновении патологии в старческом возрасте. Этот тезис подтверждается как экспериментально, так и клинически.

Налоксон, антагонист опиатов, повышает артериальное давление за счет увеличения общего периферического сосудистого сопротивления только у гипертензивных животных [58], что положительно коррелирует с ростом концентрации опиатов в спинном мозгу гипертензивных крыс. Следовательно, предполагается, что опиониды, оказывая центральное гипотензивное действие, являются «борющейся» системой при развитии гипертонической болезни в старости.

В возникновении и развитии как ишемической болезни сердца, так и гипертонической болезни при старении большое значение имеют факторы внешней среды, воздействующие значительное время на организм человека и ведущие к интенсивным стресс-реакциям. Тяжелый стресс активизирует развитие атеросклероза, вызывает некоронарогенные повреждения миокарда, снижает резистентность миокарда к гипоксии и т. д. Естественно, в организме существуют системы, лимитирующие развитие повреждений при стрессе. Одной из мощных стресслимитирующих систем являются опиоидные пептиды [62].

Показано, что опиониды являются важнейшим звеном адаптивного ответа организма на стресс: содержание β -эндорфинов повышается после стресса [63, 64], при внутривенном введении β -эндорфин оказывает выраженное действие на кровообращение, вызывая гипотонию и брадикардию [65]. В механизме антистрессорного действия опионидов лежит способность снижать секрецию и угнетать периферические эффекты ряда гормонов, участвующих в формировании кatabолической фазы стресса, в том числе и катехоламинов.

Данные о повышении уровня эндорфинов в плазме старых животных также свидетельствуют о том, что при развитии ИБС в старости опиоидные пептиды играют важную адаптивную роль. Уже давно известно, что в патогенезе ИБС в старости большое значение имеет нарушение синтеза и метаболизма нейромедиаторов—норадреналина, дофамина и т. д.

Показано, что опиониды подавляют как пресинаптические механизмы выделения норадреналина [66], так и пути прямого влияния на Ca^{2+} -зависимый процесс секреции медиатора. Блокада β -адренорецепторов препаратами группы пропранолола приводила к понижению уровня эндогенных опионидов [67]. В клинической практике, в частности в ге-

риатрии, возможно использование препаратов—аналогов опиоидных пептидов. Интересен опыт применения отечественного препарата даларгина у больных ишемической болезнью [68]. Авторы получили клинический эффект в виде снижения артериального давления, понижения минутного объема крови. Препарат хорошо переносился больными с тяжелой стенокардией. Для гериатрической практики очень важным представляется противосклеротическое действие опиоидов. Синтетические аналоги энкефалинов могут рассматриваться как перспективные препараты антиатерогенного типа действия [69].

Существенное значение в развитии сердечно-сосудистой патологии в старости имеет вазопрессин, хотя количество его в гипоталамусе уменьшается с возрастом [45], содержание его в крови нарастает, что, по-видимому, связано с усилением выброса нейrogормона в кровь [67]. Об этом косвенно свидетельствуют и данные об изменении нейросекреции ядер переднего гипоталамуса при старении [70]. Наряду с ростом концентрации вазопрессина в крови нарастает и чувствительность к нему сердечно-сосудистой системы. Большое количество вазопрессина выбрасываются при стрессе [70]. Все это приводит к тому, что в старости нарастает роль вазопрессинового компонента в развитии патологии сердечно-сосудистой системы, в частности коронарной недостаточности.

В последние годы из гипоталамуса был выделен ряд нейропептидов с выраженной кардиотропной активностью, в частности нейrogормон С и кардиоактивный гексапептид, обладающие значительной коронарорасширяющей способностью [71, 72]. Данное открытие подтверждает важную роль нейропептидов в регуляции деятельности различных звеньев сердечно-сосудистой системы и свидетельствует о необходимости расширения исследований возрастных аспектов данной проблемы.

Итак, к настоящему времени накоплен достаточный материал, свидетельствующий о том, что в процессе старения изменяется система нейропептидов, их соотношение в мозгу, количество и родство специфических рецепторов к ним. Эти сдвиги играют, очевидно, определенную роль в возрастных изменениях функционального состояния мозга и нервной регуляции физиологических систем организма. Вместе с тем, до самого последнего времени не были сопоставлены сдвиги физиологических реакций в старости и обмен нейропептидов, не изучены сдвиги нейропептидов при моделировании патологических состояний на старых животных, возрастные изменения нейропептидов мозга при действии других физиологически активных веществ—гормонов и медиаторов. Изучение особенностей обмена пептидов в мозгу важно не только для понимания механизмов его возрастных изменений, но и для разработки средств предупреждения их развития.

NEUROPEPTIDES IN AGING

BUCHINSKY S. G., FROLKIS V. V.

Institute of Gerontology, Academy of Medical Sciences of USSR, Kiev

The current ideas about the peculiarities of the neuropeptide regulation in aging are summarized and analyzed. Various aspects of the effect of neuropeptides on the brain transmitter systems are considered. The possible mechanisms of their modulatory action on individual links of the central neurohumoral regulation in aging and their role in the development of age-dependent pathology are discussed.

ЛИТЕРАТУРА

1. Yang H.—Y. T.—In: Dynamics of neurotransmitter function (ed. I. Hanin), p. 109—119, N. Y., Raven Press, 1984.
2. Коже Б. М., Вейман Е. Р., Су Т. П., Осман О. Г., Голдштейн А.—В кн.: Эндорфины (под ред. Е. Коза и М. Трабуччи), с. 185—191, М., Мир, 1981.
3. Dupont A., Savard P., Merand Y., Labrie F., Boissier J. R. Life Sci., v. 29, p. 2317—2322, 1981.
4. Tang F., Tang J., Chou J., Costa E. Life Sci., v. 35, p. 1005—1014, 1984.
5. Burden N., Dupont A., Labrie F. Brain Res., v. 203, p. 209—212, 1981.
6. Forman L. J., Sonntag W. E., Van Vugt D. A., Mettes J. Neurobiol. Aging, v. 2, p. 281—284, 1981.
7. Missale C., Govoni S., Croce L., Bosio A., Spano P. F., Trabucchi M. J. Neurochem., v. 40, p. 20—24, 1983.
8. Steger R. W., Sonntag W. E., Van Vugt D. A., Forman L. J., Mettes J. Life Sci., v. 27, p. 747—753, 1980.
9. Missale C., Govoni S., Casteletti L., Spano P. F., Trabucchi M. Brain Res., v. 262, p. 160—162, 1983.
10. Pernow B. Pharmacol. Rev., v. 35, p. 85—141, 1983.
11. Ghatei M. A., Bloom S. R., Langevin H., McGregor G. P., Lee Y. C., Ardian T. F., O'Shaughnessy D. J., Blank M. A., Utenthal L. O. Brain Res., v. 293, p. 101—109, 1984.
12. Buck S. H., Desmukh P. P., Burks T. F., Yamamura H. I. Neurobiol. Aging, v. 2, p. 257—264, 1981.
13. Buck S. H., Burks T. F., Yamamura H. I. Gerontology, v. 28, suppl. 1, p. 25—34, 1982.
14. Rossor M. N.—In: Integrative Neurohumoral Mechanisms (ed. L. Endroczi), p. 457—462, Amsterdam, Elsevier, 1983.
15. Буцаев В. М., Равевский К. С. Успехи физиол. наук, т. 13, № 2, с. 65—92, 1982.
16. Сметин В. Г., Виноградов В. А., Буллаков С. А. Лиганды опийных рецепторов М., Наука, 1983.
17. Jacob J. J. C., Ramabadran K. Pharmacol. Ther., v. 14, p. 177—196, 1981.
18. Palmer M. R., Seiger A., Groffer B., Olson L. Federat. Proc., v. 42, p. 2934—2945, 1983.
19. Голухин О. В., Жариков С. П., Титов М. П., Беспалова И. К., Д., Буланцев А. Ю., Ивануцкий Г. Р. Докл. АН СССР, т. 277, № 3, с. 742—745, 1984.
20. Pollard P., Llorens-Cortes C., Scheartz J. C. Nature, v. 268, p. 745—747, 1977.
21. Бурчинский С. Г. Нейрохимия, т. 3, № 3, с. 295—305, 1984.
22. Jensen R. A., Messing R. B., Spichler V. R., Martinez J. L., Vasquez B. J., McCaugh G. L. Peptides, v. 1, suppl. 1, p. 197—201, 1980.
23. Chan S. H. H., Lal Y. Y. Exp. Neurol., v. 75, p. 112—119, 1982.

24. *Kavaliers M., Hirst M., Teskey L. C.* Life Sci., v. 32, p. 2279–2287, 1983.
25. *Roth G. S.*—In: The Aging Brain (ed. E. Giacobini), p. 203–209, N. Y., Raven Press, 1982.
26. *Messing R. B., Vasquez B. J., Spiechler V. R., Martinez J. L., Jensen R. A., Rigter H., McGaugh G. L.* Life Sci., v. 26, p. 921–926, 1980.
27. *Jensen R. A., Messing R. B., Martinez J. L., Vasquez B. J., Spiechler V. R., McGaugh G. L.*—In: Endogenous peptides and learning and memory processes (eds. J. L. Martinez, R. A. Jensen, R. B. Messing, H. Rigter, G. L. McGaugh), p. 463–478, N. Y.—London, Academic Press, 1981.
28. *Hess J. D., Joseph J. A., Roth G. S.* Neurobiol. Aging, v. 2, p. 49–54, 1981.
29. *Каренци А., Фридженс В., Делла Бела Д.*—В кн.: Эндорфины (под ред. Э. Коста, М. Трабуччи), с. 264–269, М., Мир, 1981.
30. *Messing R. B., Vasquez B. J., Samaniego B., Jensen R. A., Martinez J. L., McGaugh J. L. J.* Neurochem., v. 36, p. 734–787, 1981.
31. *Stefano G. B.* Cell. Molec. Neurobiol., v. 1, p. 343–350, 1981.
32. *Hoskins B., Ho I. K.* Neuropeptides, v. 5, p. 61–64, 1984.
33. *Mishra R. K.* Progr. Neuropsychopharmacol., v. 7, p. 437–442, 1983.
34. *Agnati L. F., Fuxe K., Battistini N., Benfenati F.* Acta physiol. scand., v. 120, p. 465–467, 1984.
35. *Moriceau A., Arcuri E.*—In: The Aging Brain (eds. G. Barbagallo—Sangiorgi, A. N. Exton—Smith), p. 315–322, N. Y.—London, Plenum Press, 1983.
36. *Glowinski I. G., Torrens Y., Beaujouan J. C.*—In: Substance P in the nervous system (eds. R. Porter, M. Connor), p. 231–295, London, Pitman, 1982.
37. *Jones R. S. G., Olpe H.—R.* Neurosci. Lett., v. 50, p. 31–35, 1984.
38. *Middleugh L. D., Kupetanovic I. M., Sweeney D. I., Ingram D. K.* Neurobiol. Aging, v. 4, p. 321–326, 1983.
39. *McDougal J. N., Marques P. R., Burks T. F.* Life Sci., v. 28, p. 137–145, 1981.
40. *Murphy M. T., Lipton J. M.* Neurobiol. Aging, v. 4, p. 187–190, 1983.
41. *Gosnell B. A., Levine A. S., Morley J. F.* Life Sci., v. 32, p. 2793–2799, 1983.
42. *Ашмарин И. П.* Патол. физиология и эксперим. терапия, № 4, с. 13–17, 1982.
43. *Морозов Г. В., Иваницкий А. М.* Вopr. мед. химии, т. 30, № 3, с. 63–68, 1984.
44. *De Wied D., Van Ree J. M.* Life Sci., v. 31, p. 709–719, 1982.
45. *Zbuzek V. K., Zbuzek V., Wu Wen-Hsien.* Exp. Gerontol., v. 18, p. 305–311, 1983.
46. *Sladek J. R.* Psychopharmacol. Bull., v. 19, p. 317–320, 1983.
47. *Burtus R. T., Dean R. L., Beer B.* Psychopharmacol. Bull., v. 19, p. 168–184, 1983.
48. *Морозов Г. В., Иваницкий А. М., Стрелсу В. Б., Арсучлова О. К., Пирогова Е. К., Новиков Е. М.* Физиол. журн. СССР, т. 70, № 7, с. 990–996, 1984.
49. *Rigter H., Delft A. M. L., Pigache R. M.*—In: Integrative Neurohumoral Mechanisms (ed. L. Endroczi), p. 449–456, Amsterdam, Elsevier, 1983.
50. *Olson G. A., Olson R. D., Kastin A. J., Coy D. H.* Peptides, v. 1, p. 355–379, 1980.
51. *Reisberg B., Ferris S. H., Anand R., Mir P., De Leon M., J. Roberts E.* Psychopharmacol. Bull., v. 19, p. 45–47, 1983.
52. *Коркушко О. В.* Сердечно-сосудистая система и возраст, М., Медицина, 1983.
53. *Фроликис В. В., Бедриков В. В., Шевчук В. Г.* Кровообращение и старение, Л., Наука, 1984.
54. *Sar M., Stumpt W. E., Miller K. J. J.* Comp. Neurol., v. 182, p. 17–37, 1978.
55. *Eldre R., Hukfelt T., Johansson O.* Neuroscience, v. 1, p. 349–351, 1976.
56. *Weine E., McKnight A. T., Corbett A. O., Kosterlitz H. W.* Neuropeptides, v. 5, p. 453–456, 1985.
57. *Bernton E. W., Long I. B., Holaday J. M.* Federat. Proc., v. 44, p. 290–299, 1985.

58. Медведов О. С.—В кн.: Фармакология кардиотропных средств, с. 130—144, М., Медицина, 1984.
59. Reid J. L., Rubin P. C., Petty M. A. Clin. Exp. Hypertension, v 6 A, p. 107—120, 1984.
60. Pretjfer N., Illes P. Trends Pharmacol. Sci., v. 5, p. 419—425, 1984.
61. Frolkis V. V. Aging and Life-Prolonging Processes, Wien—N. Y., Springer-Verlag, 1982.
62. Месерсон (М. Э. Бюл. ВКНЦ АМН СССР, т. 8, № 1, с. 31—43, 1985.
63. Cusale G., Puorini M., Cuzzoni G. Gerontology, v. 31, p. 101—106, 1985.
64. Souza E. B., Van Loon C. R. Endocrinology, v. 116, p. 1577—1586, 1985.
65. Вальдман А. В., Медведов О. С., Титов М. И.—В кн.: Вазоактивные пептиды, с. 13—15, София, Медицина, 1980.
66. Schottelmeer A. M., Mulder A. H. Eur. J. Pharmacol., v. 105, p. 129—130, 1984.
67. Berkenbosch F., Vermes I., Jilders J. J. Endocrinology, v. 115, p. 1051—1054, 1984.
68. Самаренко Н. Б., Карпов Ю. А. Бюл. ВКНЦ АМН СССР, т. 6, № 2, с. 96—98, 1983.
69. Слепушкин В. Д., Золосв Г. К., Хавинсон В. И., Морозов В. Г., Титов М. И. Тезисы докл. Международной конф. по превентивной кардиологии, Москва, с. 238, 1985.
70. Frolkis V. V., Golovchenko S. F., Medved V. I., Frolkis R. A. Gerontology, v. 28, p. 290—303, 1982.
71. Галоян А. А. Вопр. биохимии мозга, т. 13, с. 9—38, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1979.
72. Galoyan A., Srapionian R. Neurochem. Res., v. 8, p. 1511—1535, 1983.

Поступила 21. XI 1986



ХРОНИКА

ВИКТОР ИОСИФОВИЧ РОЗЕНГАРТ (к 75-летию со дня рождения)

23 февраля 1987 года исполнилось 75 лет со дня рождения и 55 лет научной и общественной деятельности одного из старейшин советских ученых-специалистов в области нейрохимии, члена КПСС с 1945 г.,

ветерана Великой Отечественной войны, ветерана труда, доктора медицинских наук, профессора Виктора Иосифовича Розенгарта.



Основные этапы жизни и деятельности профессора Розенгарта были освещены в редакционной статье по случаю его 70-летия («Нейрохимия», 1982, т. 1, с. 214—215). Чтобы не повторяться о славном жизненном пути Виктора Иосифовича в науке, начавшемся еще в 1932 г. после окончания им Днепропетровского медицинского института, мы остановимся только на его творческой и ор-

ганизационной деятельности в последнее время.

Профессор Розенгарт и теперь с большим успехом продолжает научные исследования в Институте эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова АН СССР, посвященные разработке фундаментальных вопросов активности холинэстераз, прежде всего нервной системы. Итоги этих изысканий имеют важное и непосредственно практическое народно-хозяйственное значение в борьбе за повышение урожайности путем эффективного избирательного уничтожения насекомых-вредителей сельскохозяйственных культур. Общее число научных публикаций проф. Розенгарта превысило теперь уже 250: среди них, кроме ряда крупных обзоров, 4 монографии, а также, что следует особо подчеркнуть, 4 научно-популярные книги. Прекрасный педагогический талант

Виктора Иосифовича и его широкая общебиохимическая эрудиция, развитию которых помогла его многолетняя педагогическая деятельность в 1-м Ленинградском медицинском институте им. И. П. Павлова, способствовали тому, что его научно-популярные книги при ясности и доходчивости изложения даже самых трудных материалов написаны на очень высоком научном уровне. («Ферменты—двигатели жизни», 1983 г. и др.).

Профессор Розенгарт является зам. председателя Специализированного совета по присуждению кандидатских ученых степеней Института эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова АН СССР и деятельным членом Секции нейробиологии Научного совета АН СССР по проблемам биохимии животных и человека. Со дня основания журнала «Нейробиология» Виктор Иосифович—один из самых активных членов его редколлегии, и мы очень высоко ценим участие проф. Розенгарта в ее работе. Своими критическими замечаниями, высокопрофессиональными обстоятельными и объективными рецензиями на поступающие в журнал статьи проф. Розенгарт способствует повышению его научного уровня. В то же время при всей строгости и принципиальности его суждений он остается неизменно доброжелательным и готовым помочь дружескими советами на основе своего богатейшего опыта.

Поздравляя дорогого и глубокоуважаемого профессора Виктора Иосифовича Розенгарта с его славным 75-летним юбилеем, редколлегия сердечно желает ему новых сил, здоровья и постоянной активности для успешного продолжения его благородной научной деятельности.

РЕДКОЛЛЕГИЯ



VI КОНГРЕСС ЕВРОПЕЙСКОГО ОБЩЕСТВА НЕЙРОХИМИИ

С 1 по 6 сентября 1986 г. в Праге (ЧССР) состоялся очередной VI Конгресс Европейского общества нейрохимии (ЕОН). В деятельности этого общества активное участие принимают ученые социалистических стран, президентом ЕОН является в настоящее время доктор *S. Tusek* (ЧССР), он же возглавлял оргкомитет конгресса, который был организован Чехословацким медицинским обществом имени Я. Пуркинье при участии ряда других научных обществ ЧССР.

Научная программа конгресса включала лекции, симпозиумы, семинары, заседания круглого стола и стендовые сессии по многим актуальным проблемам нейрохимии. Материалы всех докладов, представленных на конгрессе, опубликованы в книге «Молекулярные основы нервной функции».

Пленарные лекции представили *E. A. Barnard* (Великобритания)—«Клонированные гены для рецепторов и их интерпретация»; *А. Д. Бергельсон* (СССР)—«Динамика мембранных липидов: неравновесная модель лиганд-рецепторного взаимодействия»; *M. Berridge* (Великобритания)—«Рецепторстимулируемый гидролиз инозитолфосфолипидов и нервная функция».

С. Д. Варфоломеев (СССР) выступил со специальной лекцией по кинетике и молекулярным механизмам взаимодействия лигандов с опиатными рецепторами. По установившейся традиции двум молодым ученым было предоставлено почетное право доложить итоги их последних исследований. Тематика симпозиумов охватывала следующие проблемы: молекулярные аспекты хранения и секреции нейротрансмиттеров; молекулярные механизмы ишемических повреждений мозга; вклад молекулярной генетики в концепции и методы нейрохимии; рецепторы мозга человека; молекулярные сигналы для роста и дифференцировки в ЦНС.

Параллельно проходила работа секций «Мускариновые рецепторы», «Нейропептиды и пептидазы, которые их расщепляют», «Фосфоинозитиды и нейромедиаторы» и др., семинаров, дискуссий за круглым столом, активно обсуждались стендовые сообщения. Тематика заседаний, как и представленных на них докладов, была очень широкой, даже простое перечисление обсуждавшихся проблем далеко выходит за рамки данного обзора. Отметим лишь некоторые, вызвавшие наибольший интерес участников конгресса темы и доклады, в том числе заседания, где наиболее активно проявлялось участие советских ученых. Так, большая

часть работ, представленных на конгрессе, была посвящена разностороннему изучению рецепторов, их структуры, функции и свойств в условиях нормы, при психической патологии, различных фармакологических воздействиях.

W. Wouters (Бельгия) сообщил о возможности избирательной фотоаффинной модификации субпопуляции C-2 серотониновых рецепторов мозга. A. J. Cross (Великобритания) представил данные об уменьшении плотности C1 и C2 типа серотониновых рецепторов в мозгу людей, страдавших старческой деменцией (болезнь Альцгеймера). Возможностями прижизненного изучения рецепторов человека при разных видах патологии мозга с помощью метода позитрон-эмиссионной томографии посвятил свое сообщение J. C. Baron (Франция). Большое внимание уделялось мускариновым рецепторам («м-холинорецепторы» по принятой у нас терминологии) мозга человека и животных. В докладе Я. Ярова (СССР) были представлены данные о существовании двух участков связывания для лиганда мускариновых рецепторов на мембранах мозга крысы. Связь мускариновых рецепторов с Ca^{2+} -зависимыми K^{+} -каналами при возбуждении и торможении показана на примере нейронов симпатических ганглиев, гиппокампа и гибридных клеток нейробластомы и глиомы (D. A. Brown, Великобритания). В совместной работе советских и чехословацких исследователей (А. Ф. Данилов, С. Тучек и соавт.) показано наличие «вторичного» центра связывания для лигандов мускариновых рецепторов и постулируется возможность аллостерической регуляции этого процесса.

На симпозиуме, посвященном проблеме ишемии мозга, большой интерес вызвали сообщения о связи ишемических повреждений с участками повышенной плотности афферентных глутаматергических входов. Было показано, что возбуждающие аминокислоты вовлечены в патогенез ишемии: тем самым обосновывается перспективность использования антагонистов глутаматных рецепторов в качестве защитных средств при этой патологии.

В докладе M. Kiessling (ФРГ) сообщается об индуцированном стрессом увеличении экспрессии генов, кодирующих синтез так называемых «стрессорных пептидов». В областях мозга, устойчивых к ишемии, отмечено увеличение скорости синтеза этих пептидов. Роль норадренергической системы мозга при стрессе был посвящен доклад Т. И. Беловой (СССР).

Большой интерес вызвали доклады, демонстрирующие современные достижения в изучении структуры рецепторов, в частности никотинового рецептора. Найдена высокая степень гомологичности в строении этого рецептора в мозгу и нервно-мышечном соединении (M. Darlison и соавт., Великобритания). О молекулярно-генетическом изучении системы катехоламинов, в частности ключевого фермента их биосинтеза—тирозингидроксилазы, сообщил J. Mallet (Франция). Данные об участии пресинаптических рецепторов в регуляции активности тирозингидроксилазы мозга и возможной роли этого звена в механизме действия некоторых пси-

хофармакологических веществ представили в своем сообщении *К. С. Равский* и соавт. (СССР). В докладе *О. С. Брусова* и соавт. (СССР) показано значение сульфидрильных групп в механизме связывания меченого имидамина со специфическими участками мембран тромбоцитов человека.

В ряде работ установлено, что при деменции типа Альцгеймера имеют место дегенеративные изменения холинергических нейронов и уменьшение их числа, однако первоначальные данные об уменьшении плотности *м*-холинорецепторов мозга при этом заболевании не подтвердились. Отмечено значительное снижение активности ацетилхолинэстеразы и плотности *м*-холинорецепторов.

Интересными были доклады о механизме действия некоторых токсинов, избирательно разрушающих дофаминергические и холинергические нейроны. Данные *A. Davison* (Великобритания), согласно которым повреждения нейронов при болезни Альцгеймера могут быть вызваны эндогенными нейротоксинами, указывают на перспективность изучения последних в качестве инструментов, позволяющих моделировать патологические состояния ЦНС. Другой аспект использования нейротоксинов связан с изучением природы и функции ионных каналов возбудимых мембран. Этой проблеме были посвящены доклады *Б. И. Ходорова* (СССР) о взаимодействии нейротоксинов с Na^+ -каналами перфа и нейрональных мембран, а также группы исследователей из Института биорганической химии АН СССР (*Ю. Н. Уткин* и соавт.), которые представили данные об использовании химически модифицированных токсинов скорпиона в качестве зондов для изучения свойства Na^+ -каналов.

В рамках симпозиума «Молекулярные сигналы для роста и дифференцировки нервной системы» привлекает внимание сообщение *A. Schousboe* и соавт. (Дания), в котором показана роль ГАМК как сильного нейротрофического фактора, способного стимулировать рост и дифференцировку нейронов. Обнаружена также нейротрофическая активность некоторых ганглиозидов. Большое внимание на конгрессе было уделено прикладным аспектам нейрохимии, в частности клинической нейрохимии, проблеме проницаемости ГЭБ, диагностическому значению исследования СМЖ у больных с разными видами нервно-психических расстройств.

A. Turner (Великобритания), председатель секции «Нейропептиды и пептидазы, которые их расщепляют», обобщил результаты исследований, проводимых в различных лабораториях мира по идентификации и характеристике пептидаз, осуществляющих процессинг и бионинактивацию нейропептидов, и подчеркнул, что постсинаптическая инактивация нейропептидов путем протеолиза является принципиально важным механизмом, контролирующим как гомеостаз этих соединений, так и длительность их многообразных физиологических эффектов. Им были представлены данные по обнаружению двух форм ангиотензинпревращающего фермента в стрнатуре свиньи с M_r 170 и 180 кД, обсуждены возможные причины их существования и физиологические функции этого фермента в мозговой ткани. В докладе *D. Smyth* (Великобритания) об-

суждались 2 независимых друг от друга пути образования β -эндорфина 1—27 в нервной ткани и указывалось на важность не только первичной структуры, но и конформации субстрата для атакруемости его пептидазами. G. Rossier (Бразилия) представил данные, свидетельствующие о том, что эндолигопептидаза А головного мозга катализирует образование Leu- и Met-энкефалинов из предшественников с удлинённой по С-концу цепью соответственно, причем оптимальными являются субстраты, состоящие из 8—13 аминокислотных остатков. В докладе R. Malsas (Греция) обсуждались вопросы региональной и субклеточной локализации эндопептидазы-24.11 в НС. Иммуоцитохимическим методом доказано, что в ЦНС эта пептидаза сконцентрирована в нейронах стриатума, обонятельного бугорка, черной субстанции, межжелезкового ядра, в периферической НС максимальное количество фермента обнаружено в нервных корешках и ганглиях задних корешков спинного мозга. Авторами отмечена корреляция между региональным распределением эндопептидазы-24.11 и веществом Р, а также в некоторых отделах головного мозга корреляция между распределением фермента и Leu-энкефалина. P. Kilabgi и соавт. (Франция) доказали, что в деградации нейротензина участвуют, по крайней мере, три эндопептидазы синаптических мембран мозговой ткани: эндопептидаза-24.11 (расщепляет связь $\text{Tyr}_{11}\text{-Ile}_{12}$), металло-эндопептидаза (расщепляет связь $\text{Arg}_8\text{-Arg}_9$) и неидентифицированная пока эндопептидаза (гидролизует связь $\text{Pro}_7\text{-Arg}_8$). Авторами обнаружено, что замена остатка Tyr_{11} на D-Tyr делает нейротензин резистентным к действию пептидаз, что объясняет парадоксальный, на первый взгляд, эффект, наблюдаемый при внутрижелудочковом введении D-Tyr₁₁-нейротензина: несмотря на более низкое сродство этого аналога нейротензина к рецепторам головного мозга, он проявляет более мощное гипотермическое действие, чем нейротензин.

Представленные в докладе M. Gamon и соавт. (Франция) данные по изучению эффекта ингибиторов пептидаз (тиорфана, бестатина, келаторфана, каптоприла и эналаприла) на K^+ -вызванное высвобождение Met-энкефалина, вещества Р и холецистокинина-8 из срезов головного и спинного мозга свидетельствуют о том, что катаболизм нейропептидов в физиологических условиях не всегда соответствует картине, наблюдаемой при изучении их деградации пептидазами в условиях *in vitro*. В докладе А. А. Галоян, А. В. Азерян (СССР) подытожены результаты исследований специфичности катепсина В, Н, L мозговой ткани с помощью модельных (хромсформных, хромо- и флуорогенных) и регуляторных пептидов. На примере вазоактивных пептидов и олигопептидов, содержащих остаток *p*-нитрофенилаазазида авторам впервые удалось идентифицировать факторы, существенные для проявления дипептидилкарбоксипептидазной активности катепсина В. Обнаруженные различия в специфичности указанных цистеиновых пептидаз головного мозга, активных при слабых значениях рН, обуславливают, по мнению авторов, как синергизм их функционирования, так и особые биологические функции.

Оценивая научную программу конгресса в целом, следует признать, что несмотря на отдельные недочеты, в ней нашли достаточно полное отражение многие важнейшие достижения современной — нейрохимии, а говоря шире, молекулярной нейробиологии — научного направления, отчетливо и ярко заявившего о себе за последние несколько лет. Среди признанных достижений этого направления, в первую очередь, необходимо назвать следующие: молекулярно-генетические подходы к изучению нейрональных рецепторов, их структуры и функции; нейрохимические исследования фосфоинозитидов (инозитол-3-фосфат как вторичный «мессенджер»), молекулярная природа ишемических повреждений мозга, нейрохимия деменции (слабоумия), роль нейроэндокринных факторов при стрессе, успехи в изучении рецепторов мозга человека.

Нельзя не отметить прекрасную организацию конгресса, все заседания которого проходили во Дворце культуры, расположенном в одном из живописнейших районов Праги. В работе конгресса приняли участие около 800 ученых, представляющих не только страны Европы, но также США, Японию, Индию, Австралию, Канаду. Приятно отметить широкое участие в работе конгресса ученых социалистических стран, большое количество научной молодежи, в том числе из нашей страны.

Следующий, VII Конгресс Европейского общества нейрохимиков состоится в июне 1988 г. в Гетеборге (Швеция).

РАЕВСКИЙ К. С.
АЗАРЯН А. В.

НЕЙРОХИМИЯ НА XVII КОНФЕРЕНЦИИ ФЕБО

С 24 по 29 августа 1986 г. в Западном Берлине проходила XVII Конференция Федерации европейских биохимических обществ (ФЕБО). В ее работе принимала участие советская делегация во главе с академиком Ю. А. Овчинниковым, а также группа советских участников, прибывших по линии научного туризма.

Конференцию открыл пленарной лекцией, посвященной Гансу Кребсу, «Как направляются белки на свои точные участки в митохондриях» проф. G. Schatz (Швейцария). Он сообщил о роли небольших N-концевых участков белков, синтезированных вне митохондрий, в их внутримитохондриальной сортировке и последующей локализации на определенных участках митохондрий.

На 27 симпозиумах конференции ФЕБО были заслушаны доклады, посвященные актуальным проблемам биохимии, биотехнологии и молекулярной биологии. Материалы выступлений на симпозиуме «Нейробиохимия», а также ряд докладов, представленных на симпозиумах «Энзимы», «Цитоскелет», «Дифференциация и рост клеток», «Биохимия

гормонов», отражали современное состояние исследований в области нейрехимии.

В докладе *K. Bauer* (Западный Берлин) обсуждались пути эффективного управления продолжительностью действия нейропептидов. Наиболее вероятным механизмом регуляции является не энергозависимый захват, а ферментативный гидролиз этих пептидов. С этой целью автором подробно охарактеризованы некоторые пептидазы, участвующие в деградации TRH, LH-RH, нейротензина, субстанции P и энкефалинов. Для выявления пептидаз, связанных с плазматическими мембранами нейронов и глии, использованы специфические синтетические пептиды. С учетом стерической локализации этих ферментов высказано предположение, что некоторые пептидазы участвуют в выключении пептидергических сигналов (TRH-расщепляющий мембранный фермент или бестативчувствительные аминопептидазы нервных клеток), тогда как другие выполняют скорее роль «чистильщиков» (например, термолизинподобная металлоэндопептидаза, КФ 3.4.21.11, связанная с клетками глии).

D. Richter и соавт. (ФРГ) осуществили секвенирование гена, кодирующего вазопрессин (в составе предшественника, включающего нейрофизин и гликопептид неизвестного назначения) у нормальных крыс и мутантов линии Brattleboro. Различия заключались в отсутствии единственного нуклеотида, что вызвало сдвиг в С-конце предшественника вазопрессина.

Предметом оживленного обсуждения на конференции служили механизмы захвата и метаболизма нейротрансмиттеров в астроцитах. Обнаружен Na^+ -зависимый высокоаффинный захват серотонина и норадреналина культурой клеток астроцитов мозга новорожденных крыс с K_{m} 0.4 мкМ (*H. K. Kimelberg* и соавт., США). Захват сильно тормозится трициклическими антидепрессантами. Ингибиторы метаболизирующих ферментов—МАО и катехол-О-метилтрансферазы—способствуют более эффективному захвату нейротрансмиттеров. Выброс серотонина более затруднен по сравнению с высвобождением его метаболитов, свидетельствуя о большей легкости их перехода сквозь клеточную мембрану. Захват серотонина зависит не столько от концентрации Na^+ , сколько от направленного внутрь градиента этого катиона. Докладчик высказал предположение, что по эффективности захвата норадреналина и серотонина астроциты могут конкурировать с нервными окончаниями, контролируя внеклеточный уровень продуцируемых моноаминных нейротрансмиттеров. В то же время, между захватом таких нейротрансмиттеров, как глутамат и ГАМК, астроцитами и пресинаптическими окончаниями нейронов обнаружены существенные различия (*A. Schousboe* и *L. Hertz*, Дания). Глутамат избирательно захватывается астроцитами, тогда как транспорт ГАМК направлен преимущественно в нервные окончания. С функциональной точки зрения важно, где происходит захват нейротрансмиттерных аминокислот, так как если в нервных окончаниях они могут реутилизироваться как трансмиттеры, то в астроцитах они подвергаются метаболическим превращениям. Наличие в астроцитах глутаматде-

гидрогеназы и α -кетоглутаратдегидрогеназы способствует быстрой окислительной утилизации глутамата. Некоторые метаболиты могут переноситься в нейроны и использоваться в качестве предшественников нейротрансмиттерных аминокислот. Таким образом, астроциты играют ключевую роль в инактивировании нейротрансмиттерных аминокислот и доставке их предшественников в нейроны.

Несколько докладов было посвящено периферическому действию нейропептидов. *J. Kleineke* и *H. D. Söling* (ФРГ) показали, что в отсутствие экзогенного Ca^{2+} стимуляция α -адренергическими агонистами вазопрессиином и ангиотензином II приводит к однофазной мобилизации Ca^{2+} из клеточных депо и подъему гликогенолитического образования глюкозы, тогда как фенилэфрин оказывает двухфазный эффект.

В докладе *Г. К. Парсаян* и соавт. (СССР) было показано, что выделенный в лаборатории *А. А. Галоян* нейропептид Tyr-Cly-Ley-Arg-Pro-Cly-NH₂ участвует в регуляции гликогенолиза в сердечной мышце. В каскадный механизм регуляции вовлечены фосфатаза фосфоорилазы и гликогенфосфоорилаза.

M. T. Chauvet и соавт. (Франция) проанализировали филогенетические изменения в строении мультиферментных белков—предшественников нейропептидов гипофиза и нейрофизинов в ходе эволюции от земноводных до млекопитающих. В то время как в гормональных доменах прослеживаются явные филогенетические изменения (переход мезотоцина в окситоцин и вазотоцина в вазопрессин), различные группы нейрофизинов остаются в основном неизменными (филогенетически более стабильны).

В докладах, посвященных активному захвату, освещались вопросы компартментализации [H]ГАМК, захваченной синапсосомой (*M. S. Santos* и соавт., Португалия) и различия между скоростью включения карнозина в астробласты и нервные клетки (*M. Szchulz* и соавт., Западный Берлин). В ряде докладов рассматривалась взаимосвязь между мембранными рецепторами и ионными каналами. По данным *F. Hofmann* и соавт. (ФРГ), кальциевые каналы активируются агонистами β -адренергических рецепторов. Обработка изолированных клеток сердца каталитической субъединицей сАМР-зависимой протенинказы увеличивает раскрываемость ионных каналов при деполаризации, свидетельствуя о вовлечении в реализацию этого эффекта фосфорилирования Ca^{2+} -канала. *M. Lazdunski* (Франция) выступил с сообщением о структуре, механизме действия и дифференциации потенциалзависимых ионных каналов. Установлено, что рецепторы различных ингибиторов Ca^{2+} -каналов расположены в мембранах Т-трубочек. Никотиновый ацетилхолиновый рецептор был избран *F. Huxo* и соавт. (ФРГ) как прототип класса рецепторов, связанных с ионными каналами. Установлено, что работа ионных каналов сопряжена со связыванием агонистов с двумя субъединицами этого рецептора. Некооперативный ингибитор [3H]ТМРР связывается по участку 262 β -полипептидной цепи рецептора. *H. Möhler* (Швейцария) сообщил, что препараты, действующие

на бензодиазепиновый рецептор. являющийся компонентом рецептора ГАМК, влияют на раскрываемость ГАМК-зависимого хлоридного канала. Разностороннее изучение ацетилхолиновых рецепторов позволило уяснить ряд вопросов, связанных с их строением, регуляцией ферментами и взаимодействием с агонистами и антагонистами (*J. Hermans-Borgmeyer* и соавт., *D. W. Schmid*, ФРГ; *M. Hillmann* и соавт., *M. Giersig* и соавт., Западный Берлин; *E. Hulme* и соавт., Англия).

Значительное место в работе конференции заняло обсуждение вопросов, связанных со структурными элементами нервных клеток. *F. Gross* и соавт. (Франция) информировали, что периферин, относящийся к белкам нейрофиламентов, концентрируется преимущественно в клетках периферической нервной системы. Обнаружен полиморфизм изобутулинов в различных участках НС. *P. A. M. Eagles* и соавт. (Англия) привели факты о наличии множества фосфорилированных участков и глутаматных остатков в С-концевой части нейрофиламентов. Методами генной инженерии *J. Grinberg, U. Littauer* (Израиль) охарактеризовали семейство тубулинов, выполняющих различные функции в ходе дифференциации нейрона.

Нейроэизмология была представлена на конференции ФЕБО работами по очистке из нервной ткани и описанию параметров ряда ферментов: 55 кД фосфопротеинфосфатазы (*M. Weber* и соавт., ФРГ), двух энкефалиндеградирующих аминопептидаз (*A. E. Bergmann* и *K. Bauer, M. Miklus* и *K. Bauer*, ФРГ), ацетилхолинэстеразы (*K. Gennari* и соавт., Швейцария), NADH-дегидрогеназы синаптических мембран (*T. Treichler* и *J.-L. Dreyer*, Швейцария), киназы рибосомного белка S6 (*M. Pierre* и соавт., Франция).

Предметом обсуждения во многих докладах стали факторы, участвующие в росте нервных клеток. *H. Thoenen, V.-A. Barde* (ФРГ) рассматривают нейротропные молекулы как ретроградные мессенджеры между тканями-мишенями и иннервирующими нейронами, на примере фактора нервов (NGF) и получаемого из мозга нейротропного фактора (BDNF). Механизм действия факторов роста EGF и PDGF, по сообщению *W. H. Moolenaar* и соавт. (Голландия), включает активирование тирозиновых протеинкиназ и прирост внутриклеточного Ca^{2+} . *P. Toso* и соавт. (Италия) сообщили о том, что нейротропный фактор (NTF) из хвостатого ядра способствует процессам регенерации при повреждении головного мозга. В культуре клеток мозга NTF стимулирует захват [3H]допамина и [^{14}C]ГАМК и увеличивает выживаемость клеток. Сходными свойствами обладают и выделенные *U. Dohrmann* и соавт. (ФРГ) 2 белковых фактора из мышц, способные стимулировать рост нейронов и продлевать жизнь клеток. Один из них сходен с ламинином.

A. Zimmermann, A. Sutter (ФРГ) сообщили о рецепторе NGF и антигенах SGII-1 и -2 как характерных компонентах глиальных клеточных мембран при росте клеток. Экспрессия их прекращается или ослабевает с остановкой роста нервов, но при повреждении нейрона наблюдается их резкая реэкспрессия. *D. Monard* и соавт. (Швейцария)

установили, что полученный ими фактор, стимулирующий рост нейритов (М, 43кД), является ингибитором сериновой протейназы.

На конференции в целом наблюдалась тенденция к усилению молекулярно-биологического и молекулярно-генетического подхода к изучению ряда заболеваний НС. К. *Beyreuther*, С. *L. Masters* (Австралия) сообщили, что при болезни Альцгеймера на фоне резкого уменьшения числа нейронов наблюдается нарастание вне- и внутриклеточного отложения ряда амилоидных белков. В докладе *D. Micic* и соавт. (Югославия) «Активность МАО и цитохром-с-оксидазы в митохондриях мозга при ишемии и последующем восстановлении кровообращения» приводились данные о сдвигах в активности оксидаз коры и гиппокампа после ишемии, причем митохондрии гиппокампа были более чувствительны к этой патологии. А. *Roach* и соавт. (США) представили доказательства того, что у мутантных «дрожащих» (shiverer) мышшей наблюдается гипомиелинизация, отсутствие основного белка миелина и мРНК для этого белка. Причиной этого является делеция пяти экзонов гена, кодирующего белок. По наблюдениям *H. Sato* и соавт. (Япония), гипоплазия мозжечка у крыс, страдающих желтухой, сопровождается ростом активности глутатион-S-трансферазы. Предотвращение гипоплазии фототерапией подавляет прирост активности фермента.

Суммируя данные по докладам нейрохимического профиля на конференции ФЕБО, следует указать на недостаточное освещение в них молекулярных механизмов памяти, обучения, поведенческих реакций, периферического действия нейrogормонов, посттрансляционной модификации рецепторных белков и ключевых ферментов метаболизма нервной ткани.

Отрадно отметить широкое использование методов генной инженерии и иммунохимии для установления структуры многих минорных нейроспецифичных белков и пептидов и возрастающий интерес к процессингу и структурно-функциональным особенностям пептидных нейrogормонов и нейромедиаторов.

ПАРСАДЯН Г. К.



РЕЦЕНЗИИ

Н. М. ПОЛЯКОВА, Я. В. БЕЛИК, И. Н. ВЛАСЕНКО «Александр Владимирович Палладин. Документы. Фотографии». Киев. Наукова думка. 1985.

Издание книги Н. М. Поляковой, Я. В. Белика и И. Н. Власенко, отражающей жизненный путь выдающегося ученого, организатора науки и общественного деятеля А. В. Палладина, явилось знаменательным событием в научной и культурной жизни страны. Книга вышла в свет к 100-летию со дня рождения академика А. В. Палладина. Она сравнительно невелика по объему, но в высшей степени удачно скомпонована и богато иллюстрирована. В сжатой форме описаны не только этапы жизни ученого, но и историческая эпоха начала и середины XX века.

Знакомясь по данной книге с биографией академика А. В. Палладина, читатель становится как бы соучастником описываемых событий. Этому способствует исключительно удачный подбор фотографий, на которых отражены и встречи А. В. Палладина с выдающимися учеными, политическими деятелями, и участие в международных, всесоюзных и республиканских съездах, конференциях и других форумах, и торжественные моменты его жизни.

Первая часть книги, названная «Ученый. организатор науки, общественный деятель», является текстовым описанием биографии А. В. Палладина.

Остальная часть книги разделена на 5 глав, в которых отражены в хронологическом порядке основные периоды жизни А. В. Палладина.

I глава названа «Детские годы. Первые шаги исследователя. Харьковский период». Эта глава включает лаконичный текст, многочисленные фотографии и документы. Хорошо отражен период становления А. В. Палладина как ученого и работа в научных школах И. П. Павлова и Н. Е. Введенского. Выдающимся достижением этого периода является создание «Учебника физиологической химии». Признанием исключительного вклада А. В. Палладина в развитие науки явилось избрание его академиком АН УССР и перевод созданного им в Харькове Института биохимии в Киев.

Во II главе «Киевский период. Годы Великой Отечественной войны» описаны события, охватывающие период с 1931 по 1945 гг. Начало этого периода А. В. Палладин посвятил проектированию и строительству Института биохимии в Киеве, формированию его научной тема-

тики. Именно в это время из трех главных направлений исследований института—биохимии мышечной деятельности, нервной системы и биохимии питания—на первое место была выдвинута биохимия нервной системы. Основное внимание ученых уделял сравнительно-биохимическому направлению, а также совершенно новому—эмбриохимическому. По инициативе А. В. Палладина на биологическом факультете Киевского государственного университета была открыта кафедра биохимии.

В течение 1941—1943 гг. Институт биохимии АН УССР находился в эвакуации в Уфе. Исследования института были направлены на помощь фронту. В начале 1942 г. под руководством А. В. Палладина получен кровоостанавливающий и ускоряющий заживление ран препарат викасол. В этот же период А. В. Палладин избирается академиком АН СССР (1942) и академиком АМН СССР (1944). В 1943 г. Институт биохимии АН УССР переезжает из Уфы в Москву, а в 1944 г.—в Киев.

В III главе книги отражена деятельность А. В. Палладина в послевоенный период на посту президента АН УССР, его участие в борьбе за мир и общественная работа в качестве депутата Верховного Совета СССР. В 1949 г. за выдающийся вклад в дело укрепления мира и дружбы между народами Всемирный Совет Мира наградил А. В. Палладина серебряной медалью. В это же время за выдающиеся заслуги в области биохимии и многолетнюю научно-педагогическую деятельность и в связи с 70-летием со дня рождения А. В. Палладину было присвоено звание Героя Социалистического Труда с вручением ордена Ленина и золотой медали «Серп и Молот».

Деятельность А. В. Палладина как организатора и участника многочисленных международных, всесоюзных и республиканских научных форумов описана в отдельной, IV главе. В этой работе большую помощь А. В. Палладину оказывали его многочисленные ученики, успешно развивающие основанное им важнейшее биохимическое направление—функциональную нейрохимию, получившую мировое признание.

Последние годы жизни А. В. Палладина отражены в V главе, где показаны результаты плодотворного труда выдающегося ученого, его учеников, возглавляющих многочисленные лаборатории Института биохимии АН УССР. Представлены уникальные фотографии А. В. Палладина в лаборатории, на отдыхе, среди членов его семьи.

Роль А. В. Палладина в становлении отечественной биохимии можно охарактеризовать словами выдающегося советского биохимика академика С. Е. Северина: «Для старшего поколения биохимиков, которое я представляю, научная деятельность Александра Владимировича—это история развития советской биохимии. Я бы даже сказал более широко—это в значительной степени история развития советской науки».

В редакционной статье «Украинского биохимического журнала», посвященной памяти А. В. Палладина (1973), отмечалось, что академик А. В. Палладин своими научными исследованиями, созданием школы советских биохимиков внес большой вклад в строительство будущего биологической науки. Его жизнь для всех советских ученых, прогрессивных

ученых зарубежных стран всегда будет образцом служения науке и делу борьбы за лучшее будущее своего народа и всего человечества.

Большой успех книги, посвященной замечательному человеку, выдающемуся ученому и общественному деятелю А. В. Палладину, выпуск которой приурочен 100-летию со дня рождения, в значительной степени обеспечен тем, что ее написали в сотрудничестве ближайшие ученики А. В. Палладина—Н. М. Полякова, Я. В. Белик и писатель И. П. Влащенко. Эта книга является великолепным памятником, который займет достойное место среди самых замечательных жизнеописаний выдающихся ученых мира. Книга представляет интерес не только для специалистов в области биохимии или историков науки, но и для любого интеллигентного человека. Неоценимую роль сыграет книга и в воспитании молодого поколения советских ученых, которые в лице А. В. Палладина найдут образец ученого-патриота, общественного деятеля, борца за мир, достойный подражания. К сожалению, книга вышла весьма небольшим тиражом, очень быстро разошлась и сразу же превратилась в библиографическую редкость. Имеются многочисленные запросы на эту книгу, особенно из вузов страны, где она призвана сыграть большую воспитательную роль. В связи с этим книга заслуживает переиздания значительно большим тиражом.

ХАГИДАРЛИУ С. Х.

УДК 612.82

FERDINAND HUCHO. Neurochemistry Fundamentals and Concepts, (Transl. by Margaret Dickins), Weinheim, FRG, VCH, 1986, 326 p.

Ф. ХУЧО «Нейрохимия. Основы и принципы». (англ. перевод с нем.), 1986. 326 с.

Издание руководства по нейрохимии является переводом опубликованного в 1982 г. на немецком языке оригинала. Однако в текст английской версии этого издания автор внес много дополнений, отражающих успехи, достигнутые за последнее пятилетие в области исследования механизмов рекомбинации ДНК, новые концепции переноса сигнала через мембраны, характеристики ряда рецепторов нейротрансмиттеров. Основные факты современной нейрохимии подаются в книге в доступной форме.

Книга подразделена на 12 глав. В главе «Нейрохимия: определение предмета на примере процесса зрения» ставятся принципиальные вопросы восприятия и передачи информации в нервной системе, рассматриваемые в разделах: 1—механизм передачи информации (не сама информация) может быть проанализирован биохимически; 2—нейрохимия сетчатки не объясняет визуализацию изображений; 3—первый этап: альде-

гид витамина А поглощает свет; 4—второй этап: запускается нервный импульс (трансдукция); 5—родопсин фотофосфорилируется; 6—колбочки и цветовое зрение; 7—беспозвоночные видят иначе; 8—третий этап: нервный импульс интегрируется; 9—нейрохимия как интегративная наука; 10—нейрон: функциональные элементы как объекты нейрохимии.

В главе «Мембранные молекулы» последовательно развивается тезис, что нейрохимия есть нечто большее, чем химия «нейромолекул». Липиды, белки и углеводы рассматриваются как строительные материалы нервной мембраны. Автор доказывает, что строение фосфолипидов предполагает широкое разнообразие молекулярных структур и раскрывает роль фосфолипаз в их деградации. Детально обсуждается функция сфинголипидов и ганглиозидов нервной ткани. Автор приводит примеры ряда генетических отклонений, обуславливающих ферментативные дефекты в метаболизме сфинголипидов и приводящих к липидозам. Внимание читателей привлекается к роли гликопротеинов, определяющих специфичность нервных контактов. Подробная интегративная оценка мембран развивается в следующей главе книги. В ней рассматриваются модели мембран, начиная с предложенной 50 лет назад Gorter и Grendel модели липидного бислоя и кончая современной схемой Singer и Nicolson, разбираются функции липидной фазы и мембранных белков. Наиболее современные представления о мембранах как жидких кристаллах и роли эндогенных факторов в фазовых переходах также являются предметом обсуждения этой главы. Многие уникальные особенности природных мембран являются следствием асимметричного распределения мембранных липидов, а также углеводов и белков в бислое и специфических взаимосвязей, возникающих между белками и липидами.

Глава 4 посвящена всестороннему описанию структуры и функции миелина, ее специфическим белкам и замедленному обновлению биомолекул. Безусловный интерес представляет описание вызываемой введением основного белка миелина AI экспериментальной аутоиммунной болезни как модели множественного склероза и других заболеваний, являющихся следствием дефектов миелина.

В главе 5 «Электрофизиология» освещаются проблемы электрофизиологии на молекулярном уровне.

Активный и пассивный транспорт ионов, химическая и электрическая регуляция тока ионов, механизм раскрытия ионных каналов нашли отражение в главе 6 «Ионные каналы». В ней также описывается использование ряда препаратов, в частности нейротоксинов, в качестве инструмента для изучения ионных каналов и потенциала действия и молекулярные механизмы действия анестезирующих средств, блокирующих проведение нервного импульса.

Проблемы активного транспорта ионов сконцентрированы в главе 7, где особое внимание уделяется роли АТФ и Na^+ , K^+ -АТФазе. Центральной темой книги является проблема синаптической передачи, которой посвящены две следующие главы. Исторический очерк отдает дань работам Waldeyer и Ramon y Cajal, сформулировавших ней-

ронную теорию, и Sherrington, впервые использовавшего понятие синапса как специализированного формирования для обмена сигналов между нервными клетками. Далее дается определение электрических и химических синапсов, раскрываются особенности двух классов холинергических синапсов—мускаринового и никотинового, и очерчиваются критерии классификации других нейротрансмиттеров. F. Nuxho приводит список ингибиторов, прицельно тормозящих те или иные этапы цикла передачи импульса в холинергических синапсах. ГАМК и глицин рассматриваются в монографии не только как нейротрансмиттеры процессов торможения, но и как регуляторы хлоридных каналов. Особый интерес представляют разделы этой главы, описывающие нейротрансмиттеры и модуляторы пептидной природы. Другие нейропептиды, энкефалины, выполняют функцию эндогенных опиатов, регулирующих проведение болевых сигналов. Описывается процессинг этих пептидов из их предшественников (β -липотропина, проопиомеланортина, продинорфина и др.). В этой главе рассматривается также вещество Р, физиологическая роль которого во многом остается неясной.

В главе 9 описание рецепторов приводится на трех уровнях—интактных клеток или тканей, клеточных мембран и рецепторных молекул. Автор указывает на фармакологическую десенситизацию и гиперсенситизацию как на возможные модели для модуляции процессов рецепции. Анализируются пути восприятия различными типами рецепторов центральных сигналов и их передачи и усиления каскадными механизмами, включающими фосфорилирование белков. Раскрываются молекулярные механизмы ряда заболеваний НС как результат нарушения тех или иных рецепторных систем. При этом автор приводит список и описание свойств лигандов (агонистов и антагонистов) для участков связывания трансмисмиттеров на рецепторах.

В главе 10 «Цитоплазма нейрона и нейроспецифичные белки» излагаются современные представления об аксональном транспорте как системе внутриклеточной коммуникации. Автор характеризует функции тубулина, нейрофиламентов, актина, миозина, кальмодулина и ряда нейроспецифических белков.

В главе 11 «Развитие, стабилизация и пластичность нервной системы» значительное место уделяется нейротропным факторам, синаптогенезу, а также молекулярным аспектам оперативного и длительного хранения информации.

Заключительная глава книги «Экспериментальные модельные системы» знакомит с опытами по изучению простых моделей поведенческих реакций на кишечной палочке, парамелии, гидре и дрозофиле, а также с использованием электрических органов рыб в качестве моделей синапсов.

Автор оценивает генную инженерию как фактор, революционизирующий нейробиологию, а гибридные клеточные линии, продуцирующие моноклональные антитела, как весьма полезный инструмент для нейробиологических исследований.

Таким образом, в книге излагаются молекулярные основы функций НС. Руководство по нейрохимии может служить ценным подспорьем для врачей, фармакологов, биохимиков и специалистов в области молекулярной биологии в понимании взаимосвязей между биологическими, химическими и физическими феноменами, характерными для нервной системы.

ПАРСАДАНЯН Г. К.

УДК 612.8.015+616.853

К. И. ПОГОДАЕВ «Эпилептология и патохимия мозга (к теории этиологии, патогенеза и лечения эпилепсии)», М., Медицина, 1986, 288 с.

Рецензируемая монография проф. Погодаева К. И. состоит из пяти глав, взаимосвязанных по содержанию, имеющих равное значение и самостоятельную ценность по замыслу исполнения и информационной характеристике эпилептогенеза и эпилептической активности при экспериментальной эпилепсии. Главное внимание обращено на обобщение имеющихся данных по патохимии эпилептической активности ткани головного мозга.

При проведении многолетних исследований (начиная с 1946 г.) автор стремился досконально охарактеризовать биохимические (патохимические) основы этиологии, патогенеза, сущности изучаемой болезни. Для этой цели в опытах, проведенных на различных и многочисленных (более 10000) лабораторных животных с острой и хронической формой болезни вызывалась соответствующая патология, производились в динамике разнообразные биохимические исследования головного мозга на срезах, гомогенатах разных отделов, нервных центров и полученных из них обогащенных фракциях внутриклеточных структур и нервных окончаний. Особенно тщательно исследовались фракции митохондрий и синапсом. В ряде опытов отдельно изучались обогащенные фракции нейронов и нейроглии.

Автором установлены неизвестные ранее явления аномального энергетического, ионного, белкового, азотистого, аминокислотного и некоторые стороны медиаторного обмена на разных уровнях структурной организации и регуляции головного мозга, объясняющих возникновение эпилептической активности и ее купирование. В частности, показано, что АТР не расходуется в заметных количествах на эпилептогенез; на «зарядку эпилептических нейронов» используется, в основном, энергия до стадии образования АТР посредством митохондрий, участвующих в создании концентрационных ионных потенциалов в эпилептических нейронах. Получены доказательства наличия калиевой специфичности митохондрий по отделам мозга (структуры с повышенной возможностью к эпилептогенезу содержат больше митохондриального калия); установле-

но сокращение матрикса митохондрий во время эпилептических разрядов, которое объясняется выходом калия и ортофосфата из митохондрий в цитоплазму нейрона, что сопровождается сильным снижением окислительного и заметным повышением субстратного фосфорилирования. Показано, что во время «зарядки и разрядки» нейрона происходят противоположные потоки ионов калия (соответственно и натрия) между нейронами и глией в основном за счет деятельности «митохондриальных насосов» при пониженной активности Na^+ , K^+ -АТФазы; предполагается, что развитие данной патологии было бы затруднительным и даже маловероятным без ослабленного действия Na^+ -насоса. Показано, что предрасположенность животных к эпилептическим припадкам (крысы линии и с антенатальной судорожной патологией) определяется установленными молекулярными механизмами, в частности пониженным окислительным воспроизводством АТФ и повышенными осмотическими свойствами митохондрий, обусловленных аномальным ионным обменом. Определены биохимические механизмы, объясняющие самозакрепление эпилептической активности путем изменения метаболической структуры митохондрий и уменьшением сопряжения энергии с пластическим обменом.

Получены данные, свидетельствующие о том, что при эпилептогенезе в тканях мозга изменяются основные пути метаболизма глюкозы как по гликолитическому пути, так и по пентозофосфатному пути. В нейроглияльном эпилептическом комплексе наиболее резко снижается аэробный гликолиз и в большей мере, по-видимому, в эпилептических нейронах при стойкой эпилептической активности. Однако при этом отчетливые изменения могут наступать в олигодендроглии при прямом окислении глюкозы. Описанные в монографии биохимические и физико-химические сдвиги в нейроглияльном комплексе являются причиной возникновения и развития эпилептической активности—этиологии эпилепсии.

Таким образом, субклеточные структуры, аномальные внутриклеточные и межклеточные обменные процессы и их саморегуляция являются главенствующим в причинно-следственных отношениях, лежащих в основе данной патологии. Эпилепсия, являясь болезнью головного мозга, детерминирована, по автору, в нейроглияльном комплексе, который морфофункционально и метаболически взаимосвязан через астроциты с капиллярной системой, обеспечивающей местное кровоснабжение, адекватное эпилептической активности. При этом микроструктурным выражением эпилептогенеза считается морфофункциональная система, сокращенно обозначаемая автором нейрон-глия-миоцит (н-г-м) и подробно описанная в монографии с изложением возможных молекулярных и физико-химических механизмов эпилептической активности и ее гомеостаза, точнее гомеостатизации. Таким образом, описанные сосудисто-нейроглияльные отношения в «эпилептическом мозгу» представляются биологической и физико-химической основой эпилепсии. Автор рецензируемой монографии в соответствии с современными представлениями рассматривает гематоцеребральный барьер (мозг-кровь) не как систему обычных полупроницаемых мембран, а как активный физико-химический механизм, из-

бирательно регулирующий обмен веществ и энергии ткани мозга между общей внутренней средой (кровь) и микросредой (межклеточная, цереброспинальная жидкость). Однако основной путь транспорта из крови в ткань головного мозга проходит через клетки посредством морфофункциональной энергообразующей и энерготранспортной системы н-г-м, а не межклеточной—через интерстициальную жидкость. Следовательно, сократительные элементы мембран стенок капилляров (миоциты, пероциты, эндотелий и составляющие их сократительные белки) и окружающий их «плотный астроцитарный футляр» представляются автором основным субстратом, определяющим адекватный эпилептической активности обмен веществ и энергии между нейроглюальным комплексом и кровью капилляра-эффектора.

Изучаемая проф. Погодаевым К. И. пароксизмальная система н-г-м позволяет рассматривать механизмы регуляции локального кровообращения в терминах транспортных процессов. При этом, наряду со скалярным метаболизмом, автор рассматривает понятие векторного метаболизма между митохондриальным компартментом и цитоплазмой, а также между клетками, входящими в систему н-г-м, отличающимися по метаболической структуре. Химический и осмотический катализ ферментами и осмотический катализ переносчиками при участии соответствующих каналов (пор в мембранах) представляются как процессы, происходящие по механизму специфического переноса тех или иных лигандов и по механизму сопряжения между хемиосмотическими и чисто осмотическими реакциями. Эпилептический разряд неминуемо сопровождается потерей свободной энергии и увеличением энтропии (неупорядоченности) в пароксизмальной системе н-г-м и ее фрагментах разной сложности, что собственно и определяет направленность этиопатогенеза, его естественную метаболическую необходимость. Изменения мембранных электрохимических потенциалов при «разрядке и зарядке нейроглюального комплекса» приводят к образованию электромеханических волн и соответствующему перемещению потенциалобразующих ионов (главным образом K^+ и H^+) в пароксизмальной системе н-г-м, что в основном приводит к вазомотории микрососудов-эффекторов, описанной при эпилепсии.

Проф. Погодаев К. И. впервые представил многочисленные основополагающие факты по патохимии мозга и высказал новые, весьма продуктивные представления по этиопатогенезу и терапии эпилепсии, которые, несомненно, получат дальнейшую разработку и обогатят наши знания в эпилептологии и патохимии головного мозга.

БЕРЕЗОВ Т. Т.
ПАНЧЕНКО Л. Ф.
ФЕДОРОВ Н. А.



Рефераты статей, направленных на депонирование в ВИНТИ

УДК 547.466:577.164.15:612.81

СООТНОШЕНИЕ ЭНДОГЕННОЙ СВЯЗАННОЙ И СВОБОДНОЙ
ГАМК И КИНЕТИКА СВЯЗЫВАНИЯ [^{14}C]ГАМК В
ГОМОГЕНАТАХ ОТДЕЛОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

РЕЙТАРОВА Т. Е., РОЗАНОВ В. А., ТОЦКИЙ В. Н.

В 1967 г. Elliott обнаружил, что ГАМК существует в ЦНС в виде связанной и свободной форм. Они обнаруживаются в гомогенатах мозга, приготовленных на солевых растворах, но не на растворах сахарозы, и рассматриваются как проявление компартментализации ГАМК в нервной ткани. Поскольку в ряде современных исследований используется связывание меченой ГАМК и ее аналогов в гомогенатах, возникает вопрос, в какой мере эндогенная связанная ГАМК оказывает влияние на связывание добавленной меченой ГАМК.

С использованием метода центрифугирования Elliott исследовали содержание эндогенных свободных и связанных форм ГАМК и связывание добавленной [^{14}C]ГАМК ($0.2\text{--}2 \cdot 10^{-4}$ мкМ) в гомогенатах мозжечка, коры и стволовой части головного мозга крыс линии Wistar. Наименьшее содержание эндогенной связанной ГАМК обнаружено в мозжечке, в коре уровень связанной формы достоверно выше (соответственно 0.73 ± 0.12 и 1.07 ± 0.10 мкмоль $\cdot$ г $^{-1}$ ткани). На фоне этого обнаружено слабое связывание добавленной [^{14}C]ГАМК в гомогенатах мозжечка и значительно более выраженное связывание в коре ($K_s = 0.03$ мкМ; $V = 12.5$ пмоль $\cdot$ мг $^{-1}$ ткани $\cdot$ мин $^{-1}$). Этот эффект наблюдался при концентрациях добавленной [^{14}C]ГАМК $0.2\text{--}20$ мМ; при больших концентрациях связывание меченой ГАМК было практически одинаковым во всех отделах и в целом резко ослабевало. Одновременно отмечен достоверно более интенсивный выход метки при повторных промывках осадков гомогенатов мозжечка по сравнению с корой. Таким образом, в коре, где содержание связанной ГАМК выше, имеет место и усиленное связывание добавленной [^{14}C]ГАМК.

Полученные данные, вероятно всего, обусловлены особенностями клеточного состава исследованных отделов мозга, в частности преобладанием нейрональных элементов и нервных окончаний в коре.

10 с., ил. 2, библиогр. 13

Государственный университет им. И. И. Мечникова,
Медицинский институт им. Н. И. Пирогова, Одесса

Поступила 16. VII 1986

Рукопись депонирована в ВИНТИ



УДК 618.33—008.922.1—008.64—07:616.831—008.921.7—053.31—074

ВЛИЯНИЕ ВНУТРИУТРОБНОЙ ГИПОКСИИ НА СОСТАВ
БЕЛКОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

УВАРОВА Т. М., КУЗНЕЦОВА Т. В.

Задачей настоящего исследования было изучение влияния острой внутриутробной гипоксии на состав белков головного мозга в постнатальном периоде развития. Белки коры больших полушарий головного мозга и мозжечка крыс в возрасте 7, 11, 15 и 30 дней, солиubilизированные в результате поэтапной обработки детергентами тритоном X-100 и ДДС-На в присутствии 2-меркаптоэтанола, были проанализированы методом электрофореза в ПААГ с добавлением ДДС-На. Гипоксию моделировали пережатием сосудов пуповины плода без извлечения его из матки по оригинальной методике, разработанной в лаборатории. Гипоксии подвергались четыре плода от каждой самки на 18—19 день внутриутробного развития. Остальные плоды того же помета служили контролем. Параллельно анализировали мозг интактных животных того же возраста.

Установлено, что внутриутробная гипоксия вызывает изменение в определенных группах белков: для коры больших полушарий с величиной M_r 29—77 кД, для мозжечка—20—29 кД и выражается в различии числа полос на электрофореграммах. Отмечено изменение количественного соотношения белковых фракций у крыс, перенесших внутриутробную гипоксию. Эти изменения статистически значимы ($p < 0.01$) в интервале M_r 20—29 кД, причем в коре больших полушарий количество белков этой группы уменьшается, а в мозжечке, напротив, увеличивается.

В представленном исследовании впервые показано, что в отдаленные сроки после внутриутробной гипоксии наблюдаются заметные изменения в составе белков головного мозга. Можно предположить, что эти нарушения, в свою очередь, сказываются на морфологических и функциональных параметрах различных структур нервной системы. Гистологические исследования, проведенные в нашей лаборатории, позволяют предположить, что выявленные изменения белкового спектра связаны с повреждением проводниковых структур, нарушением процесса миелинизации.

Для выяснения механизмов влияния гипоксии на обмен белков мозга, а также структуры, функции и локализации в клетке белков, наиболее

чувствительных к гипоксии, в настоящее время проводятся дальнейшие исследования.

13 с., ил. 2, библиогр. 8
НИИ педиатрии АМН СССР, Москва

Поступила 20. I 1987

Рукопись депонирована в ВИНТИ

УДК 615.785.4.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ КАРБАМАТОВ И ОБРАТИМЫХ ИНГИБИТОРОВ ХОЛИНЭСТЕРАЗ В МОЗГУ МЫШЕЙ

БАЛАШОВА Е. К., РОЗЕНГАРТ В. И., ШЕРСТОБИТОВ О. Е.

В основе метода определения карбаматов лежит экстрагирование веществ из гомогената мозга (100 мг/мл) с последующим определением антихолинэстеразной активности. В качестве экстрагента в зависимости от строения карбамата и прочности его связывания со структурами мозга используются: вода (для эзерина), слабый раствор ТХУ (0,05% для байгона). Для других веществ можно использовать экстракцию 80%-ным спиртом. После центрифугирования (4000 оборотов/мин, 5 мин) надосадочную жидкость использовали для определения антихолинэстеразной активности по отношению к специально подобранному, наиболее чувствительному для каждого вещества тест-ферменту, например, бутирилхолинэстеразе из сыворотки крови лошади или АХЭ из *Fallopia* мш.

Для определения содержания обратимых ингибиторов в мозгу использовали другой принцип: способность соединений этого типа защищать АХЭ мозга от угнетения необратимой действующими фосфорорганическими ингибиторами, например, арпином. Готовили гомогенат мозга (25 мг/мл) контрольного и опытного животного, которому вводили обратимый ингибитор, например, такрин. После инкубации с необратимым ингибитором, приводящей в контроле к торможению на 70—80%, пробу разбавляли в 8 раз и добавляли субстрат для остановки реакции ингибирования и далее определяли активность фермента. Калибровочную кривую составляли для определения зависимости торможения АХЭ мозга необратимым ингибитором от концентрации такрина в пробе.

Чувствительность предлагаемых методов: для эзерина—0,04 мкг/г, для байгона 0,02 мкг/г и такрина—1 мкг/г, что позволяет обнаружить указанные антихолинэстеразные вещества при их введении мышам в субтоксических дозах.

8 с., ил. 2, библиогр. 2
Институт эволюционной физиологии
и биохимии им. И. М. Сеченова, Ленинград

Поступила 19. II 1987

Рукопись депонирована в ВИНТИ

303

ТОПОГРАФИЧЕСКАЯ СВЯЗЬ АЛЬДЕГИДДЕГИДРОГЕНАЗЫ С МОНОАМИНЭРГИЧЕСКИМИ СИСТЕМАМИ МОЗГА

ЗИМАТКИН С. М.

Известно, что значительная часть альдегидов мозга, образующихся при окислительном дезаминировании моноаминов (МА), особенно дофамина (ДА), окисляется альдегиддегидрогеназой (АльДГ: КФ 1.2.1.3). Проведенное нами количественное гистохимическое исследование АльДГ мозга крысы выявило сравнительно низкую активность фермента в перикарионах и аксонах МА-эргических (МАэ) нейронов. В то же время повышенная активность АльДГ обнаружена в области окончаний МАэ систем, особенно ДАэ в конечном мозгу: в полосатом теле, латеральной парофлаторной области, обонятельных бугорках, центральном ядре мивдалины. В конечном мозгу обнаружена корреляция между распределением по микроотделам активности АльДГ и плотности ДАэ терминалей, содержания ДА ($r=0,6-0,8$; $p<0,01$), а также содержания норадреналина (НА), серотонина (5-ОТ) ($r=0,5$; $p<0,05$) и активности МАО типа А ($r=0,8$; $p<0,01$). В промежуточном мозгу выявлена корреляция ($r=0,7$; $p<0,01$) между распределением активности АльДГ и содержания ДА, плотности ДАэ терминалей, активности МАО (с ДА и β -фенилэтиламином, но не с 5-ОТ в качестве субстрата). В заднем мозгу, где содержание ДА и ДАэ терминалей не велико, связь их распределения с АльДГ не обнаружена, однако здесь более четко проявляется корреляция распределения содержания НА, плотности НАэ и 5-ОТэ терминалей с АльДГ. Полученные результаты свидетельствуют о пространственной связи АльДГ с областями расположения терминалей МАэ систем мозга, предположительно с зонами повышенной нагрузки альдегидных производных МА, особенно ДА.

4 с., ил., библиогр. 11

Институт биохимии АН БССР, Гродно

Поступила 31. III 1987

Рукопись депонирована в ВИНТИ

СОДЕРЖАНИЕ

Уиттакер В. П. Модельная холинэргическая система: прошлые достижения и перспективы в будущем	161
Парфенова Е. В. ГАМК-рецепторы синаптических мембран и их эндогенные регуляторы в онтогенезе коры мозга крыс	172
Соломония Р. О., Собчинская Н. М., Микеладзе Д. Г. Изменение состояния холинорецептора мускаринового типа мозга при импринтинге у цыплят	180
Пак Д. Ф., Куликов А. В., Попова Н. К. Серотониновые рецепторы головного мозга во время зимней спячки	186
Арменян А. Р., Аракелян Л. Н., Срапионян Р. М., Карапетян Р. О., Саакян Ф. М., Саакян С. А., Галоян А. А. Влияние кардиоактивных нейрогормонов «Г» и «К» на высвобождение и захват [³ H]норадреналина в синапсоматах гипоталамуса	193
Круликов Р. И., Даш Т. Н., Коштова О. Х., Маркарова М. Ю., Пузырева Т. Г. О некоторых механизмах действия нейропептидов и их аналогов на процессы обучения и памяти	199
Сарибскян Г. А., Киракосова А. С., Галфаян В. Т., Галоян А. А. О природных ингибиторах и активаторах фосфодиэстераз циклических нуклеотидов из гипоталамуса крупного рогатого скота	206
Давыдов В. В., Скурыгин В. П., Якушев В. С. Транспорт Са ²⁺ в синапсоматах мозга крыс с некрозом миокарда	214
Таранова Н. П., Лучикова О. С. Иммунологическая реактивность антител к галактоцереброзидам миелина с различными по липидному составу антигенами	219
Краткие сообщения	
Акопян А. Р., Срапионян Р. М., Карапетян Р. О., Галоян А. А. Влияние кардиотропных нейрогормонов гипоталамуса на Са ²⁺ -токи в нейрональной мембране	227
Витвицкий В. Н., Викторов И. В., Шашкова Н. А. Влияние пептидных факторов мозга на включение предшественников в ДНК и белок культивируемой нервной ткани	231
Тигранян Р. А., Демин Н. Н., Ковалев В. Ю. Содержание полиаминов и специфических компонентов в различных отделах головного мозга крыс при стрессорных воздействиях. 1. Имобилизационный стресс	237
Эмирбекова Э. Э. Нейромедиаторные аминокислоты и пептиды и метаболизм белков при гипотермии и зимней спячке	244
Симомян А. А., Бодье Ж., Халид К. Т. Влияние нейроспецифического белка S-100 на АТФазную активность мозга	249
Клиникова В. А., Глушченко Т. С., Тенчева Ц. Влияние пирамета на метаболизм ядерных белков нейронов и глиоцитов некоторых структур головного мозга крысы в норме и при лишении парадоксальной фазы сна	254
Гуляева Н. В., Хоничева Н. М., Обидин А. Б. Супероксиддисмутазная активность и уровень малонового диальдегида в мозгу крыс «способной» и «неспособной» линий Трайона: связь с устойчивостью к стрессу	259

Методы исследований

Буданцев А. Ю. Использование додецилсульфата натрия для солюбилизации ир-реживающих срезов мозга	263
--	-----

Обзоры

Бурчинский С. Г., Фролькис М. В. Нейропептиды при старении	269
--	-----

Хроника

Виктор Иосифович Розенгарт (к 75-летию со дня рождения)	282
Равевский К. С., Азарян А. В. VI Конгресс Европейского общества нейрохимиков (Прага, ЧССР, сентябрь, 1986 г.)	284
Парсаданян Г. К. Нейрохимия на XVII Конференции ФЕБО (Зап. Берлин, август, 1986 г.)	288

Рецензии

Хайдарлиу С. Х. Н. М. Полякова, Я. В. Белик, И. Н. Власенко. «Александр Владимирович Палладин. Документы. Фотографии»	293
Парсаданян Г. К. Ф. Хучо «Нейрохимия. Основы и принципы»	295
Берсая Т. Т., Панченко А. Ф., Федоров Н. А. К. И. Погодаев «Эпилептология и патохимия мозга (к теории этиологии, патогенеза и лечения эпилепсии)»	298

Рефераты статей, направленных на депонирование в ВИННИТИ

Рейтарова Т. Е., Розанов В. А., Тоцкий В. Н. Соотношение эндогенной связанной и свободной ГАМК и кинетика связывания [14 C] ГАМК в гомогенатах отделов головного мозга крыс	301
Уварова Т. М., Кузнецова Т. В. Влияние внутриутробной гипоксии на состав белков головного мозга крыс	302
Балашова Е. К., Розенгарт В. И., Шерстобитов О. Е. Методы определения содержания карбаматов и обратимых ингибиторов холинэстераз в мозгу мышей	303
Зиматкин С. М. Топографическая связь альдегиддегидрогеназы с моноаминергическими системами мозга	304

CONTENTS

<i>Whittaker V. P.</i> A model cholinergic system: past achievements and future prospects	161
<i>Purfenova E. V.</i> GABA receptors and their endogenous regulation in rat brain synaptic membranes in ontogenesis	172
<i>Solomonik R. O., Sobchinskaya N. M., Mikeladze D. G.</i> Alteration of the muscarinic type cholinergic receptor amount in the chick LMHV during imprinting	180
<i>Pak D. F., Kulikov A. V., Popova N. K.</i> Serotonin receptors of the brain during hibernation	186
<i>Armenian A. R., Arakelton L. N., Shapionian R. M., Karapetian R. H., Sahakian F. M., Sahakian S. A., Galoyan A. A.</i> Effect of cardioactive neurohormones "G" and "K" on the release and uptake of ^3H -noradrenaline in hypothalamic synaptosomes	193
<i>Kruglikov R. I., Dish T. N., Koshtoyants O. Kh., Markarova M. Yu., Puzyreva T. G.</i> Effect of neuropeptides and their analogs on the chemoreactive properties of cortical neurons and on the histohematic barriers	199
<i>Saribekyan G. A., Kirakosov A. S., Galfayan V. T., Galoyan A. A.</i> Endogenous inhibitors and activators of cyclic nucleotide PDE from cattle hypothalamus	206
<i>Davydov V. V., Skurygin V. P., Yakushev V. S.</i> Transport of Ca^{2+} in the brain synaptosomes of rats with myocardial infarction	214
<i>Taranova N. P., Luchakova O. S.</i> Immunological reactivity of antibodies to myelin galactocerebroside with antigen suspensions varying in lipid composition	219

Short communications

<i>Akopyan A. R., Shapionyan R. M., Karapetyan R. O., Galoyan A. A.</i> Effect of cardiotropic neurohormones from hypothalamus on the Ca^{2+} currents in neuronal membrane	227
<i>Vitvitsky V. N., Victorov J. V., Shashkova N. A.</i> Effect of peptide factors from brain on the inclusion of precursors into DNA and protein in neurons tissue culture	231
<i>Tigranyan R. A., Doemin N. N., Kovalev V. Yu.</i> Polyamine and specific component content in the various parts of rat brain under stressor influences. I. Immobilization	237
<i>Emirbekov E. Z.</i> Neurotransmitter amino acids and peptides and protein metabolism during hypothermia and hibernation	244
<i>Simonian A. A., Bandler J., Haglid K. G.</i> Effect of S-100 protein on the ATPase activity in brain	249
<i>Klenikova V. A., Glushchenko T. S., Tencheva Z.</i> Effects of pyramet on metabolism of nuclear proteins of the neurons and glyocytes in some brain structures of normal and REM sleep deprived rats	254
<i>Gulyneva N. V., Khomitseva N. M., Obialt A. B.</i> Superoxide dismutase activity and level of malondialdehyde in the brain of "maze-bright" and "maze-dull" tryon strains of rats: relationship with the resistance to stress	259

Methods

<i>Budantsev A. Yu.</i> Solubilization of brain slices with sodium dodecylsulphate	253
--	-----

Reviews

<i>Burchinsky S. G., Frolik V. V.</i> Neuropeptides in aging	269
--	-----

Chronicles

<i>Victor Iosifovitch Rosengart</i> (on the 75th birthday)	282
<i>Raevsky K. S., Azaryan A. V.</i> VI Meeting of European Society for Neurochemistry (Prague, 1986)	284
<i>Parsadanyan G. K.</i> Neurochemical section of the XVIth Meeting of FEBS (West Berlin, 1986)	288

Comments

<i>Khaidarliu S. Kh., Polyakova N. M., Belik Ya. V., Vlasenko I. N.</i> "Alexander Vladimirovitch Palladin. Documents & photos"	293
<i>Parsadanyan G. K., Khucho F.</i> "Neurochemistry. Fundamentals and concepts"	295
<i>Berezov T. T., Panchenko L. F., Fedorov N. A., Pogodayev K. Y.</i> "Epileptology and brain patochemistry (etiology, patogenesis and treatment of epilepsy)"	298

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

<i>Reitarova T. E., Rozanov V. A., Totsky V. N.</i> Ratio of endogenous free and bound GABA and the kinetics of binding with different rat brain regions in homogenate	301
<i>Uvarova T. M., Kuznetsova T. V.</i> Effect of intrauterine hypoxia on the composition of rat brain proteins	302
<i>Balashova E. K., Rosengart V. I., Sherstobitov O. E.</i> Method of estimation of carbamate and cholinesterase reversible inhibitors content in mice brain	303
<i>Zimatkin S. M.</i> Topographic relation of aldehyde-dehydrogenase with brain monoaminoergic systems	304

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—1 с., а писем в редакцию—2 с.

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

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

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

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

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

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

Фамилии иностранных авторов даются в тексте на языке оригинала.

6. Список литературы составляется в порядке цитирования, его объем—до 25 названий для статей, до 80—для обзоров и до 15—для кратких сообщений. В тексте ссылки даются в квадратных скобках. Цитируемая литература в списке приводится в следующем порядке: порядковый номер, фамилия и инициалы авторов на языке оригинала, название журнала, том, номер или выпуск, страницы, год издания. В случае сложной нумерации страниц тома номер выпуска не указывать. При цитировании книги указывается также, под чьей редакцией она издана, название издательства и место издания.