

том 6, № 3, 1987

ISSN 0203-493X

НЕЙРОХИМИЯ

ՆԵՅՆՈՔԻՄԻԱ



АКАДЕМИЯ НАУК СССР
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

НЕЙРОХИМИЯ ՆԵՅՐՈՔԻՄԻԱ

ТОМ 6, ВЫП. 3
ИЮЛЬ—СЕНТЯБРЬ

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. Азизбеян

Сдано в набор 15.06. 1987 г. Подписано к печати 6.10. 1987 г. ВФ 01682.
Бумага № 1,70×108¹/₁₆. Высокая печать, п. л. 10,25 + 1 вкл. Усл. печ. лист. 14,35.
Учет.-изд. 11,4. Тираж 590. Заказ. 433. Издат. 7194.
Адрес редакции: 375014, Ереван-44, ул. П. Савица 5/1, т. 28-17-70, 28-16 52.
Издательство АН АрмССР, Ереван, 375019, пр. Маршала Баграмяна, 24 г.
Типография Издательства Академии наук АрмССР, Ереван-19,
пр. Маршала Баграмяна, 24.

Редакционная коллегия

А. А. ГАЛОЯН—главный редактор

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

Редакционный совет

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

К СВЕДЕНИЮ ЧИТАТЕЛЕЙ!

Журнал «НЕЙРОХИМИЯ» (орган АН СССР и АН Армении) основан в 1982 г. В нем публикуются 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 трансмиттеров и их рецепторов, глии и нейронов, хромоаффинных гра- нул и т. д.

С 1984 г. журнал «Нейрохимия» издается на английском языке. В журнале печатаются не только работы отечественных нейрохими- ков, но и зарубежных ученых.

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

Подписку на журнал «Нейрохимия» можно осуществить во всех отделениях «Союзпечати» (индекс для подписки—70637), а за гра- ницей через агентство «Международная книга». «Журнал выходит 4 раза в год, цена одного номера—3 руб. 30 коп.

РЕДКОЛЛЕГИЯ



УДК 577.352.46

ТРАНСПОРТ [^3H]ДОФАМИНА ЧЕРЕЗ СИНАПТОСОМНУЮ
МЕМБРАНУ: ВЛИЯНИЕ β -ФЕНИЛЭТИЛАМИНА

ЖАРИКОВ С. И., ЖАРИКОВА А. Д., ЮРИНСКАЯ М. М.

Институт биологической физики АН СССР, Пущино

Оценены скорости Na^+ -зависимого и Na^+ -независимого транспорта [^3H] дофамина (ДА) через мембраны синапсом неостригума головного мозга крыс. Установлено, что при начальной концентрации в инкубационной среде $1,1 \cdot 10^{-7}$ М накопление [^3H] ДА в синапсоммах за счет активного Na^+ -зависимого механизма транспорта составляет 52,9 пмоль/мг белка/5 мин, Na^+ -независимой облегченной диффузии — 12 пмоль/мг белка/5 мин, а величина связывания [^3H] ДА с синапсомными мембранами — 6,2 пмоль/мг белка/5 мин. Показано, что в присутствии β -фенилэтиламина транспорт [^3H] ДА через синапсомную мембрану ингибируется по конкурентному типу. Обсуждается, что ингибирующий эффект β -фенилэтиламина на транспорт [^3H] ДА опосредован через эндогенный ДА, высвобождающийся из синапсом под действием β -фенилэтиламина.

Обратный захват дофамина пресинаптическими окончаниями является насыщаемым процессом и опосредуется специальной мембранной транспортной системой [1]. Считается, что опосредованный переносчиком транспорт включает временное связывание нейромедиатора со специфическими участками переносчика и транслокацию образованного комплекса через пресинаптическую мембрану. На основании данных о зависимости процесса обратного захвата ДА от концентрации Na^+ и K^+ и от активности Na^+ , K^+ -АТФазы [2] предложена модель высокоаффинного транспорта ДА [3], согласно которой градиенты Na^+ и K^+ являются движущими силами для активного, то есть против градиента концентрации, накопления ДА в нервных терминалях. Поскольку проникающий в нервные окончания и вновь синтезируемый ДА депонируется в синаптических везикулах, концентрация ДА в цитоплазме может быть ниже, чем во внеклеточной среде. Поэтому не исключено, что накопление ДА в синапсоммах может происходить как с помощью вышеуказанного Na^+ -зависимого механизма, так и Na^+ -независимого, то есть путем облегченной диффузии через мембрану. Одна из задач нашей работы состояла в проведении оценки скоростей Na^+ -зависимого и Na^+ -независимого механизмов транспорта [^3H] ДА в синап-

тосомы. Несмотря на имеющиеся данные о факторах, влияющих на обратный захват ДА [4], относительно мало известно о регуляции этого процесса. Важную роль в регуляторных механизмах активного транспорта ДА могут играть эндогенные нейромодуляторы синаптической передачи [5], одним из которых является β -фенилэтиламин (β -ФЭА) [6]. В своей работе мы попытались охарактеризовать влияние β -ФЭА на процесс накопления [^3H]ДА в синапсосомах.

Материалы и методы

Для исследования захвата [^3H]ДА синапсосомами использовали P_2 -фракцию [7], выделенную из неостриатума головного мозга крыс линии Wistar массой 180–200 г. Осадок P_2 -фракции ресуспендировали в среде следующего состава (мМ): NaCl—132; KCl—5; MgSO_4 —1,3; NaH_2PO_4 —1,2; CaCl_2 —1,2; глюкоза—10; HEPES-буфер—5 (pH 7,4) с добавлением аскорбиновой кислоты—1 мМ и нинамида—12,5 мкМ. 50 мкл суспензии синапсосом помещали в инкубационную среду того же состава (конечный объем—1 мл), что и среда для ресуспендирования. Перед добавлением [^3H]ДА («Amersham», Англия, У. А. 3,2 Ки/ммоль) синапсосомы предварительно инкубировали с β -ФЭА или без него в течение 5 мин при 37°. Синапсосомы с добавленным [^3H]ДА инкубировали 5 мин, а для определения начальной скорости захвата [^3H]ДА—2 мин. Захват [^3H]ДА синапсосомами останавливали фильтрованием через мембранные миллиметровые фильтры (0,45 мкм). Осадок синапсосом на фильтрах промывали 3 раза по 5 мл средой инкубации при 20°. Параллельно аналогичные эксперименты проводили при 0°. Количество накопившегося в синапсосомах [^3H]ДА определяли как разность между значениями, полученными при 37° и 0°. Для определения Na^+ -зависимого захвата [^3H]ДА NaCl в инкубационной среде заменяли эквивалентным количеством LiCl. Оценку отношения [^3H]ДА в ткани и инкубационной среде проводили на гомогенате неостриатума, разбавленном в 200 раз. Радиоактивность с фильтров подсчитывали на счетчике «Intertechnique-SL 4000» (Франция). Достоверность экспериментальных данных оценивали по критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Соотношение распределения [^3H]ДА в ткани и инкубационной среде после инкубации синапсосом с [^3H]ДА в концентрации 0,11 мкМ в течение 15 мин при 37° составляет 51,8. Это свидетельствует о том, что [^3H]ДА накапливается в синапсосомах против градиента концентраций, то есть захват [^3H]ДА в синапсосомы осуществляется в значительной мере путем активного транспорта.

Как видно из таблицы, захват [^3H]ДА в синапсосомы зависит от температуры инкубации и наличия Na^+ в инкубационной среде. Захват [^3H]ДА при 0° составляет 9% от захвата при 37°. В среде Кребса—

Рингера при 37° радиоактивность, связанная с синапсомными мембранами, является показателем 3-х процессов: активного Na^+ -зависимого транспорта $[^3\text{H}]$ ДА в синапсомные мембраны, Na^+ -независимой облегченной диффузии $[^3\text{H}]$ ДА в синапсомные мембраны и связывания $[^3\text{H}]$ ДА с синапсомными мембранами. При замене в инкубационной среде Na^+ на Li^+ при 37° должны наблюдаться только облегченная диффузия $[^3\text{H}]$ ДА в синапсомные мембраны и его связывание с синапсомными мембранами, так как для функционирования мембранного переносчика, осуществляющего активный транспорт $[^3\text{H}]$ ДА, необходимо наличие Na^+ в инкубационной среде. Независимо от наличия Na^+ в среде при 0° определяемая в синапсомных мембранах радиоактивность обусловлена, главным образом, $[^3\text{H}]$ ДА, связавшимся с внешней поверхностью синапсомных мембран, так как при этой температуре активный захват и облегченная диффузия $[^3\text{H}]$ ДА в синапсомные мембраны незначительны и ими, вероятно, можно пренебречь. Исходя из этого, доля накопления $[^3\text{H}]$ ДА в синапсомных мембранах за счет активного Na^+ -зависимого механизма транспорта составляет 74%, Na^+ -независимой облегченной диффузии—18%, а величина связывания $[^3\text{H}]$ ДА с синапсомными мембранами—9%.

Таблица

Накопление $[^3\text{H}]$ дофамина в синапсомных мембранах при различных условиях инкубации* (п. 12)

Условия инкубации	Процессы, наблюдаемые при инкубации	Количество $[^3\text{H}]$ ДА, накопившегося в синапсомных мембранах (пмоль/5 мин)
Раствор Кребса-Рингера, 37°	Na^+ -зависимый транспорт, Na^+ -независимый транспорт, связывание с синапсомными мембранами	71.1 ± 0.4
Раствор Кребса-Рингера LiCl вместо NaCl , 37°	Na^+ -независимый транспорт, связывание с синапсомными мембранами	18.2 ± 2.4
Раствор Кребса-Рингера, 0°	связывание с синапсомными мембранами	6.6 ± 0.2
Раствор Кребса-Рингера с LiCl вместо NaCl , 0°		6.2 ± 1.3

Примечание. *Концентрация $[^3\text{H}]$ дофамина в среде в начале инкубации составляла 0,11 мкМ.

Исследование кинетики Na^+ -зависимого синапсомного захвата $[^3\text{H}]$ ДА показало, что этот процесс является насыщаемым и подчиняется ферментативной кинетике Михаэлиса-Ментен (рис. 1) с $K_m = 0,25$ мкМ и $V = 27,7$ пмоль/мг белка/мин, что согласуется с данными, полученными другими исследователями [8, 9]. Известно, что одним из ингибиторов захвата ДА в соответствующие нервные окончания является эндогенный симпатомиметический амин— β -ФЭА, механизм ингибирующего действия которого недостаточно изучен и понятен [6]. Показано, что β -ФЭА вызывает торможение захвата $[^3\text{H}]$ ДА в

синапсомы (рис. 2). Ингибирование захвата $[^3\text{H}]\text{ДА}$ составляет 1,4; 21,4 и 68% при концентрациях $\beta\text{-ФЭА}$ в инкубационной среде, равных соответственно 10^{-7} , 10^{-6} и 10^{-5} М. Константа ингибирования K_i для $\beta\text{-ФЭА}$, рассчитанная по методу Job и соавт. [10], составляет $7,4 \pm 0,4$ мкМ. Для определения типа ингибирования было исследовано влияние $\beta\text{-ФЭА}$ на кинетику захвата $[^3\text{H}]\text{ДА}$ синапсомы (рис. 1). Так как величина K_m возрастает, а V остается неизменной, можно было бы предположить, что $\beta\text{-ФЭА}$ конкурирует с $[^3\text{H}]\text{ДА}$ за места связывания на мембранном переносчике, транспортирующем ДА через синаптическую мембрану. Однако нами было показано [11], что ДА (10 мкМ) не влияет на процесс накопления $[^{14}\text{C}]\beta\text{-ФЭА}$ в синапсомы, который происходит путем облегченной диффузии ($K_m = 8,6$ мкМ; $V = 211$ пмоль/мг белка/мин). Из этого следует, что транспорт $[^3\text{H}]\text{ДА}$ и $[^{14}\text{C}]\beta\text{-ФЭА}$ через синапсомные мембраны, вероятно, осуществляется различными транспортными системами, и $\beta\text{-ФЭА}$ не является непосредственным конкурентным ингибитором захвата $[^3\text{H}]\text{ДА}$ в синапсомы. Очевидно, в основе ингибирующего действия $\beta\text{-ФЭА}$ на захват $[^3\text{H}]\text{ДА}$ в синапсомы лежит другой механизм.

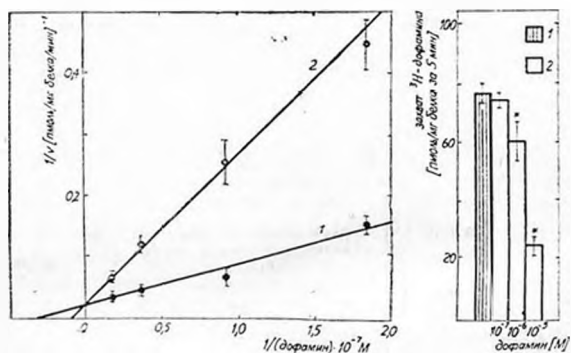


Рис. 1. Кинетика захвата $[^3\text{H}]\text{дофамина}$ синапсомы, выделенными из неостриатума головного мозга крыс, в координатах Лайнуивера-Берга в контроле (1) и в присутствии 10 мкМ $\beta\text{-фенилэтиламина}$ (2)

Рис. 2. Влияние $\beta\text{-фенилэтиламина}$ на захват $[^3\text{H}]\text{дофамина}$ синапсомы, выделенными из неостриатума головного мозга крыс. Начальная концентрация $[^3\text{H}]\text{дофамина}$ в инкубационной среде 0,11 мкМ; $p < 0,05$; 1—контроль, 2— $\beta\text{-фенилэтиламин}$

Известно, что кроме влияния на нейронный захват моноаминов, $\beta\text{-ФЭА}$ в большей степени усиливает высвобождение их из соответствующих нервных окончаний [12—14]. Нарушение захвата и высвобождения может наблюдаться и в том случае, если нарушено депонирование моноаминов в везикулах [15]. Несмотря на то, что транспорт моноаминов через нейронные мембраны и депонирование их в везику-

лах являются самостоятельными процессами, несомненно их тесная связь. Нейронный захват является самонасыщающимся процессом, что, по мнению Альтшулера и Граника [15], можно представить как постепенное заполнение моноаминами свободных мест в везикулярных депо. Поэтому предотвращение возможности депонирования должно приводить как к угнетению нейронного захвата, так и к увеличению концентрации моноаминов в цитоплазме. Проникая в синапсосомы путем облегченной диффузии [11], β -ФЭА, вероятно, нарушает депонирование эндогенного ДА. Предпосылкой такого предположения может служить тот факт, что *D*-амфетамин, метильное производное β -ФЭА, имеющее сходные с ним стимулирующие эффекты на ЦНС, связывается с везикулярной мембраной, создавая «катионный барьер», мешающий переносу нейромедиатора внутрь везикул [15]. В результате нарушения депонирования эндогенного ДА в везикулах возрастает концентрация цитоплазматического ДА, который, вероятно, связывается с мембранным переносчиком и по своему концентрационному градиенту начинает транспортироваться из синапсосом. Высвободившийся под действием β -ФЭА эндогенный ДА может конкурировать с [^3H] ДА за места связывания на мембранном переносчике, что приводит к ингибированию синапсосомного захвата [^3H] ДА.

Таким образом, учитывая вышесказанное, можно предположить, что ингибирующий эффект β -ФЭА на транспорт [^3H] ДА через синапсосомную мембрану опосредован эндогенным ДА, высвобождающимся из синапсосом под действием β -ФЭА.

TRANSPORT OF ^3H -DOPAMINE THROUGH THE MEMBRANES OF SYNAPTOSOMES. EFFECT OF β -PHENYLETHYLAMINE

ZHARIKOV S. I., ZHARIKOVA A. D., YURINSKAYA M. M.

Institute of Biological Physics, USSR Academy of Sciences, Poustchino

The aim of the present study was to estimate the rates of Na^+ -dependent and Na^+ -independent transport of ^3H -dopamine through the membranes of synaptosomes isolated from rat neostriatum. It was found that at initial concentration of $1.1 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ ^3H -dopamine accumulation by synaptosomes due to the active Na^+ -dependent transport is equal to 52.9 pmol/mg protein/5 min, whereas due to Na^+ -independent facilitated diffusion it equals 12 pmol/mg protein/5 min, and the binding of ^3H -dopamine to synaptosomal membranes accounts for 6.2 pmol/mg protein/5 min. We tried to characterize the effect of β -phenylethylamine as an endogenous neuromodulator on the process of ^3H -dopamine uptake by synaptosomes. It was shown that in the presence of β -phenyl-ethylamine ^3H -dopamine transport through the membranes of synaptosomes is inhibited in a competitive manner. It is suggested that an inhibitory effect of β -phenylethylamine on ^3H -dopamine transport is mediated by release of endogenous dopamine from synaptosomes induced by β -phenylethylamine.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Bogdanski D. P.*—In: *Transport Phenomena in the Nervous System* (eds. G. Levi, L. Battistin, A. Lajtha), p. 291–305, N. Y., Plenum Press, 1976.
2. *Holz R. W., Coyle J. T.* *Mol. Pharmacol.*, v. 10, № 5, p. 746–758, 1974.
3. *White T. D.*—In: *The Mechanism of Neuronal and Extraneuronal Transport of Catecholamines* (ed. D. Paton), p. 175–193, N. Y., Raven Press, 1976.
4. *Horn A. S.*—In: *Advances in Biochemical Psychopharmacology* (eds. P. J. Roberts, E. Costa, P. Greengard), v. 19, p. 25–33, N. Y., Raven Press, 1978.
5. *Elliott G. R., Barchas J. D.*—In: *Hormones and the Brain* (ed. D. de Wied), p. 43–52, N. Y., Raven Press, 1980.
6. *Sabelli H. C., Borison R. L., Diamond B. J., May J., Hovdala H. S.*—In: *Noncatecholic Phenylethylamines. Part 1. Phenylethylamine: Biological mechanisms and clinical aspects* (eds. A. D. Mosnaim, P. Wolf), p. 345–376, N. Y., Dekker, 1978.
7. *Gray E. G., Whittaker V. P.* *J. Anat. (Lond.)*, v. 96, № 1, p. 79–88, 1962.
8. *Snyder S. H., Coyle J. J.* *J. Pharmacol. and Exp. Ther.*, v. 165, № 1, p. 78–86, 1969.
9. *Horn A. S.*—In: *The Mechanism of Neuronal and Extraneuronal Transport of Catecholamines* (ed. D. Paton), p. 195–214, N. Y., Raven Press, 1976.
10. *Job D., Cochet C., Dhien A., Chamboz E. M.* *Anal. Biochem.*, v. 84, № 1, p. 68–77, 1978.
11. *Жариков С. И., Жарикова А. Д., Буданцев А. Ю.* Докл. АН СССР, т. 292, № 6, с. 1494–1497, 1987.
12. *Fuxe K., Grobecker H., Jonsson J.* *Eur. J. Pharmacol.*, v. 2, № 3, p. 202–207, 1967.
13. *Baker G. B., Raiteri M., Bertollini A., del Carmine R., Keane P. E., Martin J. L.* *J. Pharm. and Pharmacol.*, v. 28, № 5, p. 456–457, 1976.
14. *Жарикова А. Д., Годухин О. В.* Бюл. эксперим. биол. и мед. зып. 11, с. 574–576, 1984.
15. *Альтшулер Р. А., Граник В. Г.* Журн. Всесоюзн. хим. об-ва им. Д. И. Менделеева, т. 21, № 2, с. 171–181, 1976.

Поступила 5. II 1986



ТОРМОЖЕНИЕ КОНВУЛЬСАНТАМИ АКТИВНОГО ТРАНСПОРТА ПРОТОНОВ В МЕМБРАНАХ СИНАПТИЧЕСКИХ ПУЗЫРЬКОВ МОЗГА: БЛОКАДА АНИОННОГО КАНАЛА

МЕЛЬНИК В. И., КРЫЖАНОВСКИЙ Г. Н., ШУКАЛОВА Т. Ф.,
ТИТОВ С. Ю., ГЛЕБОВ Р. Н.

НИИ общей патологии и патологической физиологии АМН СССР, Москва

Изучено влияние некоторых конвульсантов на активный транспорт протонов и активность H^+ -АТФазы в мембранах синаптических пузырьков мозга крыс. Конвульсанты ингибировали транспорт H^+ , располагаясь по их эффективности в следующем порядке: биккуллин > пикротоксин > пенициллин > бемеград > коразол. Величины I_{50} составили 0,12; 1,0; 2,7; 10 и 13 мМ соответственно. Конвульсанты, за исключением пенициллина, практически не влияли на активность H^+ -АТФазы, чувствительной к ингибированию N-этилмалеймидом. Следовательно, торможение активного транспорта H^+ не обусловлено прямым ингибированием H^+ -насоса или разобщающим действием конвульсантов. Поэтому механизм ингибирования транспорта H^+ может заключаться в блокаде анионного канала, приводящей к нарушению функционального сопряжения между транспортом H^+ и Cl^- , необходимого для генерации градиента рН в мембране синаптических пузырьков.

Важнейшие функции синаптических пузырьков (СП) в нервных окончаниях мозга—активный захват медиаторов и их предшественников из цитоплазмы, активность ферментов метаболизма медиаторов—связаны с наличием трансмембранного градиента рН (внутри рН около 5), который поддерживается H^+ -насосом (H^+ -транспортной АТФазой) [1—3]. Активность H^+ -насоса, в свою очередь, функционально сопряжена с анионным каналом, специфичным для ионов Cl^- : сопряженный транспорт H^+ и Cl^- имеет электронейтральный характер, без такого сопряжения генерируемый H^+ -насосом мембранный потенциал препятствует образованию сколько-нибудь значительной разности рН (ΔpH) [3]. Тем самым, анионный канал, вернее его проводимость для анионов, является важным регулятором метаболизма медиаторов в СП.

В ходе исследования анионной регуляции активного транспорта H^+ в мембранах СП мы обнаружили, что он ингибируется некоторыми анионами, которые действуют, вероятно, на анионный канал, блокируя сопряжение между транспортом H^+ и Cl^- [3]. В числе таких анионов

оказались тиоцианат (SCN^-) и перхлорат (ClO_4^-), являющиеся эффективными конвульсантами и вызывающие эпилептические явления у животных и человека [4]. Механизм эпилептогенного действия тиоцианата и перхлората предположительно связывали с ингибированием транспорта анионов, однако ни клеточная, ни субклеточная локализация транспортной системы не были твердо установлены [4]. Блокада (прямая или косвенная) каналов анионной проводимости и синаптических, рецепторзависимых, связанных с действием тормозных медиаторов, и внесинаптических, предполагается в качестве общего механизма действия целой группы конвульсантов, включающей биккукулин, пикротоксин, пенициллин, коразол [4, 5] и бемеград [6].

В связи с этим представляло интерес выяснить, является ли ингибирование несинаптических анионных каналов общим свойством этой группы конвульсантов. С этой целью исследовали их действие на активный транспорт H^+ в мембранах СП, который в определенных условиях лимитируется состоянием проводимости анионного канала. Чтобы установить, какой элемент сопряженной системы ко-транспорта H^+ и Cl^- подвержен влиянию конвульсантов— H^+ -насос или Cl^- -канал, параллельно исследовали их влияние на активность H^+ -транспортной АТРАЗы мембран СП.

Материалы и методы

Очищенные мембраны СП получали методом дифференциального центрифугирования осмотически разрушенной фракции синапсом мозга крыс [1, 3].

Активный транспорт H^+ измеряли методом непрерывной регистрации изменений флуоресценции слабого основания акридиноранжа [1, 3]. Среда измерения содержала 2 мкМ акридиноранжа, 150 мМ KCl, 20 мМ HEPES/трис pH 7,4 при 25°. Через 4 мин после добавления мембран СП (7—15 мкг белка/мл) инициировали транспорт добавлением 1 мМ Mg-АТР. Исследуемые соединения (конвульсанты) вносили перед добавлением мембран СП. Транспортную активность выражали с помощью двух параметров—скорости транспорта и стационарной аккумуляции протонов [3].

АТРАЗные активности определяли путем инкубации мембран СП (15—25 мкг белка/мл) в среде, содержащей 150 мМ KCl и 20 мМ HEPES/трис pH 7,4 при 37°, а также исследуемые конвульсанты и другие агенты $\pm 0,2$ мМ N-этилмаленимид (NEM). В части опытов вместо KCl среда содержала 300 мМ сахарозу и 10 мМ протонофор карбоинилцианид л-хлорофенилгидразон (ХКФ). После 20 мин преинкубации мембран в среде инициировали реакцию добавлением 2 мМ Mg-АТР и через 30 мин останавливали и определяли содержание освободившегося при гидролизе АТР P_i одностадийным методом с помощью стоп- P_i реактива [3]. Активность H^+ -АТРАЗы рассчитывали как разность между общей АТРАЗной активностью, измеренной в отсутствие

NEM, и «базальной» активностью, измеренной в присутствии NEM [3]. «Базальную» активность вычисляли по разности содержания фосфата между пробами, инкубировавшимися в присутствии мембран СП, и теми, в которые белок добавляли после остановки реакции.

В работе использовали бикукуллин и пикротоксин («Serva», ФРГ), ГАМК («Reanal», Венгрия), пенициллин (бензилпенициллин Г), бемебрид, коразол и феназепам отечественного производства.

Бикукуллин и пикротоксин растворяли в небольшом количестве 1 М HCl или 0,2 М триса, соответственно, при небольшом нагревании. После разбавления бидистиллированной водой их растворы содержали 10 мМ бикукуллин в 10 мМ HCl и 20 мМ пикротоксин в 4 мМ трисе. Бикукуллин, который плохо растворим при нейтральных значениях pH, при максимальной его концентрации (1 мМ) вызывал помутнение проб, однако после легкого нагревания помутнение исчезало и пробы оставались прозрачными за время эксперимента. Феназепам сначала растворяли в этаноле до 2 мМ концентрации, затем разбавляли водой в 10 раз. Остальные агенты применяли в виде водных растворов.

Результаты исследований

Все исследованные конвульсанты блокировали активный транспорт H^+ в мембранах СП концентрационнонезависимым образом (рис. 1). Самым сильным ингибитором был бикукуллин, для которого I_{50} (концентрация полумаксимального ингибирования) составила 0,12 мМ. По эффективности ингибирования остальные конвульсанты располагались в следующем порядке: пикротоксин $\gg$ пенициллин $>$ бемебрид $>$ коразол, их величины I_{50} равнялись 1,0; 2,7; 10 и 13 мМ соответственно. Приведенные на рис. 1 концентрационные зависимости основаны на использовании аккумуляции H^+ в качестве характеристики транспорта протонов, однако идентичные зависимости были получены при использовании другой характеристики—скорости транспорта, как это наблюдалось при исследовании действия других соединений [3].

Исследованные конвульсанты сами по себе не влияли на уровень флуоресценции зонда, в отличие от двух других конвульсантов—тиоцианата и перхлората [3]. Ни ГАМК, ни феназепам в достаточно высоких концентрациях (1,0 мМ и 1,0 мкМ соответственно) не предотвращали ингибирования транспорта конвульсантами, следовательно, действие последних не опосредовано ГАМК/бензодиазепин-рецепторным комплексом, о чем также свидетельствуют высокие значения I_{50} для бикукуллина и пикротоксина [7].

В общем случае возможны три механизма ингибирования активного транспорта H^+ . Первый из них заключается в прямом торможении активности H^+ -транспортной АТФазы, катализирующей векторную транслокацию H^+ . Второй механизм состоит в не прямом, разобщающем действии, которое может быть обусловлено либо протонотормящим эффектом, создающим высокую проницаемость для H^+ , либо эффектом проницающих слабых оснований, устраняющих ΔpH в результате протони-

рования их в кислой внутривезикулярной среде, подобно аммиаку или, скажем, трифлазину, действие которого описано нами ранее [8]. Эффекты разобщителей должны проявляться в стимуляции активности H^+ -АТФазы, работающей в их присутствии вхолостую. Наконец, третья возможность—блокада анионного канала, обеспечивающего электронейтральность суммарного процесса транслокации H^+ и Cl^- . Устраняя генерацию ΔpH , блокада анионного канала не должна приводить к существенным изменениям активности H^+ -АТФазы.

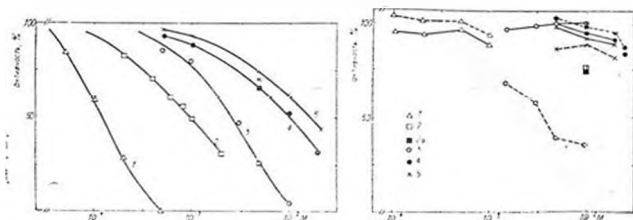


Рис. 1. Действие конвульсантов на аккумуляцию протонов H^+ -насосом мембран синаптических пузырьков: 1—биккуллиин, 2—пикротоксин, 3—пенициллин, 4—бемегрид, 5—коразон.

Рис. 2. Влияние конвульсантов на активность H^+ -АТФазы (---) и «базальной», NEM резистентной АТФазы (—) мембран синаптических пузырьков в присутствии 0,15 М KCl: 1—биккуллиин, 2—пикротоксин (H^+ -АТФаза), 2а—пикротоксин («базальная» АТФаза), 3—пенициллин, 4—бемегрид, 5—коразон.

При измерении активности H^+ -АТФазы в среде, оптимальной для транспорта протонов, конвульсанты (за исключением пенициллина) проявляли незначительное влияние (рис. 2) в том диапазоне концентраций, в котором они сильно ингибировали транспорт H^+ . «Базальная» АТФазная активность, наблюдаемая в присутствии NEM, тоже мало зависела от присутствия конвульсантов. Сходные результаты были получены при измерении активности H^+ -АТФазы в разобленном состоянии—в сахарозной среде в присутствии протонофора ЖКФ (данные не приводятся).

Так как стимуляция активности H^+ -АТФазы не отмечалась, возможность проявления конвульсантами свойств разобщителей можно исключить из рассмотрения. Выраженным ингибирующим действием обладал только пенициллин, причем даже в концентрации, практически полностью подавляющей активный транспорт H^+ (рис. 1), пенициллин тормозил активность H^+ -АТФазы только наполовину (рис. 2). Следовательно, прямое ингибирование активности H^+ -транспортной АТФазы, даже весьма заметное, не может являться основным механизмом действия конвульсантов на транспорт H^+ . Поэтому в основе ингибирования конвульсантами активного транспорта H^+ может лежать только один из возможных механизмов, а именно, блокада анионного канала.

Обсуждение результатов

Полученные результаты показывают, что исследованные конвульсанты подавляют активный транспорт H^+ в мембранах СП мозга путем блокады функционально сопряженного с H^+ -насосом Cl^- -канала. Такое действие конвульсантов, в первую очередь, можно сопоставить с их действием на Cl^- -проводимость, опосредованную ГАМК/бензодиазепин-рецепторным комплексом. Правда, механизмы действия конвульсантов на этот процесс могут различаться. Классические антагонисты синаптического действия ГАМК—биксукуллин и пикротоксин действуют на разных уровнях. Первый является конкурентным ингибитором связывания ГАМК с рецептором, а второй, не влияя прямо на связывание медиатора, взаимодействует с особым участком, получившим название конвульсантного, который локализован непосредственно на хлоридном канале или вблизи него [7]. В обоих случаях связывание конвульсанта в конечном счете блокирует транслокацию Cl^- , лежащую в основе физиологического действия тормозного медиатора.

Остальные исследованные нами конвульсанты проявляют себя в отношении ГАМК-рецепторного комплекса аналогично пикротоксину (а не биксукуллину). Так, пенициллин антагонизирует синаптическое действие ГАМК, блокируя индуцированное медиатором повышение проницаемости для хлорида [5, 9]. Такой же эффект—блокада синаптического действия ГАМК [9, 10], обусловленная подавлением Cl^- -проницаемости [10] вследствие связывания с конвульсантным участком [11, 12], характерен и для коразола. Бемеград антагонизирует синаптическое действие ГАМК [6, 13] неконкурентным образом [13], не влияя прямо на связывание ГАМК [14].

В мембране СП хлоридный канал, конечно, не связан с ГАМК-рецептором. Примечательно, что его блокируют не только те конвульсанты, которые взаимодействуют с Cl^- -каналом ГАМК-рецептора, но и биксукуллин. Более того, биксукуллин является самым сильным блокатором в этой группе. Однако средство к нему (в данном случае величина I_{50}) Cl^- -канала мембраны СП более чем на порядок ниже, чем средство ГАМК-рецептора [7]. В то же время и средство к остальным конвульсантам также отличается от средства к ним конвульсантного участка ГАМК-рецепторного комплекса, особенно в отношении пикротоксина [7, 11, 12, 14]. Таким образом, несмотря на то, что все конвульсанты, способные взаимодействовать с ГАМК-рецепторным комплексом, являются блокаторами Cl^- -канала мембраны СП, последний обладает своим, характерным для него, фармакологическим профилем.

Блокада анионного канала мембраны СП наблюдается при таких концентрациях конвульсантов, при которых для них характерны не только синаптические, опосредованные через ГАМК-рецепторный комплекс, но и несинаптические эффекты. Несинаптическое действие описано для пенициллина [5, 15], пикротоксина [16—18], биксукуллина

[15, 18] и наблюдается при более высоких концентрациях, чем синаптическое действие. Несинаптические эффе́кты конвульсантов заключаются прежде всего в увеличении сопротивления мембраны и снижении ионной проводимости, что сопровождается частичной деполяризацией. Это приводит к увеличению возбудимости мембраны, что может еще более усилить синаптическое действие конвульсантов, обусловленное снятием тормозных влияний [5]. Истинные механизмы, лежащие в основе несинаптического действия конвульсантов, изучены слабо вследствие значительных методических трудностей, их связывают с ингибированием либо хлоридной [5], либо калиевой [15] проводимости.

Как было указано ранее [3], между Cl^- -каналом мембраны СП и внесинаптическими анионными каналами наблюдается заметное сходство. Оно проявляется в значительной близости (если не идентичности) их кинетических свойств: анионной специфичности, отношении к ингибиторам, величине K_m для Cl^- [3]. Совпадение диапазонов концентраций, в которых проявляется несинаптическое действие конвульсантов и блокирование ими Cl^- -канала мембраны СП вместе с отмеченной близостью свойств двух анионных каналов свидетельствуют в пользу того, что несинаптическое действие конвульсантов вызвано инактивацией внесинаптических анионных каналов [6]. К сожалению, достаточно надежные биохимические методы изучения Cl^- -канала, разработанные для мембран СП [4], используют уникальную особенность этих мембран — функциональное сопряжение между H^+ -насосом и Cl^- -каналом, и поэтому непригодны для изучения анионных каналов в тех мембранах, которые лишены такого сопряжения.

Физиологические последствия блокады анионного (хлоридного) канала и связанного с этим ингибирования активного транспорта протонов в мембране СП оценить в настоящее время пока трудно. Несомненно, они должны включать серьезные нарушения метаболизма медиаторов, в частности, в тех его аспектах, которые регулируются трансмембранным градиентом рН в синаптических пузырьках. Тот факт, что по эффективности блокирования анионного канала мембраны СП конвульсанты располагаются в том же порядке, который характеризует их относительные конвульсантные свойства *in vivo* [4, 6, 13,], позволяет считать, что этот эффект может играть роль в их эпилептогенном действии. Выявляемое при анализе наших результатов и литературных данных многообразие возможных мишеней действия (ГАМК-рецепторный комплекс, внесинаптические анионные каналы, система сопряженного транспорта H^+ и Cl^- в СП) позволяет объяснить тонкие отличия между представителями этой достаточно однородной группы конвульсантов (в которую можно включить также тиоцианат и перхлорат) в отношении некоторых клинических проявлений и в их ответе на фармакологические воздействия.

С другой стороны, конвульсанты могут оказаться полезным средством для изучения хлоридного канала мембраны СП, его структуры и функции, сопряжения с H^+ -насосом, сходства и различий с другими

аннионными каналами, в особенности теми, которые локализованы в различных синаптических и внесинаптических участках нейрональных мембран.

INHIBITION OF THE ACTIVE PROTON TRANSPORT IN BRAIN SYNAPTIC VESICLES MEMBRANES BY CONVULSANTS: BLOCK OF AN ANION CHANNEL

MELNIK V. I., KRYZHANOVSKY G. N., SHUKALOVA T. F.,
TITOV S. Yu., GLEBOV R. N.

Research Institute of General Pathology and Pathophysiology,
Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

The effects of some convulsants on the active proton transport and H^+ -ATPase activity were studied in synaptic vesicle membranes from rat brain. The convulsants inhibited the H^+ transport with the rank order of potencies: bicuculline $\gg$ picrotoxin $\gg$ penicillin $\gg$ bemegride $\gg$ pentylenetetrazole. Corresponding I_{50} values were 0,12; 1,0; 2,7; 10 and 13 mM. H^+ -ATPase activity sensitive to inhibition by N-ethylmaleimide was relatively unaffected by convulsants except for penicillin which inhibited it maximally by 50%. Therefore, the inhibition of the active H^+ transport is not due to a direct action on the H^+ -pump or to an uncoupling effect of the convulsants. The mechanism of the inhibition thus appears to represent a block of an anion channel resulting in an impairment of the functional coupling between the H^+ and Cl^- fluxes involved in the generation of a pH gradient across the membrane of synaptic vesicles.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мельник В. И., Глебов Р. Н., Крыжановский Г. Н. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 99, № 1, с. 35—38, 1985.
2. Stadler H., Taukita S. EMBO J., v. 3, № 13, p. 3333—3337, 1984.
3. Мельник В. И., Глебов Р. Н. Всесоюз. конф. по нейронаукам. Тезисы докл. Киев, с. 33, 1986.
4. Woodbury D. M. Adv. Neurol., v. 27, p. 249—303, 1980.
5. Hochner B., Spira M. E., Werman R. Brain Res., v. 107, № 1, p. 85—103, 1976.
6. Scholfield C. N. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., v. 318, № 4, p. 274—280, 1982.
7. Olsen R. W., Wong E. H. F., Stavber G. B., King R. G. Federat. Proc., v. 43, № 13, p. 2773—2778, 1984.
8. Антониюков Н. М., Мельник В. И., Глебов Р. Н. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 102, № 12, с. 714—717, 1986.
9. Macdonald R. L., Barker J. L. Nature, v. 267, № 5613, p. 720—721, 1977.
10. Pellmar T. C., Wilson W. A. Science, v. 197, № 4306, p. 912—914, 1977.
11. Squires R. F., Suederup E., Grawley J. N., Skolntek P., Paul S. M. Life Sci., v. 35, № 14, p. 1439—1444, 1984.

12. Ramanjaneyulu R., Ticku M. K. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 98, № 3/4, p. 337—346, 1984.
13. Simmonds M. A. *Brit. J. Pharmacol.*, v. 63, № 3, p. 495—502, 1978.
14. Skerritt J. H., Johnston G. A. R. *Neurochem. Res.*, v. 8, № 10, p. 1351—1362, 1983.
15. Heyer E. J., Nowak L. M., Macdonald R. L. *Brain Res.*, v. 232, № 1, p. 41—56, 1982.
16. Ozeki M., Freeman A. R., Grundfest H. *J. Gen. Physiol.*, v. 49, № 6, p. 1334—1349, 1966.
17. Barker J. L., MacDonald J. F. *Science*, v. 208, № 4447, p. 1054—1056, 1980.
18. Freeman A. R. *J. Neurobiol.*, v. 4, № 6, p. 567—582, 1973.

Поступила 20. III 1986

ЧАРЧЛЭНД П. С. Нейрофилософия. К объединенной науке о мышлении мозга (англ.). 524 с.

Churchland Patricia S. Neurophilosophy. Toward a Unified Science of the Mind Brain. 524 p.

По словам D. C. Dennet, «Нейрофилософия» является тем введением в нейронауки, в котором нуждаются философы, и тем введением в философию мышления, в котором нуждаются нейробиологи. Пять глав первой части книги, объединенные в разделе «Элементарные понятия нейронаук», посвящены описанию истории науки о нервной системе и служат общим введением в нейроанатомию и нейропсихологию. Во второй части, озаглавленной «Последние достижения в философии науки», выдвигается проблема взаимосвязи между мыслью и организмом в широком контексте философии науки. Основываясь на новейших достижениях в этой области, автор приводит аргументы в пользу редукционистской стратегии и современные объяснения на традиционную критику ее со стороны дуалистов и антиредукционистов. Книгу завершает третья часть «Перспективы нейрофилософии», где представлены и обсуждаются некоторые из наиболее обещающих теоретических разработок, ныне применяющихся в функциональной нейробиологии и коннекционистских моделях, связанных с работами по искусственному интеллекту.

12. *Ramanjaneyulu R., Ticku M. K.* Eur. J. Pharmacol., v. 98, № 3/4, p. 337—346, 1984.
13. *Simmonds M. A.* Brit. J. Pharmacol., v. 63, № 3, p. 495—502, 1978.
14. *Skerritt J. H., Johnston G. A. R.* Neurochem. Res., v. 8, № 10, p. 1351—1362, 1983.
15. *Heyer E. J., Nowak L. M., Macdonald R. L.* Brain Res., v. 232, № 1, p. 41—56, 1982.
16. *Ozeki M., Freeman A. R., Grundfest H.* J. Gen. Physiol., v. 49, № 6, p. 1334—1349, 1966.
17. *Barker J. L., MacDonald J. F.* Science, v. 208, № 4447, p. 1054—1056, 1980.
18. *Freeman A. R.* J. Neurobiol., v. 4, № 6, p. 567—582, 1973.

Поступила 20. III 1986

ЧАРЧЛЭНД П. С. Нейрофилософия. К объединенной науке о мышлении мозге (англ.). 524 с.

Churchland Patricia S. Neurophilosophy. Toward a Unified Science of the Mind Brain. 524 p.

По словам D. C. Dennet, «Нейрофилософия» является тем введением в нейронауку, в котором нуждаются философы, и тем введением в философию мышления, в котором нуждаются нейробиологи. Пять глав первой части книги, объединенные в разделе «Элементарные понятия нейронаук», посвящены описанию истории науки о нервной системе и служат общим введением в нейроанатомию и нейропсихологию. Во второй части, озаглавленной «Последние достижения в философии науки», выдвигается проблема взаимосвязи между мыслью и организмом в широком контексте философии науки. Основываясь на новейших достижениях в этой области, автор приводит аргументы в пользу редукционистской стратегии и современные объяснения на традиционную критику ее со стороны дуалистов и антиредукционистов. Книгу завершает третья часть «Перспективы нейрофилософии», где представлены и обсуждаются некоторые из наиболее обещающих теоретических разработок, ныне применяющихся в функциональной нейробиологии и коннекционистских моделях, связанных с работами по искусственному интеллекту.



УДК 577.7:591.481.1:547.965

Ca^{2+} -ЗАВИСИМОЕ ВЫСВОБОЖДЕНИЕ НЕЙРОМЕДИАТОРНЫХ АМИНОКИСЛОТ ИЗ НЕРВНЫХ ОКОНЧАНИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА БЕЛЫХ КРЫС ПРИ СТАРЕНИИ

АПРИКЯН Г. В., ГЕКЧЯН К. Г., ВАРТАНЯН А. А.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Исследовали роль Ca^{2+} в высвобождении нейромедиаторных аминокислот из нервных окончаний головного мозга белых крыс при старении. Установлено, что K^{+} -вызванное, Ca^{2+} -зависимое и Ca^{2+} -независимое высвобождение нейромедиаторных аминокислот из синапсом значительно снижается в старческом возрасте. Удаление Ca^{2+} из среды приводит к резкому подавлению высвобождения [^{14}C] глутаминовой кислоты (ГК), [^{14}C] аспарагиновой кислоты (АК), [^{14}C] ГАМК у обеих возрастных групп, причем возрастное различие в степени подавления высвобождения несущественно, хотя в старческом возрасте такое подавление происходит на сниженном фоне высвобождения.

В последние годы все больше накапливается экспериментальных данных, указывающих на то, что зависимость от Ca^{2+} является универсальной чертой любого активного секреторного процесса [1, 2]. Полагают, что существование Ca^{2+} зависимого, вызванного деполяризацией высвобождения является одним из основных свойств нейромедиаторов [3—5], а появление этого процесса вместе с поглощением высокого сродства считается показателем нейронального и, в частности, синапсомного созревания [6].

В настоящее время можно считать установленным существование двух пулов нейромедиатора: Ca^{2+} -зависимого, везикулярного пула, предполагающего выделение медиатора посредством экзоцитоза, и Ca^{2+} -независимого цитоплазматического пула. Выделение медиатора в этом случае связывают с мембранно-транспортными системами [7, 8]. Следует отметить, что индуцированный деполяризацией Ca^{2+} -независимый выход может осуществляться всеми клеточными субфракциями (микросомной и т. д.), глией, тогда как Ca^{2+} -зависимый ограничен синапсомной фракцией [7, 9, 10]. Некоторые блокаторы Ca^{2+} -каналов, например, дифенилгидантоин, активно применяются в психиатрической практике. Изучение роли Ca^{2+} в высвобождении медиатора при старении способствует расширению наших знаний о молекулярных механизмах высвобождения нейромедиаторных аминокислот и открывает новые возможности регуляции этого процесса.

Ранее было показано, что высвобождение нейромедиаторных аминокислот— $[^{14}\text{C}]\text{ГК}$, $[^{14}\text{C}]\text{АК}$ и $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ из синапсом головного мозга белых крыс при старении значительно снижается [11].

Настоящая работа посвящена исследованию влияния Ca^{2+} -свободной среды на высвобождение нейромедиаторных аминокислот из синапсом головного мозга белых крыс при старении.

Материалы и методы

Эксперименты проводились на 4—6-месячных (молодые) и 24—36-месячных (старые) белых крысах линии *Wistar*, содержащихся на одинаковом пищевом рационе и в идентичных условиях. Животных декапитировали и на холоду извлекали головной мозг. В экспериментах использовали головной мозг без мозжечка и продолговатого мозга.

Синапсомы выделяли по методу Hajos [12]. Полученную синаптическую фракцию осторожно разбавляли 1:1 холодной водой и осаждали центрифугированием при 18000 g в течение 30 мин. Осадок ресуспендировали в 0,32 М сахарозе. Для инкубации и перфузии использовали буфер, содержащий (в мМ): трис- HCl (рН 7,4)—35; NaCl —128; KCl —5; CaCl_2 —2,7; MgSO_4 —1,2; глюкозы—10. С целью предотвращения метаболизма $[^{14}\text{C}]$ аминокислот в буфер добавляли аминоксикусусную кислоту— $5 \cdot 10^{-4}$ М. Ca^{2+} -свободная среда содержала также 0,2 мМ ЭГТА. Высвобождение нейромедиаторных аминокислот изучали суперфузионным методом Raiteri и соавт. [13] непосредственно после выделения синаптической фракции (первая инкубация) и повторно после 40-минутного выдерживания при 3—4° (вторая инкубация). Синаптическую суспензию (100 мкл, содержащую 1,5—1,7 мг белка) добавляли к 2 мл буфера и инкубировали 5 мин при 37°, после чего добавляли меченую аминокислоту $[^{14}\text{C}]\text{ГК}$, $[^{14}\text{C}]\text{АК}$, $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ в конечной концентрации 10^{-6} М и продолжали инкубацию еще 15 мин. Затем по 1 мл инкубационной смеси помещали в суперфузионную камеру на ДА-миллиметровые фильтры диаметром пор 0,65 мкм („Millipore Corp.“, Bedford, USA) и промывали 0,15 М NaCl . Продолжая суперфузию, устанавливали конечную скорость 1 мл/мин. Через 6—8 мин, когда устанавливалась относительно постоянная скорость выхода радиоактивности, отбирали пробы по 0,5 мл/0,5 мин. По истечении соответствующего времени к пробам и фильтру добавляли по 10 мл сцинтиллятора Брея и считали радиоактивность на жидкостном сцинтилляционном счетчике „Roche Bioelectronique Kontvon“ (Франция). Величину высвобождения (f) рассчитывали как отношение радиоактивности в перфузате к ее общему количеству в данный момент в синапсомах и на фильтре. Белок определяли по Lowry и соавт. [14]. В опытах использовали $[^{14}\text{C}]$ ГК (200 мКи/ммоль), $[^{14}\text{C}]$ АК (160 мКи/ммоль) и $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ (15 мКи/ммоль) фирмы «Chenapol» (ЧССР).

Результаты и обсуждение

Имеющиеся в литературе данные о роли Ca^{2+} в процессе высвобождения нейромедиаторных аминокислот указывают на то, что удаление его из среды перфузии значительно подавляет высвобождение ГК, АК и ГАМК из нервных окончаний головного мозга различных животных в молодом возрасте [15—17]. Однако вопрос о роли Ca^{2+} в процессе высвобождения нейромедиаторов при старении до сих пор остается открытым.

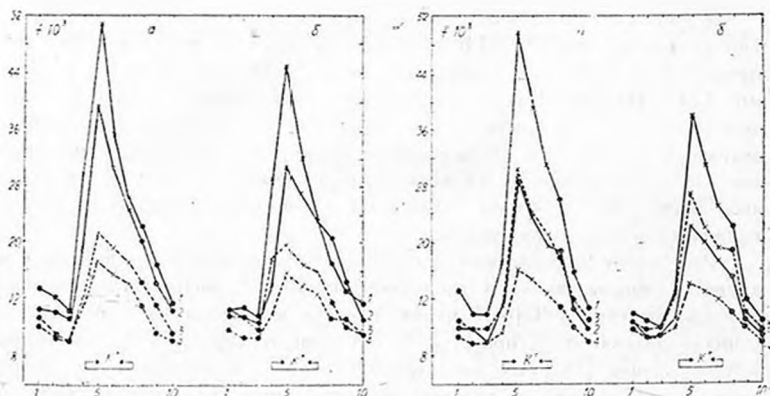


Рис. 1. Кривые высвобождения $[^{14}\text{C}]$ ГК из нервных окончаний головного мозга белых крыс при первой (а) и второй (б) инкубациях: 1—в присутствии Ca^{2+} (молодые животные); 2—в присутствии Ca^{2+} (старые животные); 3—в отсутствие Ca^{2+} (молодые животные); 4—в отсутствие Ca^{2+} (старые животные). Здесь и на рис. 2 и 3 приведены средние данные 4—5 опытов. Стандартные отклонения не более 10%

Рис. 2. Кривые высвобождения $[^{14}\text{C}]$ АК из нервных окончаний головного мозга белых крыс при первой (а) и второй (б) инкубациях: 1—в присутствии Ca^{2+} (молодые животные); 2—в присутствии Ca^{2+} (старые животные); 3—в отсутствие Ca^{2+} (молодые животные); 4—в отсутствие Ca^{2+} (старые животные)

Проведенные нами исследования показали, что высвобождение $[^{14}\text{C}]$ ГК из синапсом головного мозга без стимуляции у старых животных несколько снижается. K^+ в концентрации 40 мМ значительно стимулирует высвобождение ГК как у молодых, так и у старых животных. Однако на пике стимуляции у старых животных высвобождение $[^{14}\text{C}]$ ГК при первой инкубации снижается на 23,5%, а при второй—на 32% (рис. 1, а, б, кривые 1 и 2). Необходимо отметить, что в отсутствие Ca^{2+} стимулирующий эффект K^+ на высвобождение $[^{14}\text{C}]$ ГК в обеих возрастных группах подавляется. При удалении Ca^{2+} из среды K^+ -вызванное высвобождение при первой инкубации синапсом у молодых и у старых животных подавляется соответственно на 59 и 56,4%,

а при второй—на 57 и 50%. Эти данные указывают, что в упомянутых экспериментальных условиях высвобождение [^{14}C] ГК лишь несколько снижается при старении (рис. 1, а, б). Как видно из рисунка (кривые 3 и 4) K^+ -вызванное высвобождение в отсутствие Ca^{2+} у старых животных при первой и второй инкубациях снижается соответственно на 19 и 21%. Таким образом, хотя исключение Ca^{2+} из инкубационной среды приводит почти к одинаковому подавлению высвобождения этого медиатора в обеих возрастных группах, тем не менее Ca^{2+} -независимое высвобождение значительно снижается в старости.

Другой отличительной особенностью Ca^{2+} -независимого K^+ -вызванного высвобождения [^{14}C] ГК является то, что у старых животных оно отстает от молодых в течение продолжительного времени (рис. 1, кривые 3, 4). На рис. 1 показано, что для проявления способности нервных окончаний к мгновенному высвобождению возбуждающего нейромедиатора в ответ на K^+ -вызванную деполяризацию необходимо наличие Ca^{2+} . Тем не менее, во всех случаях высвобождение ГК из нервных окончаний, особенно K^+ -вызванное высвобождение, значительно снижается в старческом возрасте.

Результаты проведенных исследований, касающиеся высвобождения другой аминокислоты—АК приведены на рис. 2. Возрастные различия в высвобождении [^{14}C] АК наиболее четко выражены на фоне резкого стимулирования этого процесса K^+ . В присутствии Ca^{2+} K^+ -вызванное высвобождение [^{14}C] АК при первой и второй инкубациях синапсом снижается в старческом возрасте соответственно на 44 и 43% (рис. 2, кривые 1, 2). При удалении Ca^{2+} из среды K^+ -вызванное высвобождение при первой инкубации синапсом у молодых и старых животных подавляется соответственно на 38 и 42,8%, а при второй—на 28,9 и 36,3%, то есть возрастные различия в степени подавления высвобождения вследствие удаления Ca^{2+} незначительны. Необходимо отметить, что Ca^{2+} -независимое K^+ -вызванное высвобождение [^{14}C] АК из свежеприготовленных синапсом и при выдерживании их при 4° у старых животных снижается на 48,2 и 48,1% (рис. 2, кривые 3, 4). Отличительной особенностью высвобождения АК по сравнению с ГК является то, что при удалении Ca^{2+} из среды инкубации K^+ -вызванное высвобождение АК подавляется значительно меньше. Более того, K^+ -вызванное Ca^{2+} -зависимое и K^+ -вызванное Ca^{2+} -независимое высвобождение [^{14}C] АК по сравнению с [^{14}C] ГК в старческом возрасте снижается более выражено. Полученные нами результаты позволяют допустить, что механизмы высвобождения ГК и АК из синапсом отличаются друг от друга.

Изучение высвобождения [^{14}C] ГАМК—тормозящей нейромедиаторной аминокислоты из синапсом головного мозга (рис. 3, а, б) показало, что Ca^{2+} -зависимое K^+ -вызванное высвобождение при первой и второй инкубациях синапсом у старых животных снижается несколько меньше—на 15,7 и 13% соответственно (рис. 3, кривые 1, 2). При удалении Ca^{2+} из среды инкубации в указанных эксперименталь-

ных условиях высвобождение ГАМК у молодых и старых животных подавляется соответственно на 55: 56,5% и 55,8: 57,5%, то есть независимо от возраста снижается более чем на 50%. Из рис. 3 также следует, что Ca^{2+} -независимое высвобождение ГАМК снижается в свежих и выдержанных на холоду синапсосамах соответственно на 17,4 и 15% (рис. 3, кривые 3, 4).

Полученные нами результаты о высвобождении всех трех нейромедиаторных аминокислот и роли в этом процессе Ca^{2+} в молодом возрасте согласуются с литературными данными [15—17]. Установлено, что K^{+} -вызванное, Ca^{2+} -зависимое и Ca^{2+} -независимое высвобождение нейромедиаторных аминокислот из синапсосом значительно снижается в

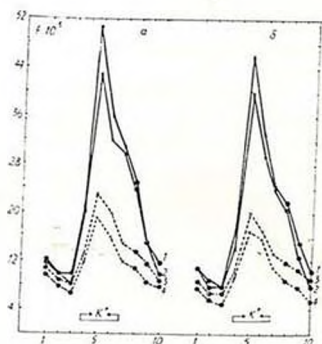


Рис. 3. Кривые высвобождения $[^{14}\text{C}]$ ГАМК из нервных окончаний головного мозга белых крыс при первой (а) и второй (б) инкубациях: 1—в присутствии Ca^{2+} , молодые животные; 2—в присутствии Ca^{2+} , старые животные; 3—в отсутствие Ca^{2+} , молодые животные; 4—в отсутствие Ca^{2+} , старые животные

старческом возрасте. Примечательно, что удаление Ca^{2+} из среды приводит к резкому, но в одинаковой степени выраженному у молодых и старых животных подавлению этого процесса, хотя в старческом возрасте это происходит на сниженном фоне высвобождения. Можно допустить, что снижение уровня Ca^{2+} и функциональной активности Ca^{2+} -зависимых белков в старости играют важную роль в снижении высвобождения медиаторов. Нужно также иметь в виду, что в старческом возрасте уровень нейромедиаторных аминокислот значительно снижается в мозговой ткани [16], что в свою очередь может привести к снижению их высвобождения.

Ранее нами изучено высвобождение нейромедиаторных аминокислот после предварительного захвата синапсосамами, а как показали данные, полученные нами и другими исследователями [17, 19], захват нейромедиаторных аминокислот синапсосамами при старении значительно снижается.

Снижение степени высвобождения нейромедиаторных аминокислот из синапсосом головного мозга при старении в определенной степени можно объяснить изменениями, происходящими в синапсосамах в старческом возрасте [21]. Имеющиеся в литературе данные о возрастном снижении способности постсинаптических рецепторов к связыванию нейромедиаторных аминокислот [22] дают основания предположить, что

это явление и значительное снижение способности нервных окончаний к обратному захвату указанных соединений [19] служит следствием подключения компенсаторных механизмов нервной ткани, направленных на получение того же эффекта с меньшим количеством нейромедиаторов в синаптической щели вследствие снижения их высвобождения из нервных окончаний.

Ca²⁺-DEPENDENT RELEASE OF NEUROTRANSMITTER AMINO ACIDS FROM NERVE ENDINGS OF WHITE RATS BRAIN AT AGING

APRIKIAN G. V., GEKCHIAN K. G., VARTANIAN A. A.

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

The role of Ca²⁺ in the release of neurotransmitter amino acids (¹⁴C-GA, ¹⁴C-AA and ¹⁴C-GABA) on aging has been studied. It has been determined, that K⁺-induced Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent release of neurotransmitter amino acids from synaptosomes decreased considerably on aging. The extraction of Ca²⁺ from perfuse medium leads to the drastic suppression of neurotransmitters release in both age groups. There are no essential age differences in degree of release suppression, although the suppression in old rats synaptosomes occurs on the background of decreased release.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Russmusen H.* *Sciens*, v. 170, p. 404—412, 1970.
2. *Rubin R. P.* *Pharmacol. Rev.*, v. 22, p. 389—428, 1970.
3. *Blaustein M. P.* *J. Physiol. (London)*, v. 247, p. 617—655, 1975.
4. *Redburn D. A., Broome D., Ferkany J., Enna S. I.* *Brain Res.*, v. 152, p. 511—519, 1978.
5. *Sandoval M. E., Cotman C. W.* *Neuroscience*, v. 3, p. 199—206, 1978.
6. *Levi G., Guallo V., Ciotti T., Raiteri M. J.* *Neurochem.*, v. 33, № 5, p. 1043—1053, 1979.
7. *Martin D. L.*—In: *GABA in nervous system* (eds. E. Roberts, T. N. Chase, D. B. Tower), p. 347—386, Raven Press, N.-Y., 1976.
8. *O'Fallon J. V., Brosemer R. W., Harding J. W.* *J. Neurochem.*, v. 36, № 2, p. 369—378, 1981.
9. *Levy W. B., Redburn D. A., Cotman C. W.* *Science*, v. 181, p. 676—678, 1973.
10. *Haycock J. W., Levy W. B., Denner L. A., Cotman C. W.* *J. Neurochem.*, v. 30, № 5, p. 1113—1125, 1978.
11. *Гекчян К. Г., Априкян Г. В.* *Бiol. журн. Армении*, т. 40, № 9, с. 760—765, 1987.
12. *Hajos F.* *Brain Res.*, v. 3, p. 485—489, 1975.
13. *Raiteri M., Angelini F., Levi G.* *Eur. J. Pharmacol.*, v. 25, p. 411—417, 1974.
14. *Lowry C. H., Rosebrough H. J., Farr A. L., Randall R. I.* *Biol. Chem.*, v. 193, № 2, p. 265—275, 1951.
15. *Mulder A. H., Snyder S. H.* *Brain Res.*, v. 76, p. 297—308, 1974.
16. *Reubi I. C., Cuénod N.* *Brain Res.*, v. 176, p. 185—183, 1979.

17. Nadler I. V., White W. F., Vacu K. W., Redburn D. A., Cotman C. W. J. Neurochem., v. 29, № 1, p. 279—290, 1977.
18. Weill-Fugazza J., Godefroy F. Mech. Age Dev., v. 13, № 2, p. 199—204, 1980.
19. Априкян Г. В., Шагинян В. А., Мкртчян Г. А., Паронян Ж. А., Князян В. А., Ахвердян Э. С. Физика. журн., т. 1, с. 69—73, 1984.
20. Wheeler D. D. Exp. Gerontology, v. 15, № 4, p. 269—284, 1980.
21. Girbi C., Bertoni-Freddary C., Piery C. Mech. Age Dev., v. 14, № 314, p. 265—271, 1980.
22. Govani S., Memo M., Saani L. Mech. Age Dev., v. 12, № 1, p. 39—45, 1980.

Поступила 2. VI 1987

Биохимия и методология рецепторов. Серийное издание (J. Wiley and Sons).

Receptor Biochemistry and Methodology. Leading Series in Biochemistry (Ed. by J. Craig Venter and Len C. Harrison), J. Wiley and Sons, Baffins Lane, England.

Серия «Биохимия и методология рецепторов» посвящена достижениям молекулярной биологии в расшифровке структуры и биохимической основы деятельности рецепторов и подробному описанию необходимых методов для исследования рецепторов. Представленные в серии работы служат не только в качестве источника научной информации, но и необходимого лабораторного пособия. С 1984 по 1987 г. опубликованы следующие тома из этой серии:

т. 1. Мембраны, детергенты и солюбилизация рецепторов; т. 2. Процедура очистки рецепторов; т. 3. Молекулярная и химическая характеристика мембранных рецепторов; т. 4. Моноклональные и антиидиотипические антитела; т. 5. Бензодиазепин/ГАМК-рецепторы и хлоридные каналы; т. 6. Перспективы классификации рецепторов гормонов; т. 7. Фосфоноэтиды и рецепторные механизмы.

Серия может заинтересовать исследователей в области иммунологии, биохимии, фармакологии, физиологии, биофизики, клеточной и молекулярной биологии.



УДК 577.157:577.152

ИЗБИРАТЕЛЬНОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ ПИРАЗИДОЛОМ
МОНОАМИНОКСИДАЗЫ ТИПА А В ГОЛОВНОМ
МОЗГУ КРЫСЫ И ЧЕЛОВЕКА

ВЕРЕВКИНА И. В., АСНИНА В. В., *ГОРКИН В. З., МАШКОВСКИЙ М. Д.

Всесоюзный научно-исследовательский химико-фармацевтический
институт им. С. Орджоникидзе

*Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

Пиразидол (гидрохлорид 2, 3, 3а, 4, 5, 6-гексагидро-8-метил-1-Н-пиразин [3, 2, 1—j, к] карбазола, пирлиндол) избирательно блокирует катализируемое МАО митохондрий головного мозга крыс и человека дезаминирование серотонина и норадреналина—специфических субстратов МАО типа А и в значительно меньшей степени или практически не влияет на дезаминирование специфических субстратов МАО типа Б—2-фенилэтиламина и бензиламина. Степень ингибирования пиразидолом дезаминирования дофамина зависит от типа МАО, участвующего в окислении этого амина. Очевидно, что антидепрессантный эффект пиразидола связан с его свойством избирательно блокировать в головном мозгу человека дезаминирование физиологических концентраций таких нейротрансмиттеров, как серотонин и норадреналин.

Митохондриальные МАО участвуют в метаболизме аминов—нейротрансмиттеров и нейромодуляторов [1, 2]. Блокирование активности МАО или патологические состояния, связанные с изменением уровня активности фермента в организме, как правило, приводят и к изменениям функций мозга, контролируемых аминами [2].

Ингибиторы МАО, избирательно блокирующие дезаминирование отдельных биогенных аминов, успешно применяют при лечении депрессивных состояний и паркинсонизма [3].

По современным представлениям, различают МАО типов А и Б, высокочувствительные к ингибирующему действию низких концентраций хлоргиллина или депренила соответственно [3, 4]. Соотношение этих двух типов МАО значительно варьирует в зависимости от ткани и вида животного [5]. Так, отмечают значительные колебания активности МАО в различных участках головного мозга животных и человека. Наиболее высокая активность обнаружена в гипоталамусе [2]. Возможно, что и субстратная специфичность, которая также изменяется в зависимости от источника МАО, в значительной степени обусловлена соотношением МАО типов А и Б в различных тканях [6].

Обычно для изучения свойств митохондриальных МАО с успехом используют такие высокоспецифичные ингибиторы фермента, как хлоргилин, депренил, паргилин [3]. Ранее нами было показано, что производные пиразинно-карбазола, в частности пиразидол (гидрохлорид 2, 3, 3а, 4, 5, 6-гексагидро-8-метил-1-Н-пиразин [3, 2, 1—j, к] карбазола: пирлиндол), обладающий свойствами антидепрессанта, избирательно блокирует активность МАО типа А в различных тканях человека и животных [7]. Избирательность действия пиразидола сохраняется и в условиях *in vivo* [8].

В настоящей работе рассматриваются вопросы, связанные с исследованием влияния пиразидола на активность МАО типов А и В головного мозга крысы и человека. Изучение пиразидола в этом аспекте представляет значительный теоретический и практический интерес, так как этот оригинальный отечественный антидепрессант нашел широкое применение в медицинской практике [1, 9—11].

Материалы и методы

Митохондриальные фракции из головного мозга человека и крысы получали, как описано ранее [12, 13]. Суспензию митохондрий в 10 мМ фосфатном буфере, рН 7,4 хранили при -20° ; перед употреблением материал оттаивали, разбавляли в 10-кратном объеме того же буфера и центрифугировали при 1200 g 2 мин. Осадки, представляющие собой фрагменты митохондриальных мембран, суспензировали в 10 мМ фосфатном буфере, рН 7,4 и использовали в качестве источника МАО. Митохондриальную фракцию из печени крысы выделяли, как описано ранее [14]. Для получения препарата митохондрий печени крысы, в котором МАО типа В была инактивирована, но МАО типа А сохраняла активность, суспензию митохондрий протрубили в течение 4 ч при комнатной температуре с депренилом в конечной концентрации $1 \cdot 10^{-7}$ М, затем центрифугировали 20 мин при 20000 g и осадки промывали в тех же условиях 50 мМ фосфатным буфером, рН 7,4. Полученный препарат фрагментов митохондриальных мембран катализировал дезаминирование серотонина, норадреналина и 2-фенилэтиламина (в высоких концентрациях); препарат не катализировал окисление бензиламина. Хлоргилин в концентрации $1 \cdot 10^{-7}$ М полностью ингибировал дезаминирование указанных аминов.

В качестве субстратов использовали амины в оптимальных для данной ткани концентрациях, подобранных в отдельных опытах. Для митохондрий головного мозга крысы эти концентрации составляли (в мкмоль/1,8 мл пробы): норадреналин битартрат («Sigma», США)—4; серотонин креатининсульфат («Reanal», Венгрия)—12; дофамин гидрохлорид («Ferak», ГДР)—6; тирамин гидрохлорид («Merck», ФРГ)—8; 2-фенилэтиламин гидрохлорид (отечественный)—0,8; бензиламин гидрохлорид (отечественный)—8; для митохондрий головного мозга человека и субстратов тирамина, серотонина, дофамина и 2-фенилэтиламина—6, 3, 4 и 0,6 соответственно.

Об активности МАО судили по освобождению аммиака в процессе инкубации проб при 37° в атмосфере кислорода в течение 30 мин со всеми субстратами кроме 2-фенилэтиламина, пробы с которым инкубировали 15 мин. Белок определяли по методу Lowry, используя в качестве стандарта кристаллический альбумин сыворотки крови быка.

Результаты и обсуждение

Степень ингибирования пиразидолом дезаминирования различных аминов зависит от того, какой тип МАО в данной ткани участвует в дезаминировании данного амина и от используемой при измерении активности МАО концентрации амина.

В головном мозгу человека и крысы содержатся оба основных типа МАО. Однако их соотношение в головном мозгу животных и человека различно: у человека преобладает МАО типа Б, а у грызунов, в том числе и у крысы, присутствует преимущественно МАО типа А [2, 15]. Установлено, что МАО типа А локализована главным образом в нейронах, а МАО типа Б в экстранейрональной ткани головного мозга [2, 15, 16]. Соотношение МАО типа Б и А увеличивается с возрастом

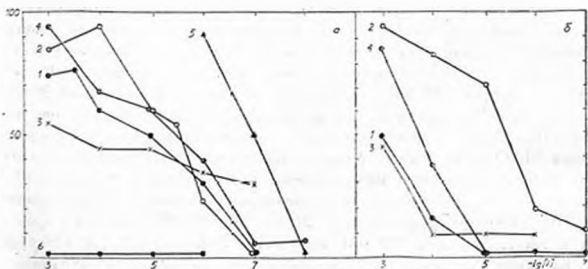


Рис. 1. Ингибирование пиразидолом дезаминирования различных аминов при их инкубации с митохондриями головного мозга крысы (а), человека (б). По оси абсцисс—отрицательный $\lg$ концентрации пиразидола в пробе (М). По оси ординат—степень ингибирования (в %) дезаминирования тирамина, серотонина, 2-фенилэтиламина, дофамина, нордреналина, бензиламина (соответственно кривые 1—6). Представлены средние арифметические величины по данным 3—6 опытов с 2-мя параллельными определениями в каждом

или при некоторых патологических состояниях, например, болезни Альцгеймера [17]. Обычно это связано с увеличением количества экстранейрональной ткани головного мозга [16, 18].

По нашим данным, в головном мозгу крысы наиболее чувствительно к ингибирующему действию пиразидола дезаминирование нордреналина (рис. 1, а, кривая 5). По данным ингибиторного анализа, в го-

ловном мозгу крысы и человека в дезаминировании норадреналина принимают участие оба типа МАО, однако в головном мозгу крысы 85% норадреналина дезаминируется при участии МАО типа А [19, 20]. Обычно МАО типа А локализована в участках головного мозга, богатых норадреналином [19]. Очевидно, с этим связана высокая чувствительность дезаминирования норадреналина митохондриями головного мозга крысы к низким концентрациям пиразидола.

Серотонин обычно относят к специфическим субстратам МАО типа А [15]. Однако данные ингибиторного анализа свидетельствуют о том, что серотонин так же, как и тирамин, в тканях головного мозга крысы дезаминируется при участии обоих типов МАО, хотя сродство тирамина к МАО типа А значительно выше [6, 21]. В условиях, когда величины K_m и V значительно различаются для двух типов МАО, степень участия того или иного типа МАО в дезаминировании амина зависит от концентрации последнего [2]. В тканях головного мозга крысы серотонин при низких концентрациях исключительно, а тирамин в основном дезаминируется при участии МАО типа А. Увеличение концентрации этих аминов приводит к увеличению доли участия МАО типа Б в их дезаминировании [6, 21]. В наших опытах характер кривой зависимости степени ингибирования дезаминирования серотонина при участии МАО митохондрий головного мозга крысы от концентраций пиразидола очень напоминает таковую для тирамина (рис. 1, а, кривые 1, 2). Видимо, это связано с тем, что в наших опытах концентрация серотонина (5 мМ) была достаточно высока для того, чтобы субстрат мог окисляться и при участии МАО типа Б. Тирамин в используемой концентрации (1 мМ) дезаминируется при участии обоих типов МАО.

2-Фенилэтиламин, относящийся к специфическим субстратам МАО типа Б, при использовании его в относительно высоких концентрациях также теряет специфичность и начинает дезаминироваться и при участии МАО типа А [22]. Относительно высокая чувствительность дезаминирования 2-фенилэтиламина, катализируемого МАО митохондрий головного мозга крысы, к действию пиразидола в наших опытах объясняется, очевидно, тем, что 2-фенилэтиламин был использован в относительно высокой концентрации (0,44 мМ; рис. 1, а, кривая 3).

Дезаминирование бензиламина, катализируемое МАО митохондрий головного мозга крысы не чувствительно к действию даже высоких концентраций пиразидола (рис. 1, а, кривая 6). Результаты наших опытов с бензиламином согласуются с данными Suzuki и соавт. [22], которые показали, что бензиламин является весьма специфическим субстратом для МАО типа Б головного мозга крысы.

В митохондриях головного мозга человека пиразидол избирательно ингибирует дезаминирование серотонина (рис. 1, б, кривая 2). Так, в концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ М пиразидол на 75% блокирует дезаминирование этого амина и практически не влияет на окисление дофамина, тирамина и 2-фенилэтиламина. Несмотря на тот факт, что в головном мозгу че-

ловека доминирует MAO типа Б [2], а серотонин в наших опытах был использован в концентрации, которая уже окисляется при участии MAO типа Б, тем не менее дезаминирование этого амина, катализируемое MAO митохондрий головного мозга человека, сохраняет достаточно высокую чувствительность к действию пиразидола. Очевидно, в головном мозгу человека в окислении серотонина существенная роль принадлежит MAO типа А.

Дезаминирование тирамина при его инкубации с митохондриями головного мозга человека менее чувствительно к действию пиразидола, чем в аналогичных опытах с митохондриями головного мозга крысы (рис. 1, а, кривая 1; б, кривая 1). Если пиразидол в концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ М ингибирует дезаминирование тирамина, происходящее при участии MAO митохондрий головного мозга крысы, то при этой же концентрации пиразидол не влияет на дезаминирование тирамина, катализируемое MAO митохондрий головного мозга человека. Графики зависимости степени ингибирования дезаминирования тирамина и 2-фенилэтиламина при участии MAO митохондрий головного мозга человека от концентраций пиразидола практически идентичны. Очевидно, в головном мозгу человека дезаминирование тирамина, в основном, катализирует MAO типа Б. Интересно отметить различную чувствительность к действию пиразидола реакции дезаминирования 2-фенилэтиламина при его инкубации с митохондриями головного мозга крысы и человека (рис. 1, а, кривая 3; б, кривая 3). В данных тканях этот амин относится к субстратам MAO типа Б. В наших опытах 2-фенилэтиламин был использован в концентрации, при которой дезаминирование этого амина катализируют оба типа MAO. Однако различная степень ингибирования пиразидолом 2-фенилэтиламина при его инкубации с митохондриями головного мозга человека и крысы, очевидно, связана с различным соотношением MAO типов А и Б в тканях головного мозга крысы и человека: в первой преобладает тип А, а во второй — тип Б [2].

Избирательность ингибирующего действия пиразидола на MAO типа А в тканях головного мозга крысы и человека убедительно показана в опытах с дофамином в качестве субстрата. Известно, что MAO типов А и Б головного мозга приматов и грызунов различаются, в частности, по субстратной специфичности. Так, например, дофамин в головном мозгу крысы дезаминируется при участии обоих типов MAO, а в головном мозгу человека — в основном при участии MAO типа Б [18]. Полагают, что возрастное угасание функций дофаминергической системы головного мозга связано с увеличением активности MAO типа Б, локализованной, главным образом, в глияльных клетках, содержание которых в тканях головного мозга с возрастом увеличивается [3]. В связи с этим представляло интерес именно на тканях головного мозга человека и крысы подтвердить избирательность ингибирующего действия пиразидола на MAO типа А и показать, что избирательность действия данного ингибитора определяется не типом окисляемого суб-

страта, а типом фермента. Как видно из графиков зависимости степени ингибирования дезаминирования дофамина, катализируемого MAO митохондрий головного мозга человека и крысы (рис. 1, а, кривая 4; б, кривая 4), чувствительность одной и той же реакции окислительного дезаминирования дофамина к действию пиразидола зависит от природы ткани, из которой получены митохондрии. Величины I_{50} для пиразидола (субстрат дофамин) у MAO митохондрий головного мозга крысы и человека различаются почти на два десятичных порядка.

Избирательная направленность действия пиразидола на MAO типа А была показана в опытах с использованием препарата митохондрий (из печени крысы), в котором после преникубации с депренилом (см. «Материалы и методы») была инактивирована MAO типа Б, но MAO типа А была активна. Обычно в митохондриях печени крысы к действию низких концентраций пиразидола более чувствительна реакция дезаминирования серотонина, чем тирамина (рис. 2, кривые 1, 2). Величины I_{50} для пиразидола в таких системах при использовании в качестве субстратов серотонина и тирамина различаются почти на 1,5

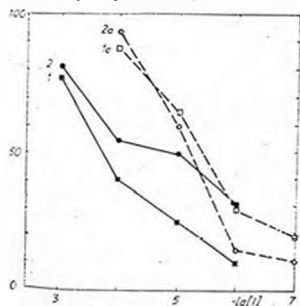


Рис. 2. Ингибирование пиразидолом дезаминирования тирамина и серотонина при их инкубации с митохондриями печени крысы. Степень ингибирования пиразидолом дезаминирования тирамина (кривые 1 и 1а) и серотонина (кривые 2 и 2а) до обработки суспензии митохондрий депренилом (кривые 1 и 2) и после предварительной обработки суспензии митохондрий депренилом (см. «Материалы и методы») (кривые 1а и 2а). Обозначения из осей те же, что и на рис. 1.

порядка. В препаратах митохондрий, в которых MAO типа Б была предварительно инактивирована депренилом, кривые зависимости степени ингибирования дезаминирования серотонина и тирамина от концентраций пиразидола практически идентичны (рис. 2, кривые 1а и 2а).

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что в тканях головного мозга крысы и человека пиразидол избирательно ингибирует активность MAO типа А независимо от того, окисление каких аминов катализирует этот тип фермента. Действие пиразидола направлено не на блокирование дезаминирования того или иного субстрата (например, 5-окситриптамина), а на ингибирование определенного типа MAO — именно MAO типа А, независимо от того, какой амин служит субстратом для этого типа MAO в тканях головного мозга крысы и человека.

Антидепрессантный эффект ингибиторов MAO обычно связывают с воздействием на серотонин- и катехоламинергические системы голов-

ного мозга и, в первую очередь, на норадреналинергическую систему [2]. Пиразидол, очевидно, оказывает влияние как на серотонин-, так и на катехоламинергические системы, так как введение его вызывает в отдельных участках головного мозга животных увеличение содержания серотонина, норадреналина и дофамина. При этом наблюдают снижение уровня 5-оксининдолуксусной и диоксифенилауксусной кислот [1].

На основании полученных данных можно предположить, что в антидепрессантном эффекте пиразидола важное значение имеет его свойство избирательно блокировать в головном мозгу человека катализируемое главным образом MAO типа А деаминирование, в первую очередь, физиологических концентраций таких нейротрансмиттеров, как серотонин и норадреналин.

SELECTIVE INHIBITION OF TYPE A MONOAMINE OXIDASE BY PYRAZIDOL IN RAT AND HUMAN BRAIN

VERYOVKINA I. V., ASNINA V. V., GORKIN V. Z., MASHKOVSKY M. D.

"Institute of Biological and Medical Chemistry, USSR Academy of Medical Sciences, All-Union S. Ordzhonikidze Chemical Pharmaceutical Research Institute, Moscow

Pyrazidol (2, 3, 3a, 4, 5, 6-Hexahydro-8-methyl-1-H-pyrazino (3, 2, 1-j, k) carbazol hydrochloride) blocks selectively the deamination in rat and human brain mitochondria of serotonin and norepinephrine—the main substrates in these tissues of the type A MAO and almost did not affect the deamination of the main substrates of the type B MAO—2-phenylethylamine and benzylamine. The degree of inhibition of dopamine deamination by pyrazidol in rat and human brain depends on the particular type of MAO involved in oxidation of this amine. The antidepressant effect of pyrazidol might be related to its property of selective blocking of the deamination of physiological concentrations of such neurotransmitters as serotonin and norepinephrine in human brain.

ЛИТЕРАТУРА

1. Машковский М. Д., Андреева Н. И., Полежаева А. И. Фармакология антидепрессантов, М., Медицина, 1983.
2. Murphy D. L., Garrick N. A., Cohen R. M.—In: Antidepressants (eds. Burrows, Norman, Davies), p. 209—227, Elsevier Science Publishers, 1983.
3. Knoll J. Acta Neurol. Scand., v. 95, p. 57—80, 1983.
4. Tipton K., Fowler Ch., Houslay M.—In: Monoamine oxidase. Basic and Clinical, frontiers (eds. Kamijo, Usdir, Nagatsu), Amsterdam, Excerpta Medica, 1982.
5. Gorkin V. Z.—In: Amine Oxidase in Clinical Research, Pergamon Press, Oxford, 1983.
6. Benedetti M. S., Boucher Th., Carlson A., Fowler Ch. J. Biochem. Pharmacol., v. 32, p. 47—53, 1983.
7. Верёвкина И. В., Аснина В. В., Горкин В. З., Машковский М. Д. Вopr. мед. химии, т. 29, № 5, с. 118—124, 1983.

8. Машковский М. Д., Горкин В. Э., Версакина И. В., Асмина В. В., Туликина С. М. Бюл. эксперим. биол. и мед., № 2, с. 169—171, 1981.
9. Машковский М. Д., Андреева Н. И. Журн. невропатол. и психиатр., т. 75, № 3, с. 430—435, 1975.
10. Авруцкий Г. Я., Громова В. В., Зайцев С. Г. Журн. невропатол. и психиатр., т. 75, № 5, с. 734—741, 1975.
11. Руденко Г. М., Лспахин В. К., Музыченко А. П. Новые лекарственные препараты. Экспресс-информация, № 5, с. 2—13, 1977.
12. Brady T. M., Brain J. A. J. Biol. Chem., v. 195, p. 682—696, 1951.
13. Selden L. S., Westley J. Biochem. et biophys. acta, v. 58, p. 363—367, 1962.
14. Горкин В. Э., Версакина И. В.—Вопр. мед. химии, т. 9, с. 315—318, 1963.
15. Горкин В. Э. Нейрохимия, т. 4, № 1, с. 68—78, 1985.
16. Oreland L., Fowler C. J.—In: Monoamine Oxidase. Basic and Clinical frontiers (eds. Kamijo, Usdin, Nagatsu), p. 237—242. Amsterdam, Excerpta Medica, 1982.
17. Oreland L., Adolfsson R., Fowler C. J., Gottfries C. G., Wiberg A., Winblad B. Biol. Psychiatry (eds. Perris, Struwe, Jansson), p. 973—976, Biomedical Press, Amsterdam, 1981.
18. Fowler Ch. J., Tipton K. F. Biochem. Pharmacol., v. 30, p. 3329—3332, 1981.
19. Gurriek N. A., Murphy D. L. Biochem. Pharmacol., v. 31, p. 4060—4066, 1982.
20. Youdim M. B. H. British J. Pharmacol., v. 79, p. 477—481, 1983.
21. Fowler Ch. J., Tipton K. F. J. Neurochem., v. 38, p. 733—736, 1982.
22. Suzuki O., Kutsumata Y., Oya M. Biochem. Pharmacol., v. 28, p. 953—956, 1979.

Поступила 9. X 1986



УДК 612.82+512.766.2

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

II. ВРАЩЕНИЕ В БАРАБАНЕ И ЭМОЦИОНАЛЬНЫЙ СТРЕСС. КОРРЕКЦИЯ СТРЕССОРНЫХ ЯВЛЕНИЙ ФЕНАЗЕПАМОМ

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

В эксперименте на крысах исследовано влияние различных моделей стресса (вращение в барабане и эмоциональный стресс) на содержание полиаминов (путресцина, спермина и спермидина) и специфических компонентов головного мозга (гомокарнозина, путреанина и 1-цистатионина) в продолговатом мозгу, мозжечке, гипоталамической области и больших полушариях мозга. Показано, что стрессорные состояния сопровождались разнонаправленными изменениями концентрации упомянутых соединений во всех исследованных отделах мозга.

Введение животным перед стрессорными воздействиями (иммобилизация, вращение в барабане и эмоциональный стресс) транквилизатора феназепама в значительной степени корригировало выявленные изменения содержания полиаминов и специфических компонентов мозга.

В сообщении I [1] были изложены результаты наших опытов по изучению изменений в содержании полиаминов (путресцина, спермина и спермина) и специфических компонентов головного мозга (гомокарнозина, путреанина и 1-цистатионина) в различных отделах головного мозга крыс при таком стрессорном воздействии, как иммобилизация (ИММ). В настоящем же сообщении представлены аналогичные данные при воздействии других моделей стресса—последствий вращения в барабане (ВБ) подопытных животных и их эмоционального стресса (ЭС).

Определенное значение для предупреждения возникновения нарушений функциональной активности ЦНС в условиях действия экстремальных факторов может иметь ослабление эмоциональных реакций [2]. Для подавления же отрицательных эмоций успешно применяют психотропные вещества различных классов, в том числе транквилизаторы [2]. В результате исследований Н. Н. Демина и сотр.

было установлено тормозящее влияние транквилизатора феназепама также и на денатурационные изменения мембранных белков в ткани ствола головного мозга при лишении крыс парадоксальной фазы сна [3, 4] и при ВБ [5], равно как и на катаболизм белков и РНК, особенно в цитоплазме нейронов супраспического ядра гипоталамуса при вынужденной селективной бессоннице [6]. Учитывая эти данные, мы исследовали возможность использования феназепама и с целью коррекции изменений в метаболизме полиаминов и специфических компонентов мозга при воздействии изученных нами моделей стресса.

Материалы и методы

Работу проводили на крысах-самцах линии Wistar массой 200—250 г. При использовании в качестве модели стрессорного воздействия ВБ крыс помещали в цилиндрический барабан, изготовленный из сетки, который вращался со скоростью 2,3 об/мин; скорость ВБ была подобрана с таким расчетом, чтобы вызывать у животных нарушение естественного ритма сон—бодрствование при относительно небольшой мышечной и вестибулярной нагрузке [5]. Продолжительность ВБ составляла 15, 30, 60, 120 и 240 мин. В качестве модели ЭС использовали помещение животных на 60 мин в сетчатые металлические пеналы диаметром 6—7 см и длиной 22—24 см; размеры этих пеналов подбирали так, чтобы закрывающая их задвижка несколько сдавливала животное [7]. Исследовали продолговатый мозг, мозжечок, гипоталамическую область и большие полушария мозга. В этих отделах, выделенных по специальной схеме [8], определяли концентрацию полиаминов [9], гомокарнозина [10], путресцина [11] и β -цистатинина [12]. Полученные данные обрабатывали методом вариационной статистики с использованием t -теста Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Результаты исследований, проведенных во время ВБ животных, приведены на рис. 1.

В продолговатом мозгу на 15-й мин ВБ имело место снижение концентрации путресцина (на 30%) и спермидина (на 43%) при одновременном повышении содержания спермина (на 30%), β -цистатинина (на 20%) и путресцина (на 68%); на 30-й мин выявлялось только снижение количества путресцина (на 27%) и спермидина (на 26%). На 60-й мин наблюдали увеличение содержания спермина (на 14%), путресцина (на 45%) и гомокарнозина (на 65%), на 120-й мин—лишь повышение концентрации спермина (на 31%), а на 240-й мин—снижение содержания путресцина (на 23%) при одновременном увеличении концентрации спермина (на 12%) и особенно гомокарнозина (на 67%).

В мозжечке ВБ на 15-й мин вызвало снижение содержания путресцина (на 29%), спермидина (на 33%) и спермина (на 34%). тогда

как концентрация гомокарнозина, путреанина и 1-цистатионина повысилась (на 20, 23 и 21% соответственно). На 30-й мин ВБ при нормализации других показателей было отмечено только уменьшение содержания путреанина (на 25%); на 60-й мин—значительное повышение уровня содержания гомокарнозина (в 2,3 раза) наряду со снижением концентрации путреанина (на 28%); на 120-й мин—понижение содержания спермидина (на 24%) и увеличение концентрации 1-цистатионина (на 19%) и особенно спермина (на 64%); на 240-й мин—повышение со-

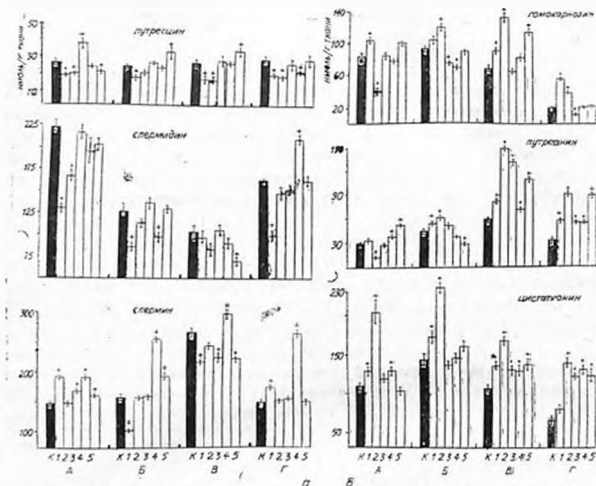


Рис. 1. Содержание полиаминов (а) и специфических компонентов (б) крыс при вращении в барабане: А—продолговатый мозг, Б—мозжечок, В—гипоталамическая область, Г—большие полушария; К—контроль, 1, 2, 3, 4, 5—соответственно 15-, 30-, 60-, 120-, 240-я мин вращения в барабане. Крестиками отмечены достоверные отличия по сравнению с контролем

держания путресцина (на 38%), спермина (на 21%) и особенно гомокарнозина (в 2,2 раза) при одновременном снижении количества путреанина (на 27%).

В гипоталамической области 15-минутное ВБ сопровождалось понижением концентрации путресцина (на 38%) и спермина (на 19%) при одновременном повышении количества гомокарнозина (на 37%), путреанина (на 21%) и 1-цистатионина (на 28%). На 30-й мин уменьшенное содержание путресцина сохранялось на том же уровне (на 38%) при дальнейшем повышении концентрации гомокарнозина (до 56%);

на 60-й мин при некотором повышении содержания спермина (снижение на 14% против нормы) имело место еще более значительное увеличение концентрации гомокарнозина (в 2,5 раза): на 120-й мин концентрация спермина превышала контрольные данные (на 12%), а содержание гомокарнозина снижалось, оставаясь все же выше контроля (на 14%); на 240-й мин наблюдали увеличение содержания путресцина (на 30%), путреанина (на 27%) и L-цистатионина (на 37%) с новым

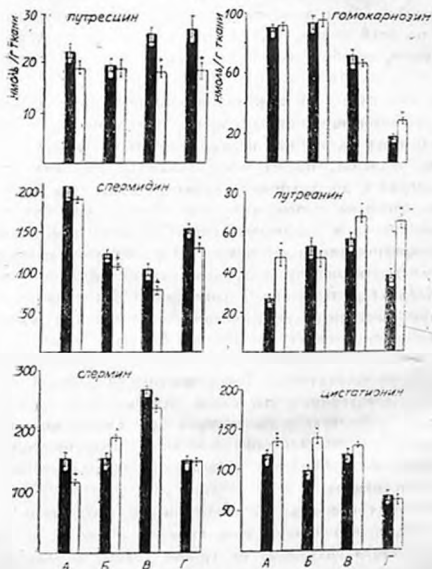


Рис. 2. Содержание полиаминов и специфических компонентов в различных отделах головного мозга крыс при эмоциональном стрессе: А—продолговатый мозг, Б—мозжечок, В—гипоталамическая область, Г—большое полушарие. 1—контроль, 2—сп. Крестиками отмечены достоверные отличия по сравнению с контролем.

высоким подъемом количества гомокарнозина (в 2,2 раза выше нормы) при одновременном снижении концентрации спермидина (на 33%) и спермина (на 16%).

В больших полушариях мозга на 15-й мин ВБ выявилось снижение содержания путресцина (на 34%) и спермидина (на 40%) при одновременном повышении количества спермина (на 17%) и путреанина (на 50%); на 30-й мин наблюдали столь же сниженную концентра-

цию путресцина (на 38%) и увеличение содержания гомокарнозина (на 61%); на 60-й мин выявилось лишь повышение количества гомокарнозина (в 2,5 раза); на 120-й мин—снижение концентрации путресцина (на 25%) при увеличении содержания спермидина, спермина, гомокарнозина и 1-цистатионина (на 29, 75, 28 и 58% соответственно), а на 240-й мин оставалось лишь повышение количества гомокарнозина (в 2,8 раза выше нормы).

Полученные данные свидетельствуют о том, что наиболее выраженные изменения были отмечены в мозжечке и гипоталамической области, где, по всей видимости, ВБ значительно влияло на интенсивность процессов метаболизма полиаминов и специфических компонентов.

Выраженные сдвиги содержания полиаминов и специфических компонентов в исследованных отделах мозга выявлялись уже на 15-й мин ВБ. Это указывает на то, что первые минуты нахождения животных в непривычных условиях, по-видимому, являются для них весьма трудными и приводят к достоверному снижению количества полиаминов (за исключением спермина в продолговатом мозгу и больших полушариях, а также спермидина в гипоталамической области) при повышении количества специфических компонентов (метаболитов полиаминов?) за исключением гомокарнозина в продолговатом мозгу и больших полушариях, а также 1-цистатионина в последних. Затем на 30- и 60-й мин ВБ наблюдали частичную нормализацию содержания полиаминов и специфических компонентов, а на 120- и 240-й мин вновь были зарегистрированы изменения концентрации исследуемых соединений (особенно специфических компонентов). Такие изменения, видимо, представляют собой пример адаптации к постоянно действующему стрессору, когда после сдвигов возникает нормализация состояния, но уже на новом уровне, позднее сменяющаяся под действием продолжающегося стресса новым ухудшением состояния с возможным повышением интенсивности метаболизма полиаминов.

Концентрация спермина на 15-й мин ВБ была ниже контрольных данных только в мозжечке и гипоталамической области. Поддержание концентрации этого полиамина на уровне нормы, видимо, является защитной реакцией при стрессе, так как спермин играет немаловажную роль в биосинтезе ДНК. Содержание 1-цистатионина также сохранялось на высоком уровне, вероятно, из-за того, что этот агент является нейромодулятором в системе торможения [13] и участвует в миелинизации [14]. Как и при ИММ [1], при ВБ выявились противоположно направленные изменения содержания путресцина с гомокарнозином и спермидина с путресцином.

Анализ полученных данных показывает, что ВБ оказывало на ЦНС животных несколько более щадящее действие, чем ИММ [1], о чем свидетельствуют менее выраженные изменения концентрации полиаминов и специфических компонентов в различных отделах мозга при ВБ.

Исследования содержания полиаминов и специфических компонентов.

при 60-минутном воздействии ЭС дали результаты, представленные на рис. 2.

В продолговатом мозгу в результате ЭС было найдено понижение содержания спермина (на 24%) и повышение концентрации l-цистатинина (на 15%), особенно же путреанина (на 76%). В мозжечке ЭС приводил к снижению количества спермидина (на 15%) и увеличению содержания спермина (на 20%), а также l-цистатинина (на 39%); в гипоталамической области—к уменьшению концентрации путресцина (на 30%), спермидина (на 26%) и спермина (на 12%) при увеличении количества путреанина (на 20%). В больших полушариях при ЭС происходило снижение содержания путресцина (на 31%) и спермидина (на 15%) при увеличении содержания гомокарнозина (на 32%) и путреанина (на 70%).

Эти данные показывают, что достоверные разнонаправленные изменения содержания полиаминов и специфических компонентов при воздействии ЭС имели место во всех исследованных отделах мозга, причем количество полиаминов в этих отделах либо не изменялось, либо снижалось (исключением явилось лишь повышение концентрации спермина в мозжечке). Концентрация же специфических компонентов, наоборот, или оставалась стабильной, или повышалась. Таким образом, и в случае ЭС полученные данные, в общем, оказались близкими к результатам, полученным при других стрессорных воздействиях (ИММ и ВБ). При ЭС наибольшее повышение содержания специфических компонентов было установлено в случае путреанина (в продолговатом мозгу, гипоталамической области и больших полушариях).

С целью коррекции изменений содержания полиаминов и специфических компонентов в головном мозгу при воздействии изученных моделей стресса нами была исследована возможность использования феназелама. Феназела́м—отечественный препарат, по своим транквилизирующим, седативным и гипнотическим свойствам (при меньшей токсичности) превосходящий близкие к нему другие вещества бенздиазепинового ряда [15, 16]. В наших опытах феназела́м вводили крысам внутривенно за 10—20 мин до начала стрессорных воздействий в дозе 0,5 мг/кг массы. В связи с тем, что выраженные сдвиги содержания исследованных веществ в мозгу были установлены уже на 15-й мин ИММ [1] и ВБ, действие феназела́ма было испытано именно при этом сроке воздействия; в случае ЭС экспозиция составляла 60 мин. Полученные результаты представлены на рис. 3.

В продолговатом мозгу контрольных животных введение феназела́ма вызывало повышение концентрации путресцина (на 30%) и снижение содержания l-цистатинина (на 26%), в мозжечке—понижение концентрации гомокарнозина (на 28%), путреанина (на 30%) и l-цистатинина (на 37%); в гипоталамической области имело место увеличение содержания всех полиаминов—путресцина (на 50%), спермидина (на 20%) и спермина (на 24%) при одновременном снижении концентрации специфических компонентов—гомокарнозина (на 30%), путреанина (на 25%) и l-цистатинина (на 31%); в больших полушариях

обнаружено только понижение (на 20%) содержания путресцина. В общем эти данные противоположны описанным выше в случае действия стрессорных факторов.

Состояния стресса различного происхождения (прежде всего в результате ИММ), как это видно на рис. 3, по сравнению с величинами, установленными после инъекции феназепама и норме, в основном сопровождались снижением количества полиаминов. Однако нельзя не за-

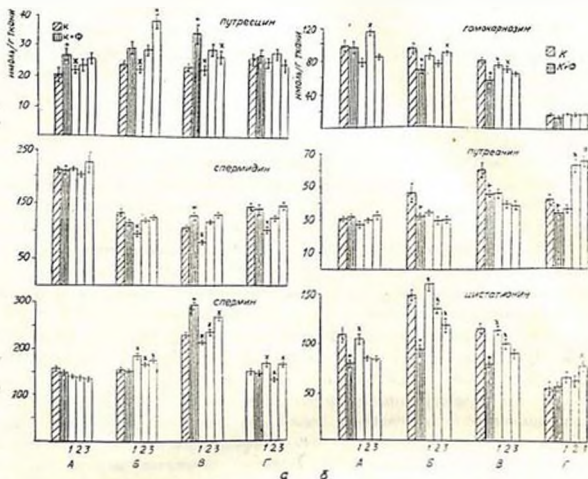


Рис. 3. Содержание полиаминов (а) и специфических компонентов (б) в различных отделах головного мозга крыс, получивших перед экстремальным воздействием феназепам: А—продолговатый мозг, Б—мозжечок, В—гипоталамическая область, Г—большие полушария; К—контроль, К+Ф—контроль на феназепам, 1, 2, 3—соответственно иммобилизация, вращение в барабане, эмоциональный стресс, + — достоверность по сравнению с контролем, * — по сравнению с контролем на феназепам

метить, что при ЭС в больших полушариях повышалось содержание путресцина, содержание спермина в мозжечке повышалось во всех случаях стресса, а в больших полушариях—при ИММ и ЭС. При этом концентрация специфических компонентов или повышалась (в большинстве случаев) или не отличалась от данных у контрольных животных, которым также вводили феназепам.

Так, 15-минутная ИММ в продолговатом мозгу у крыс, которым предварительно был введен феназепам, сопровождалась снижением концентрации путресцина (на 20%) и повышением 1-цистатионина (на 29%), в мозжечке—уменьшением концентрации путресцина (на 25%) и спер-

мидина (на 21%) при одновременном возрастании количества спермина (на 21%). гомокарнозина (на 25%) и 1-цистатионина (на 75%), в гипоталамической области—снижением содержания путресцина (на 37%), спермидина (на 39%) и спермина (на 27%) наряду с повышением концентрации гомокарнозина (на 32%) и 1-цистатионина (на 37%), а в больших полушариях—уменьшением содержания спермидина (на 31%) и увеличением концентрации спермина (на 14%).

У животных, которым предварительно вводили феназепам, 15-минутное ВБ в продолговатом мозгу вызывало лишь увеличение содержания гомокарнозина (на 19%), в мозжечке—повышение концентрации спермина (на 8%) и 1-цистатионина (на 41%), в гипоталамической области—увеличение содержания гомокарнозина (на 21%) и 1-цистатионина (на 28%) наряду со снижением количества спермина (на 19%), в больших полушариях—понижение количества спермина (на 9%) при значительном повышении содержания путресцина (в 1,9 раза).

У крыс, получивших предварительно феназепам, в результате 60-минутного ЭС в продолговатом мозгу сдвигов в содержании исследованных веществ не было обнаружено, в мозжечке было установлено повышение количества путресцина (на 31%), спермина (на 15%), гомокарнозина (на 31%) и 1-цистатионина (на 25%), в гипоталамической области—снижение концентрации путресцина (на 24%) и спермина (на 7%), в больших полушариях—увеличение содержания спермина (на 12%), 1-цистатионина (на 35%) и особенно путресцина (на 93%).

Итак, можно видеть, что у животных, получавших феназепам, исследованные стрессорные состояния в большинстве случаев лишь снижали те эффекты, которые вызывал сам по себе феназепам. Следовательно, предварительное введение феназепама способствовало существенной нормализации содержания полиаминов и специфических компонентов в продолговатом мозгу и в больших полушариях; несколько слабее корректирующий эффект феназепама проявился в мозжечке и гипоталамической области.

Особенно отчетливо положительное профилактическое влияние феназепама выявляется при сравнении данных, установленных при исследовании животных, которых подвергали стрессорным воздействиям после введения феназепама, и интактных контрольных крыс, не получавших этого агента. Так, можно отметить, что при ЭС содержание путресцина в продолговатом мозгу, мозжечке и гипоталамической области у «феназепамовых» крыс оказалось даже выше нормы; при ВБ то же обнаружили в двух последних отделах; при ИММ же данные совпадали с нормой. Лишь ИММ приводила к снижению (небольшому) содержания спермидина в исследуемых отделах мозга (за исключением продолговатого мозга); содержание спермина в больших полушариях было повышено при ИММ и ЭС, а в мозжечке при всех видах стресса и в гипоталамической области при ЭС; оно снижалось только в продолговатом мозгу и в больших полушариях при ВБ. Что касается специфических компонентов, то содержание гомокарнозина становилось ниже нормы в продолговатом мозгу при ИММ и ЭС, в

мозжечке при ВБ и в гипоталамической области при всех видах стресса; в больших полушариях оно соответствовало норме, а поднималось только в продолговатом мозгу при ВБ. Концентрация путреанина снижалась в мозжечке и гипоталамической области при всех видах стресса, не изменялась в продолговатом мозгу, но резко поднималась в больших полушариях при ВБ и ЭС. Содержание 1-цистатинина снижалось в продолговатом мозгу при ВБ и ЭС, равнялось в этом отделе головного мозга контрольным величинам при ИММ и поднималось лишь в больших полушариях при ЭС.

Описанные различия между результатами, возможно, объясняются тем, что каждый вид стрессорного воздействия на организм по-разному воспринимается нервными центрами различных отделов головного мозга, в которых развиваются адаптивные реакции, толчок которых давало экстремальное воздействие; в результате нейроны различных отделов мозга неодинаково реагировали и на феназепам.

Сопоставление представленных в настоящей работе данных с сообщениями о тормозящем влиянии феназепама на изменения белков и РНК в головном мозгу при нарушении циклов бодрствование—сон [3, 4, 6] и при ВБ [5] свидетельствует о том, что феназепам, способствуя нормализации содержания полиаминов и специфических компонентов в различных отделах головного мозга при стрессорных состояниях, следовательно, и в условиях наших опытов должен был также благотворно влиять на нормализацию процессов биосинтеза белков и РНК в мозгу подопытных крыс. Возможно, что активность феназепама осуществляется через его взаимодействие с рецепторами тормозных ГАМК-ергических систем [17].

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что полиамины и специфические компоненты мозга могут активно участвовать в адаптационных процессах, развивающихся в головном мозгу в ответ на действие ряда стрессоров. Использование же транквилизатора феназепама позволяет в определенной степени корректировать при этом изменения содержания полиаминов и специфических компонентов мозга.

Важная роль полиаминов и специфических компонентов в жизнедеятельности клеток нервной ткани, а также наличие противоположно направленных изменений в концентрации этих соединений наводит на мысль о существовании одной из возможных сторон адаптационных метаболических процессов в головном мозгу при стрессорных воздействиях. Можно допустить, что при влиянии стрессора на организм раздражение передается в лимбическую систему, а от нее—в соответствующие отделы головного мозга, вызывая катаболизм белков, разложение полиаминов с усилением образования специфических компонентов, которые, оказывая нейродепрессивное действие на лимбическую систему, вызывают торможение передачи возбуждения от нее в соответствующие отделы мозга; благодаря этому нормализуется биосинтез белков, увеличивается синтез полиаминов и уменьшается содержание специфических компонентов.

THE POLYAMINE AND SPECIFIC COMPONENT CONTENT IN THE VARIOUS PARTS OF RAT BRAIN UNDER STRESSOR INFLUENCES. II. ROTATION IN A DRUM AND EMOTIONAL STRESS, CORRECTION OF STRESS PHENOMENA BY PHENAZEPAM

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
Academy of Sciences, Leningrad

The influence of the various stress models (the rotation in a drum and the emotional stress) on the polyamine (putrescine, spermidine, spermine) and the brain specific component (homocarnosine, putrescine, l-cystathionine) content in the rat medulla oblongata, cerebellum, hypothalamic area and large hemispheres has been studied. It has been shown that the stress states were accompanied by considerable changes in the concentration of the compounds mentioned in all brain areas investigated. Pretreatment with tranquillizer—phenazepam led to a notable correction of the polyamine and specific brain component changes induced by stress states (immobilization, rotation in a drum, emotional stress).

ЛИТЕРАТУРА

1. Тигранян Р. А., Демин Н. Н., Ковалев В. Ю. Нейрохимия, т. 6, № 2, с. 237—244, 1987.
2. Александровский Ю. А. Клиническая фармакология транквилизаторов. М., Медицина, 1973.
3. Рашевская Д. А. Физиол. журн. СССР, т. 66, с. 313—317, 1980.
4. Демин Н. Н., Шелепина Е. П., Неробкова Л. Н., Крапивин С. В., Воронина Т. А. Физиол. журн. СССР, т. 72, с. 723—728, 1986.
5. Панов А. Н., Рашевская Д. А.—В кн.: Всесоюз. конф. «Фармакологическая регуляция физической и психической работоспособности», тезисы, докл., с. 16—17, М., 1980.
6. Демин Н. Н., Кривенко Н. Е., Рубинская Н. А. Физиол. журн. СССР, т. 67, с. 460—463, 1981.
7. Науменко Е. В., Дыгалю Н. Н. Онтогенез, т. 10, с. 476—482, 1979.
8. Cicero T., Sharpe L., Robins E., Grote S. J. Neurochem., v. 19, p. 2241—2243, 1972.
9. Inoue H., Mizutani A. Anal. Biochem., v. 56, p. 408—416, 1973.
10. Kanazawa A., Sano I. J. Neurochem., v. 14, p. 211—214, 1967.
11. Kakimoto Y., Nakajima T., Kumon A., Matsuoka Y., Imaska N., Sano I. J. Biol. Chem., v. 244, p. 6003—6007, 1969.
12. Shimizu H., Kakimoto Y., Sano I. J. Neurochem., v. 13, p. 65—73, 1966.
13. Takeuchi H., Mori A., Konaka M., Ohmori S. Brain Res., v. 67, p. 342—348, 1974.
14. Volpe J. J., Luster L. J. Neurochem., v. 17, p. 425—437, 1970.
15. Выхляс Ю. И., Воронина Т. А. Новые лекарственные препараты. Экспресс-информация, № 3, с. 2—6, 1978.
16. Воронина Т. А. Фармакология соединений бензодиазепинового ряда. Автореф. докт. дисс., М., 1978.
17. Tullman J. F., Gallager D. W. Ann. Rev. Neuroscience, v. 8, p. 123—151, 1985.

Поступила 28. V 1986



УДК 577.152.3+612.822.1

ДЕЙСТВИЕ АНТИФЕИНОВ НА СИСТЕМУ
сАМР В МОЗГУ КРЫС

ЛИШНЕВСКАЯ Е. Б., КУЛИКОВА О. Г., РАЗУМОВСКАЯ Н. И.

Институт экспериментальной медицины АМН СССР, Ленинград

В опытах *in vitro* исследовано действие стимулятора долговременной памяти— этилпирантифенина (этимизола)—на активность аденилатциклазы и фосфодиэстеразы сАМР в ткани мозга крысы. В диапазоне концентраций 10^{-8} — 10^{-3} М этимизол не влиял ни на базальную, ни на стимулируемую NaF активность аденилатциклазы в мембранной фракции серого вещества коры больших полушарий и в гомогенате полосоатого тела, независимо от того, присутствовал ли в среде эндогенный аденозин, или он был удален с помощью добавления аденозиндеаминазы. Эти результаты опровергают существовавшее ранее предположение о возможности действия этимизола на аденилатциклазу через рецепторы аденозина. Активность фосфодиэстеразы сАМР с высоким и низким сродством к субстрату снижалась в присутствии этимизола. Ингибирующее влияние препарата было более выражено по отношению к высокоаффинным формам фермента: достоверное торможение наблюдалось уже при концентрациях этимизола 10^{-5} — 10^{-4} М. Действие на высокоаффинную фосфодиэстеразу сАМР структурного аналога этимизола, аллилпирантифенина, оказывающего отрицательное влияние на долговременную память, не отличалось от действия этимизола. Степень торможения фермента находилась в линейной зависимости от логарифма концентрации препаратов. Сравнение эффектов этимизола и классического ингибитора фосфодиэстеразы теофиллина выявило различный характер зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации этих препаратов. При их совместном добавлении эффект был сильнее, чем действие каждого в отдельности, хотя и не строго аддитивным, что дает основание предполагать наличие разных, но, возможно, частично перекрывающихся участков их связывания на молекуле фермента.

Система сАМР контролируется в клетке множеством механизмов. Один из них связан с наличием в клеточной мембране рецепторов аденозина, модулирующих активность аденилатциклазы [1]. Кофеин и другие метилксантины блокируют аденозиновые рецепторы, и в настоящее время полагают, что именно это свойство лежит в основе их влияния на функции ЦНС [2]. В отделе фармакологии Института экспериментальной медицины была синтезирована группа моноциклических производных кофеина с разомкнутым пиримидиновым кольцом и взаимно переставленными C=O и NH группами в этом кольце. Производные были названы антифеинами, так как они оказались антагонистами кофеина по дей-

ствию на кору головного мозга и поперечнополосатую мускулатуру холоднокровных [3]. Некоторые фармакологические эффекты антифенинов, в частности их седативное действие и способность вызывать гипотензию, напоминают эффекты внеклеточного аденозина. Это послужило основанием для предположения о пуринергическом характере действия антифенинов, опосредуемом аденозиновыми рецепторами. Косвенным подтверждением этого предположения явилось то, что один из антифенинов, обладающий специфической способностью стимулировать долговременную память—этилнорантифенин (этимизол)—вызывал при внутрибрюшинном введении значительный подъем уровня сАМР в ткани мозга крыс [4]. Однако прямые доказательства аденозиноподобного действия антифенинов на аденилатциклазу могли быть получены только при проведении исследований *in vitro*. В связи с этим мы изучили действие антифенинов на ферменты системы сАМР в разных отделах мозга крысы.

Материалы и методы

Объектами исследования были грубая митохондриальная фракция и постмитохондриальный супернатант серого вещества коры больших полушарий, а также гомогенат полосатого тела мозга белых беспородных самцов крыс массой 200—250 г.

Гомогенат полосатого тела получали, мягко гомогенизируя ткань в 9 объемах среды, содержащей 0,32 М сахарозу, 0,025 М трис-НСl, рН 7,5 и 0,002 М ЭДТА. Гомогенат замораживали в жидком азоте и хранили при -18° . Для получения фракций серого вещества коры ткань гомогенизировали в 9 объемах среды, содержащей 0,32 М сахарозу, 0,05 М трис-НСl, рН 7,5 и 0,005 М $MgCl_2$. Гомогенат центрифугировали 10 мин при 1000g. Осадок промывали средой выделения, объединенные постядерные надосадочные жидкости центрифугировали 30 мин при 11000g. Супернатант (постмитохондриальную фракцию) дополнительно осветляли центрифугированием 30 мин при 11000g. Осадок—грубую митохондриальную фракцию, содержащую большую часть плазматических мембран—суспендировали в 0,05 М трис-НСl, рН 7,5. Суспензию центрифугировали 30 мин при 11000g. Промытую мембранную фракцию ресуспендировали в небольшом объеме 0,05 М трис-НСl, рН 7,5 (5—6 мг белка/мл) и замораживали в жидком азоте. Белок определяли по Lowry и соавт. [5].

Активность аденилатциклазы определяли, модифицируя способ Rpmont и соавт. [6], по образованию [^{32}P]сАМР из [α - ^{32}P]АТР. Инкубационная смесь (90 мкл) содержала: 10^{-4} М [α - ^{32}P]АТР (У.А. $7\text{--}15 \cdot 10^7$ имп/мин/мкмоль); 10^{-3} М [3H]сАМР (У.А. $5 \cdot 10^5$ имп/мин/мкмоль); $5 \cdot 10^{-2}$ М трис-НСl, рН 7,5; $4 \cdot 10^{-6}$ М GTP; $2 \cdot 10^{-4}$ М папаверин; 10^{-2} М креатинфосфат и 50 ед/мл креатинкиназы. При определении активности фермента в коре мозга в состав инкубационной среды входили также $8 \cdot 10^{-2}$ М NaCl и $5 \cdot 10^{-3}$ М $MgCl_2$ [7], а при работе с ферментом стрнатума— $4 \cdot 10^{-4}$ М ЭГТА и 10^{-3} М $MgCl_2$ [6]. Кроме

того, в часть проб добавляли $1.8 \cdot 10^{-2}$ М NaF и 1—5 ед/мл аденозиндезаминазы. Гомогенат или суспензию мембран вносили в пробы непосредственно перед началом инкубации, которую вели в течение 20 мин при 37° . Синтез сАМР линейно зависел от концентрации белка (10—80 мкг на пробу) и от времени инкубации. Обычно пробы содержали 40 мкг белка. Продукт реакции идентифицировали с помощью ТСХ на пластинках «Silufol» (ЧССР), импрегнированных насыщенным раствором буры. Реакцию останавливали нанесением 20 мкл инкубационной смеси на пластинки. Хроматографию проводили в системе: этанол—ацетон—насыщенный раствор буры (2:1:1) [8]. Пятна сАМР, выявленные с помощью ультрафиолескопа, вырезали, помещали во флаконы для счета радиоактивности и заливали 0,5 мл H_2O . Через 18—20 ч в пробы вносили по 10 мл сцинтиллятора Брэя. Радиоактивность сАМР ($[^3H]$ и $[^{32}P]$ отдельно) определяли в счетчике «Rack Beta» («LKB», Швеция).

Активность ФДЭ сАМР определяли по образованию $[^3H]$ АМР (при работе с постмитохондриальным супернатантом) или суммы $[^3H]$ АМР и $[^3H]$ аденозина (при работе с мембранной фракцией, содержащей 5'-нуклеотидазу) из $[^3H]$ сАМР. Инкубационная смесь (60 мкл) содержала: $3 \cdot 10^{-4}$ или 10^{-7} М $[^3H]$ сАМР, с У. А. соответственно $2-3 \cdot 10^3$ и $6-9 \cdot 10^6$ имп/мин/моль сАМР; $5 \cdot 10^{-2}$ М трис-НСl, рН 7,5; $5 \cdot 10^{-3}$ М $MgCl_2$. Для каждой изучаемой формы фермента выбирали концентрации белка и время инкубации на линейном участке кривой зависимости активности от этих параметров. Реакцию начинали добавлением в пробы ферментного белка и останавливали так же, как при определении активности аденилатциклазы. Предварительно на пластинки наносили свидетели—сАМР и аденозин. АМР при данных условиях хроматографии остается на старте. Из хроматограммы вырезали пятна сАМР, аденозина и АМР и определяли их радиоактивность, как описано выше. Активность мембранной ФДЭ рассчитывали, используя формулу

$$\frac{[^3H] \text{ аденозин} + [^3H] \text{ АМР}}{[^3H] \text{ аденозин} + [^3H] \text{ АМР} + [^3H] \text{ сАМР}} \times 100,$$

по которой определяли долю гидролизованной сАМР в процентах, и затем активность фермента подсчитывали, исходя из известного количества сАМР, первоначально добавленного в пробу. Для растворимого фермента пользовались формулой

$$\frac{[^3H] \text{ АМР}}{[^3H] \text{ АМР} + [^3H] \text{ сАМР}} \times 100,$$

так как эта фракция не содержит 5' нуклеотидазы.

Результаты и обсуждение

В наружных мембранах клеток мозга найдены два типа рецепторов аденозина, модулирующих активность аденилатциклазы: А₁—нигибирующий, с высоким сродством к аденозину и его рибозосодержащим

производным и A_2 —активирующий, с низким сродством к этим соединениям. Однако рецептор A_2 обычно не удается обнаружить в бесклеточных препаратах из большинства отделов мозга, тогда как рецептор A_1 выявляется в них вполне отчетливо [9]. Предполагается, что, возможно, в процессе выделения нарушается сопряжение рецептора A_2 с каталитической субъединицей аденилатциклазы, поэтому активация фермента аденозином и его производными наблюдается лишь при работе со срезами мозга или в опытах *in vivo*. В бесклеточной системе этот феномен удалось выявить в гомогенате (при условии очень мягкой гомогенизации) стриатума, в котором содержание A_2 рецепторов выше, чем в других отделах мозга [10]. В связи с этим для оценки влияния этимизола на активность аденилатциклазы мозга через аденозиновые рецепторы мы использовали два препарата—сырую мембранную фракцию серого вещества коры больших полушарий и гомогенат стриатума мозга крысы.

Ингибирующее действие производных аденозина на активность аденилатциклазы через A_1 рецепторы наиболее отчетливо проявляется в присутствии Na^+ [7]. Поэтому бесклеточная система для выявления возможного действия этимизола на A_1 рецептор содержала также $8 \cdot 10^{-2}$ М NaCl. Нам, однако, не удалось обнаружить влияния этимизола (в интервале концентраций 10^{-8} — 10^{-3} М) ни на базальную, ни на стимулируемую NaF активность, независимо от того, присутствовал ли в мембранах эндогенный аденозин, или он был удален с помощью аденозиндеаминазы (табл. 1).

При работе с гомогенатом стриатума мы воспроизвели условия, использованные в работах, в которых было продемонстрировано активирующее влияние возрастающих концентраций агонистов аденозина на аденилатциклазу [6, 10]. Отчетливым критерием наличия рецептора A_2 в наших препаратах было значительное снижение активности фермента в контрольных пробах при внесении в среду аденозиндеаминазы (табл. 1), что свидетельствует об активирующем влиянии эндогенного аденозина. Но никакого эффекта этимизола и в этом случае мы не наблюдали.

Эти результаты позволяют заключить, что обнаруженное ранее увеличение содержания сАМР в ткани мозга после введения этимизола [4], очевидно, не могло быть следствием активации аденилатциклазы этим антифенином ни непосредственно, ни через аденозиновые рецепторы. Возможно, что активация фермента, наблюдаемая в опытах *in vivo* [11], могла быть опосредована другой рецепторной системой, например, адренергической.

Подъем уровня сАМР в ткани мозга мог быть обусловлен и влиянием этимизола на другой фермент системы сАМР—ФДЭ.

В настоящее время в литературе нет достаточно четкой классификации ФДЭ циклических нуклеотидов. Тем не менее, ФДЭ принято характеризовать по нескольким основным признакам—локализации в клетке, сродству к субстрату и способности активироваться Ca^{2+} или

Таблица 1

Действие этимизола на активность аденилатциклазы
(пмоль cAMP/мг белка в мин) в ткани мозга крыс

Исследуемый препарат	Присутствие аденозин-дезаминазы	Аденилатциклаза	Контроль	Этимизол, М					
				10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}
Плазматические мембраны серого вещества коры больших полушарий	+	Базальная	22 ± 1	21 ± 1	20 ± 1	20 ± 1	22 ± 1	20 ± 1	—
	—	NaF активированная	201 ± 11	—	214 ± 14	224 ± 18	216 ± 7	224 ± 8	198 ± 9
	+	"	201 ± 2	—	216 ± 13	219 ± 13	223 ± 14	220 ± 9	207 ± 4
Гомогенат полосатого тела	—		229 ± 8	—	239 ± 4	239 ± 10	212 ± 13	237 ± 10	243 ± 2
	+		130 ± 5	—	133 ± 4	131 ± 1	125 ± 9	134 ± 7	121 ± 7

комплексом Ca^{2+} -кальмодулин [12]. Предполагается, что в регуляции базального уровня сАМР принимает участие только ФДЭ с высоким сродством к субстрату—тип IV по номенклатуре, приведенной Strada и соавт. [12], поскольку K_m фермента с низким сродством значительно превышает внутриклеточную концентрацию сАМР в неэкстремальных условиях.

Мы исследовали влияние антифенинов на активность ФДЭ сАМР с высоким и низким сродством в препаратах плазматических мембран и клеточного сока серого вещества коры больших полушарий мозга крысы. Для того, чтобы при определении активности ферментов с разными K_m не происходило взаимного перекрывания, использовали концентрации субстрата, различающиеся друг от друга в 3000 раз: $3 \cdot 10^{-4}$ М для фермента с низким сродством и 10^{-7} М для фермента с высоким сродством. Подобно кофенну, производным которого он является, этимизол проявил способность ингибировать ФДЭ. Правда, по отношению к ферменту с низким сродством достоверное торможение наблюдалось лишь при концентрациях препарата 10^{-3} — 10^{-2} М (табл. 2), которые вряд ли могут быть достигнуты в ткани мозга при применении этимизола в терапевтических дозах. Активность ФДЭ с высоким сродством оказалась более чувствительной к этимизолу: уже в концентрациях 10^{-5} — 10^{-4} М он заметно снижал активность фермента (рис.). Степень торможения линейно зависела от логарифма концентрации препарата.

Таблица 2

Действие этимизола и теофиллина на активность ФДЭ (нмоль сАМР/мг белка в мин) с низким сродством по фракциях мембран и клеточного сока серого вещества коры мозга крысы

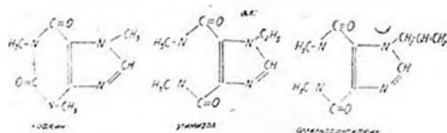
Исследуемый препарат	Контроль	Этимизол, М					Теофиллин, М				
		10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}
Плазматические мембраны	37,8 $\pm 2,9$	35,2 $\pm 2,0$	36,4 $\pm 1,8$	35,5 $\pm 2,7$	31,1* $\pm 1,2$	19,2** $\pm 1,6$	37,8 $\pm 2,3$	38,6 $\pm 1,2$	37,3 $\pm 2,4$	30,4* $\pm 1,3$	11,6** $\pm 0,3$
Постмитохондриальный супернатант	88,3 $\pm 1,8$	83,6 $\pm 2,1$	82,7 $\pm 3,3$	80,6 $\pm 2,6$	69,8* $\pm 3,2$	35,5** $\pm 1,0$	91,5 $\pm 3,0$	86,2 $\pm 2,1$	78,1 $\pm 3,6$	48,5* $\pm 2,8$	20,5** $\pm 2,2$

Примечание. Достоверность изменений по отношению к контролю: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

В последние годы обнаружено, что мембранная ФДЭ сАМР с высоким сродством к субстрату способна регулироваться производным аденозина в присутствии 10^{-5} М GTP, что дало повод к предположению об участии аденозиновых рецепторов в этом феномене [13]. Мы попытались воспроизвести этот эффект, заменив фенилизопропиладенозин, использованный авторами, этимизолом. Однако добавление в среду 10^{-5} М GTP никак не влияло на ингибирующий эффект этимизола ни в присутствии эндогенного аденозина, ни после удаления его путем

добавления аденозинидезаминазы. Следовательно, действие этимизола на ФДЭ (как и на аденилатциклазу) не имеет сходства с эффектами аденозиновых производных и, по-видимому, не связано с рецепторами аденозина.

Другой представитель группы антифеинов—аллилнорантифенин, отличающийся от этимизола более длинным радикалом в первом положении имидазольного кольца, ингибировал активность ФДЭ с высоким сродством так же, как этимизол (рис.). Никаких достоверных количественных различий в действии этих двух препаратов не наблюдалось. Между тем, эти соединения оказывают противоположное действие на долговременную память [14]: если этимизол уменьшает дефицит навыка при выработке условного рефлекса, то аллилнорантифенин его увеличивает. Отсюда можно заключить, что влияние этих препаратов на память, по-видимому, не опосредовано их действием на систему сАМР.



В связи с тем, что антифеины являются производными метилксантинов, представляло интерес сравнить характер действия этих двух групп соединений на ФДЭ сАМР. Мы сравнили эффекты этимизола и классического ингибитора ФДЭ—теофиллина.

Подобно этимизолу, теофиллин тормозил активность фермента с с низким сродством лишь в наиболее высоких концентрациях (10^{-3} и 10^{-2} М), но его ингибирующий эффект был сильнее: активность ФДЭ в присутствии 10^{-2} М теофиллина была в 1,5—2 раза ниже, чем в присутствии этимизола в той же концентрации (табл. 2). Интересно отметить, что в концентрации 10^{-3} М и выше теофиллин заметно подавлял и активность 5'-нуклеотидазы (доля радиоактивного аденозина в процентах от гидролизованного радиоактивного сАМР резко снижалась по сравнению с контролем), в то время как этимизол в высоких концентрациях не производил такого действия и даже несколько активировал фермент.

Несколько неожиданный результат был получен при сравнении влияния этимизола и теофиллина на ФДЭ сАМР с высоким сродством. В концентрациях 10^{-5} — 10^{-4} М, когда этимизол уже достоверно тормозил активность фермента, теофиллин не оказывал действия; однако в концентрации 10^{-2} М он подавлял активность ФДЭ с высоким сродством (как и активность ФДЭ с низким сродством) сильнее, чем этимизол (рис.). Перескрест кривых зависимости активности высокоаффинной ФДЭ сАМР от концентрации двух сравниваемых ингибиторов, который неизменно воспроизводился в опытах на разных препаратах мембранного и растворимого фермента, давал возможность предположить, что эти соединения связываются с разными участками белковой молеку-

кулы, причем этимизол имеет более высокое сродство к своему участку, чем теофиллин—к своему, но связывание теофиллина, по-видимому, изменяет конформацию фермента более неблагоприятно для его активности.

Для проверки этого предположения мы сравнили действие обоих ингибиторов с их сочетанием в тех же концентрациях. Концентрации этимизола и теофиллина были выбраны вблизи от точки пересечения кривых на рисунке. Результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3

Действие этимизола, теофиллина и их сочетания на активность ФДЭ сАМР (в %) с высоким сродством в мембранах серого вещества коры мозга крыс

Ингибитор	Концентрация ингибитора (М)		
	$5 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$
Этимизол	$42,1 \pm 1,8$	$37,3 \pm 1,0$	$25,5 \pm 1,8$
Теофиллин	$55,0 \pm 1,2$	$35,8 \pm 0,8$	$22,1 \pm 1,2$
Этимизол + теофиллин	$28,3 \pm 1,4$	$19,6 \pm 0,4$	

Примечание. Активность фермента выражена в процентах от контроля; активность в контрольном варианте равна $50,6 \pm 1,1$ пмоль/мг белка в мин.

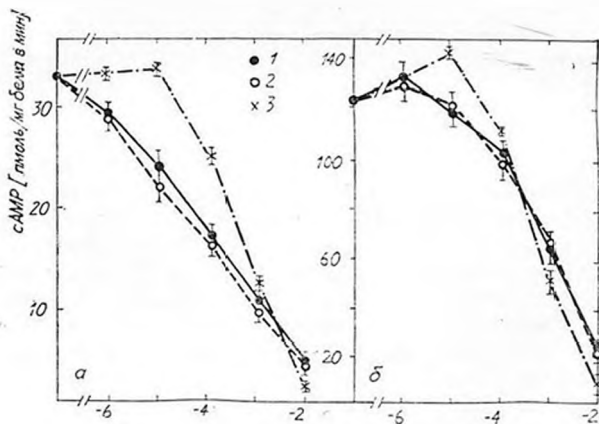


Рис. Действие этимизола, аллоксантифина и теофиллина на активность высокоаффинной ФДЭ сАМР во фракциях мембран (а) и цитозольного сока (б) из серого вещества больших полушарий коры мозга крысы. 1—этимизол, 2—аллоксантифин, 3—теофиллин. По оси ординат—активность ФДЭ в пмоль сАМР/мг белка в мин, по оси абсцисс—lg [I], М

Сочетанное действие ингибиторов в концентрациях $5 \cdot 10^{-4}$ и 10^{-3} М производило значительно более выраженный эффект, чем каждый из

них в отдельности, однако меньший, чем аддитивный. Возможно, связывание одного из ингибиторов снижает сродство к другому. Не исключено также, что этимизол и теофиллин связываются хотя и в различных, но частично перекрывающихся участках молекулы фермента, тем более, что в структуре обоих имеется общий компонент—имидазольное кольцо.

Как бы то ни было, заметное подавление этимизолом высокоаффинной ФДЭ cAMP может существенно отражаться на уровне cAMP в ткани мозга и быть причиной некоторых терапевтических эффектов этого препарата.

EFFECT OF ANTIFEINES ON THE cAMP SYSTEM IN RAT BRAIN STRUCTURES

LISHNEVSKAYA E. B., KULIKOVA O. G., RAZUMOVSKAYA N. L.

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

The effects of long-term memory stimulant—ethylnorantifeine (ethymizol)—on the adenylate cyclase and cAMP phosphodiesterase activities in rat brain tissue have been studied. Ethymizol (10^{-6} — 10^{-3}) did not influence basal and NaF-stimulated activities of adenylate cyclase in the membrane fraction of cerebral cortex gray matter and in the homogenate of striatum. This inactivity of ethymizol was not dependent on whether endogenous adenosine was present in the medium or it was eliminated by means of adenosine deaminase. These results disprove the suggestion that ethymizols effect on adenylate cyclase in vivo is mediated through its interaction with adenosine receptors.

Ethymizol inhibited phosphodiesterase, especially cAMP high affinity form. The effect on this enzyme of structural analog of ethymizol—alilnorantifeine exerting negative influence on long-term memory—was the same as the effect of ethymizol. The comparison of effects of ethymizol and theophylline has shown different patterns of phosphodiesterase activity as a function of drug concentration. The combination of these drugs inhibited enzyme activity more profoundly than either preparation but the effect was not additive. One can assume the presence of different but perhaps partially overlapping binding sites for these drugs in enzyme molecule.

ЛИТЕРАТУРА

1. Regulatory function of adenosine (eds. Berne R. M., Rall T. W., Rubio R.) M. Nijhoff Publishers, the Hague, 1983.
2. Daly J. W., Bruns R. F., Snyder S. H. Life Sci., v. 23, p. 2080—2097, 1981.
3. Бородин Ю. С. Антифеины. М., Медицина, 1966.
4. Заводская И. С., Митас Э. А., Бульон В. В. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 79, № 3, с. 54—55, 1975.
5. Lowry O. H., Rosebrough N. G., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., v. 195, p. 265—275, 1951.

6. Premont J., Perez M., Bockuert J. FEBS Lett., v. 75, № 1, p. 209—212, 1977.
7. Cooper D. M. F., Londo C., Rodbell M. Mol. Pharmacol., v. 18, p. 598—601, 1980.
8. Upton J. D. J. Chromatogr., v. 52, p. 171—172, 1970.
9. Daly J. W.—In: Regulatory function of adenosine (eds. R. M. Berne, T. W. Rall, R. Rubio), p. 97—113, M. Nijhoff Publishers, the Hague, 1983.
10. Premont J., Perez M., Blanc G., Tassin J.—P., Thierry A. M., Herve D., Bockuert J. Mol. Pharmacol., v. 16, p. 750—804, 1979.
11. Муца Э. А., Бульков В. В. Фармакология и токсикология, т. 37, № 6, с. 710—711, 1974.
12. Strada S. J., Martin M. W., Thompson W. J.—In: Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases, p. 13—29, N.—Y., Raven Press, 1984.
13. Muzuncourt de P., Gindicelli G. FEBS Lett., v. 167, № 1, p. 142—146, 1984.
14. Борисова Г. Ю. Влияние производных имидазол- и пиразолдикарбоновых кислот на обучение и условнорефлекторную память у крыс. Автореф. канд. дисс., Ленинград, 1985.

Поступила 20. VIII 1986

Рецепторы пептидных гормонов (перевод с англ.). de Gruyter, 720 с., 1987. Peptide Hormone Receptors. (Ed. by M. Y. Kalimi and J. R. Hubbard). de Gruyter, Berlin, New York, 720 p., 1987.

Пептидные гормоны связываются с высоким сродством с рецепторами клеточных мембран. Гормон-рецепторные комплексы активируют затем различные биологические и физиологические процессы на мембранном и внутриклеточном уровне. Ключевая роль рецепторов пептидных гормонов в механизме действия этих гормонов вызывает интерес к изучению структур и функций этих белков в норме и патологии.

В очередном, VIII томе настоящего издания приведены современные сведения об этой быстро расширяющейся области исследований рецепторов пептидных гормонов. Для каждого класса гормонов приведен исчерпывающий обзор современных концепций и достижений.

В сборник включены статьи: J. R. Hubbard «О рецепторах гормона роста»; R. J. Witorsch и др. «Рецепторы пролактина»; R. T. Premont, Ravi Iyengar «Рецептор глюкагона: структура и функция»; S. J. Bhathena «Об инсулиновом рецепторе»; N. Gallo-Payet «О рецепторе АКТГ»; V. R. Mukku и др. «О рецепторе эпидермального фактора роста»; M. A. Morency, Ram K. Mishra «О холицистокининовом рецепторе»; P. B. Kaplowitz, S. D. Chernauek «О соматомединовых рецепторах»; R. W. Downs, Jr. «О рецепторах кальцитонина» и др.

Книга представляет интерес для широкого круга исследователей в области биологии и медицины.



УДК 612.82:571.1

ДЕЙСТВИЕ НЕКОТОРЫХ ПСИХО- И НЕЙРОТРОПНЫХ
ПРЕПАРАТОВ НА КИНЕТИКУ БИОСИНТЕЗА
ЯДЕРНЫХ ГЛИКОПРОТЕИНОВ НЕЙРОНОВСАИТМУРАТОВА О. Х., РУСТАМОВА Ф. Н.,
САДЫКОВ А. А., ЛЕОНТЬЕВ В. Б.

Институт биоорганической химии АН УзССР, Ташкент

Изучено действие психо- и нейротропных препаратов—хлорпремазина, стрихнина, кокаина и яда кобры на кинетику включения $DL-[^{14}C]$ лизина в белки, синтезируемые ядрами нейрональных клеток головного мозга кроликов. Показаны количественные изменения в кинетике белоксинтезирующей активности ядер при кратковременном и длительном действии исследуемых препаратов. Выявлено их влияние на соотношение скорости быстрых и медленных процессов синтеза низко- и высокомолекулярных фракций нейрональных ядерных гликопротеинов.

Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют о связи процесса обучения у животных с увеличением синтеза в нейронах мРНК и белков. Показано, в частности, что такой мощный ингибитор белкового синтеза, как пуромидин, затрудняет обучение [1].

Одни авторы придают основное значение в механизмах обучения и памяти мембранным процессам облегчения нервной передачи и привыкания, другие рассматривают в качестве химической основы памяти молекулярный код [2]. Открытие пептидных гормонов и либеринов, синтезируемых в нейронах, дало основание полагать существование зависимости формирования долговременной памяти от синтеза специфических аминокислотных последовательностей в определенных нейронах. Несомненно участие белоксинтезирующей системы ядер нейрональных клеток в образовании промежуточных консолидантов продолжительных форм памяти [3].

Однако в активации ядерного синтеза белков большое значение имеет функциональное состояние ядерных мембран нейронов и их способность к передаче сигнала непосредственно на генетический аппарат ядра. В связи с этим исследование действия нейротропных препаратов как инструментов регуляции формирования различных форм памяти приобретает большую актуальность.

Влияние нейротропных препаратов на эффективность синаптической передачи достаточно широко изучено; его связывают с конкурентным

взаимодействием с рецепторами синаптических мембран [4]. Однако действие психо- и нейротропных препаратов на состояние ядерных мембран и сопряженный с ними ядерный белковый синтез представляют особый интерес.

Изучение кинетических зависимостей белоксинтезирующей активности ядер нейрональных клеток при воздействии некоторых известных психо- и нейротропных препаратов—хлорпромазина, стрихнина, кокаина и яда кобры и является целью настоящей работы.

Материалы и методы

Работа проведена на месячных кроликах от одного помета. Из психо- и нейротропных препаратов использовали хлорпромазин, токсичность $LD_{50}=20$ мг/кг веса животных; стрихнин, $LD_{50}=0,9$ мг/кг; кокаин, $LD_{50}=0,2$ г/кг; яд кобры, $LD_{50}=0,1$ мг/кг веса животных. Вводимые концентрации препаратов: хлорпромазин— $1,4$ мг/кг $\approx 1/14$ LD; стрихнин— $0,2$ и $0,4$ мг/кг $\approx 1/2$ LD; кокаин 20 мг/кг $\approx 1/10$ LD и 8 мг/кг $\approx 1/25$ LD; яд кобры— $0,1$ мг/кг. Все препараты растворяли в физиологическом растворе, вводили животным в ушные вены и декапитуировали их через 15 мин и 18 ч. Головной мозг извлекали сразу после забоя, ополаскивали холодным раствором $0,9\%$ -ного NaCl, очищали от оболочек и крови и подсушивали фильтровальной бумагой. Нейрональные клетки коры головного мозга тщательно отделяли от глимальных клеток методом микродиссекции и размельчали вручную в гомогенизаторе с раствором «А», содержащим $0,32$ M сахарозы, $0,003$ M $MgCl_2$ и $0,001$ M K_2HPO_4 , pH $7,4$. Ядра из полученного клеточного гомогената выделяли по методу Lovtrup-Rein [5] центрифугированием в градиенте плотности сахарозы на ультрацентрифуге фирмы «Beckman» (США), с ротором SW-27 при $78000g$ 60 мин.

Надосадочную жидкость сливали, фракции, содержащие ядра нейронов, промывали раствором «А» и суспендировали в $0,25$ M натрий-фосфатном буфере, pH $7,4$. Все процедуры по выделению ядер проводили при 4° . Чистоту и целостность выделенных ядер проверяли микроскопически.

Белоксинтезирующую активность (БСА) в изолированных нейрональных ядрах исследовали по скорости включения DL- $[^{14}C]$ лизина [6]. Инкубацию проводили в течение 60 мин при 37° на качающейся водяной бане. Для этого $0,5$ мл ядерной суспензии в $0,25$ M растворе натрий-фосфатного буфера (pH $7,4$) инкубировали в среде, состоящей из $0,4$ мл ($0,1$ M глюкозы, 25 mM $MgCl_2$, 65 mM NaCl, $0,1$ мл 2 mM $CaCl_2$) и $[^{14}C]$ лизина с У.А. 225 мк/г; для каждого опыта использовали $1 \cdot 10^5$ имп/мин. Кинетику БСА изучали по включению $[^{14}C]$ лизина на протяжении 15 , 30 , 45 и 60 мин инкубационного времени. В контрольные пробы добавляли ТХУ сразу после внесения метки. Инкубацию прекращали добавлением к реакционной смеси 2 мл 20% -ной ТХУ, смесь оставляли на холоду в течение 30 мин и затем

центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин. Полученный осадок ядерных гликопротеинов промывали на миллипоровом фильтре («Synpor», ЧССР) 100 мл 5%-ной ТХУ, затем этиловым спиртом и высушивали на воздухе. Радиоактивность продукта определяли в 10 мл сцинтилляционной жидкости ЖС-8 на счетчике SL-230 фирмы «Beckman» (США). Статистическая обработка результатов показала достоверность ($p < 0,05$). Белок определяли по Lowry и соавт. [7].

Результаты и обсуждение

Ранее было установлено, что в ядрах нейронов головного мозга кроликов *in vitro* синтезируются гликопротеины, состав которых изучен методами ЯМР и ТСХ [8]. Микроскопические исследования показали, что полученные вышеописанным методом ядра нейронов для изучения синтеза белка *in vitro* достаточно чисты и целостны.

Кинетику белкового синтеза в ядрах нейрональных клеток исследовали по включению [^{14}C] лизина через 15, 30, 45 и 60 мин. Часовая кинетика имеет двухступенчатый характер, что свидетельствует о двухфазности процесса с наблюдением четкого времени разделения (рис. 1). Очевидно, что первая ступень синтеза завершается на 30—45-й мин, а вторая выходит на плато на 60—75-й мин. По кинетике наблюдается разделение биосинтеза ядерных белков на относительно быстрые и более медленные синтетические процессы.

Фракционирование радиоактивного продукта на сефадексе G-50 (аммоний-ацетатный буфер, pH 6,06) приводило к разделению на 2 четких пика радиоактивности, которые соответствовали низкомолекулярной фракции (НМФ) с $M_r \approx 10\text{--}15$ кД и высокомолекулярной фракции (ВМФ) с $M_r \approx 25\text{--}30$ кД. Наблюдаемый фракционный состав гликопротеинов подтвердил кинетически выраженную тенденцию к двухступенчатому синтезу сначала НМФ, затем ВМФ гликопротеинов, содержание и соотношение которых резко изменяются с возрастом животных [9]. У молодых животных преобладает ВМФ, у зрелых животных соотношение двух фракций примерно равное. У старых животных содержание ВМФ резко уменьшается. При их внутрибрюшинном введении у животных увеличивается спонтанная двигательная активность и усложняются поведенческие реакции. Вышеизложенные факты свидетельствуют о специфичности синтеза и функции этих двух фракций.

На рис. 2—3 представлены данные исследования кинетики включения [^{14}C] лизина в ядра нейронов головного мозга кроликов при воздействии известных психо- и нейротропных препаратов: хлорпромазина, стрихнина, кокаина и яда кобры. Кратковременные эффекты воздействия препаратов на БСА ядер наблюдали через 15 мин после введения, а более продолжительное — через 18 ч. Исследование кинетики БСА ядер нейронов, выделенных через 15 мин после введения испытанных препаратов, показало резкое снижение скорости синтеза ядерно-

го белка по сравнению с контролем через час после инкубации с меткой (рис. 2, а).

Долговременное действие препаратов на кинетику БСА—через 18 ч после их введения—проявилось в снижении скорости синтеза, но не столь сильно как при кратковременном воздействии (рис. 2, б).

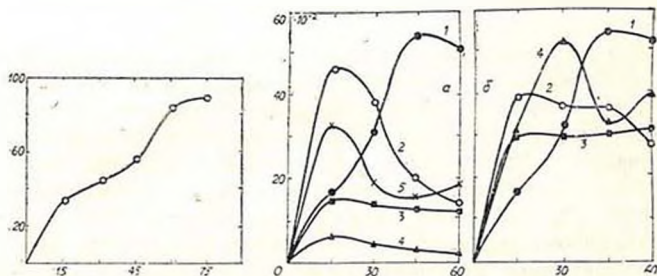


Рис. 1. Кинетика включения DL- $[^{14}\text{C}]$ лизина ядрами нейронов головного мозга кроликов. По оси ординат—процент включения $[^{14}\text{C}]$ лизина в ядерные гликопротеины. По оси абсцисс—время инкубации в мин.

Рис. 2. Кинетика биосинтеза ядерных белков в нейрональных клетках контрольных и подопытных животных через 15 мин (а) и 18 ч (б) после введения препаратов: 1—контроль; 0,9%-ный NaCl; 2—яд кобры 0,1 мг/кг веса; 3—хлорпромазин 1,4 мг/кг; 4—стрихнин 0,4 мг/кг; 5—кокаин 8 мг/кг. По оси ординат—радиоактивность имп/мин/мг ядерного белка. По оси абсцисс—время инкубации в мин.

Действие испытуемых препаратов на кинетику БСА лучше прослеживается при анализе дифференциальных графиков изменения динамики включения $[^{14}\text{C}]$ лизина в ядерный синтез по сравнению с контролем (рис. 3, 4, 5).

Из кинетического анализа дифференциальных показателей включения $[^{14}\text{C}]$ лизина в ядерные белки во времени очевидно сходство действия хлорпромазина и яда кобры на кинетику БСА нейрональных ядер. Действие изученных препаратов через 15 мин после введения показало активацию быстрых процессов (15 мин инкубации) и резкое торможение медленных процессов по сравнению с контролем (рис. 3).

Долговременный эффект этих препаратов проявляется в относительном снижении интенсивности быстрых и активации медленных процессов по сравнению с кратковременным действием препаратов (15 мин). Визуальное наблюдение за поведением животных показало сильное возбуждение во время их введения, последующую нормализацию к 15-й мин и затем даже затормаживание двигательной активности. По-видимому, торможение стадии медленных процессов со снижением скорости синтеза и общей концентрации ВМФ ослабляет двигательную и эмоциональную активность животных, что свидетельствует о снижении уровня информации, кодируемой в устойчивые консолидаты памяти.

Концентрация высокомолекулярных белков под действием нейро-

лептика хлорпромазина и компонентов яда кобры снижается за счет интенсификации синтеза низкомолекулярной фракции. Причем со временем происходит снижение как интенсивности быстрых процессов, так и ослабление торможения медленных. Вышеуказанный факт свидетельствует о наличии динамического равновесия НМФ и ВМФ и баланса скоростей быстрых и медленных процессов в ядрах нейрональных клеток.

Действие нейротропных препаратов—стрихнина и кокаина на кинетику БСА отличается от действия предыдущих препаратов, но сходно между собой. Кратковременное последствие препаратов—через 15 мин после введения проявляется в значительном торможении стадии медленных процессов. Причем, если стрихнин в малой дозе (0,2 мг/кг) подавляет только медленные процессы, то в удвоенной дозе (0,4 мг/кг) тормозит и быстрые, и медленные процессы (рис. 4). Через 18 ч после введения препаратов наблюдается изменение баланса этих двух процессов: торможение медленных процессов ослабляется, но уже за счет стимуляции быстрых (рис. 4, 5). В этом случае также проявляется перераспределение соотношения скоростей из-за наличия динамического баланса в синтезе двух фракций. Здесь наблюдается проявление обратной связи между изменениями скоростей эндогенного синтеза ядерных белков и состоянием пусковых механизмов в мембранных комплексах, индуцирующих его в ядре.

Введение стрихнина и кокаина в ушную вену животных в малой дозе вызывает немедленное торможение двигательной активности. При введении кокаина в дозе 8 мг/кг (1/25 LD₅₀) наблюдается опрокидывание животных лапками вверх, остановка зрачков, а через 15 мин оживление и затем активация с возбуждением движений. Повышение дозы кокаина в 2,5 раза (20 мг/кг) приводит к шоку и гибели животных. Следовательно, полное торможение биосинтеза ядерных белков, соответствующее ареактивности ядерной мембраны и патологическому дефициту информации для ядерных компонентов, губительно для клетки и организма в целом. Продолжительное воздействие кокаина и стрихнина в течение 18 ч проявляется в активации двигательной активности, которой соответствует по кинетике БСА увеличение скоростей синтеза НМФ на стадии быстрых процессов относительно контроля.

Таким образом, изучение кинетических закономерностей функциональной активности ядер нейрональных клеток под влиянием известных психо- и нейротропных препаратов может прояснить многие аспекты процесса передачи информации с ядерной мембраны и кодирования ее в генетическом аппарате нейрональной клетки [3].

Активность БСА ядра отражает реактивное состояние ядерной мембраны. Взаимодействие исследуемых препаратов с рецепторами синаптических мембран (стрихнина с рецепторами глицина [10], хлорпромазина с рецепторами ацетилхолина [11]) может либо повысить концентрацию непептидных медиаторов (циклических нуклеотидов), либо снизить ее, что и отражается на реактивности ядерной мембраны.

Поскольку итоговым эффектом действия хлорпромазина на кинетику БСА является снижение активности медленных процессов синтеза ВМФ гликопротеидов, становится понятным его нейролептическое действие, снижающее эмоциональное и моторное возбуждение.

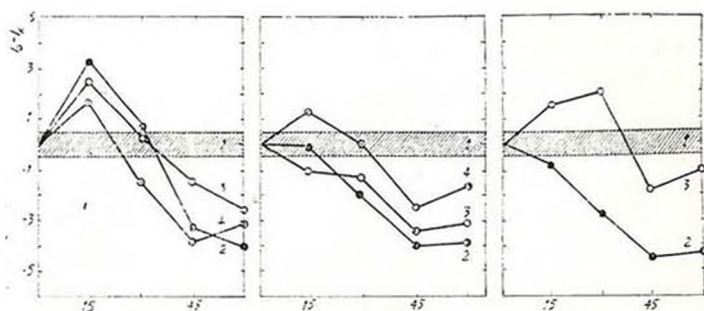


Рис. 3. Кинетика измерений дифференциальных величин радиоактивности (относительно контроля) при действии хлорпромазина и яда кобры на белоксинтезирующую активность ядер нейрональных клеток: 1—контроль; 2—яд кобры через 15 мин; 3—яд кобры через 18 ч; 4—хлорпромазин через 15 мин. Здесь и на рис. 4, 5 по оси ординат—дифференциальная радиоактивность $\Delta I = I_0 - I_x$, по оси абсцисс—время инкубации в мин

Рис. 4. Кинетика изменений дифференциальных величин радиоактивности (относительно контроля) при действии стрихнина на белоксинтезирующую активность ядер нейрональных клеток: 1—контроль; 2—доза 0,4 мг/кг через 15 мин; 3—доза 0,2 мг/кг через 15 мин; 4—доза 0,4 мг/кг через 18 ч

Рис. 5. Кинетика изменений дифференциальных величин радиоактивности (относительно контроля) при действии кокаина (8 мг/кг) на белоксинтезирующую активность ядер нейрональных клеток: 1—контроль; 2—через 15 мин; 3—через 18 ч

Для стрихнина и кокаина очевиден обратный эффект: сначала торможение, а затем активация синтеза НМФ, которые впоследствии могут обусловить и большой поток кодирования информации, облегчая обучение и ускоряя формирование памяти, что хорошо известно для малых доз стрихнина [10]. Очевидно, что выполненные исследования не охватывают весь диапазон доз исследованных препаратов, чтобы делать широкие выводы. Однако уже полученные результаты свидетельствуют о несомненной значимости белоксинтезирующей системы ядер нейрональных клеток в цепи передачи и кодирования информации в память.

Исходя из полученных результатов можно сделать предположение об определяющей роли скорости синтеза и общей концентрации ВМФ гликопротеидов ядра в нормальном функционировании ядерного аппарата. По-видимому, чрезмерные скорости синтеза и высокая концентрация ВМФ обуславливают формирование «патологической» сверх-

устойчивой памяти, что характерно для некоторых форм шизофрении [12]. Применение инсулинокоматозной терапии, способствующей распаду углеводной части гликопротеинов мозга является одним из широко распространенных приемов лечения [13], однако она не устраняет извращенную реактивность и повышенную чувствительность ядерных мембран мозговых нейронов, неадекватно интенсивно отвечающих синтезом ВМФ на один и тот же мембранный стимул.

В настоящей работе мы хотим обратить внимание на существование в ядре не только динамического баланса быстрых и медленных процессов синтеза гликопротеинов, но и оптимальных уровней их синтеза, обеспечивающих нормальное функционирование ядерного аппарата. Всякое отклонение от оптимума в синтезе НМФ и ВМФ может граничить с патологией—либо чрезмерным возбуждением в силу избытка информации, либо функциональным торможением из-за дефицита необходимой информации. Эти отклонения обусловлены, в первую очередь, реактивностью ядерной мембраны—повышенной или пониженной. Повышенная реактивность и чувствительность ядерной мембраны может определяться высокой интенсивностью синтеза НМФ и ВМФ в ответ на стандартный стимул, выраженный, например, уровнем цитоплазматических мессенджеров cAMP—cGMP.

Таким образом, действие психо- и нейротропных препаратов проявляется в модуляции реактивности ядерной мембраны, что отражается в кинетике БСА и соотношении скоростей быстрых и медленных процессов синтеза НМФ и ВМФ ядерных гликопротеинов.

EFFECT OF SOME PSYCHO AND NEUROTROPIC PREPARATIONS UPON KINETICS OF NUCLEAR GLYCOPEPTIDES BIOSYNTHESIS WITHIN NEURON

SAITMURATOVA O. H., RUSTAMOVA F. N., SADYKOV A. A.,
LEONTJEV V. B.

Institute of Bioorganic Chemistry of Uzbek Academy of Sciences.
Tashkent

The influence of neuro and psychotropic preparations namely chlorpromazine, strychnine, cocaine and cobra venom upon kinetics of ¹⁴C-lysine incorporation into proteins, synthesized by rabbit cerebral neuronal cells nuclei has been studied. In short-and long-term effect of the preparations mentioned the qualitative changes in protein synthesizing nuclei activity kinetics are shown. The influence of neurotic preparations upon the ratio of rapid and slow synthesis processes of neuronal nuclear low-and high—M_r glycopeptide fractions has been found.

ЛИТЕРАТУРА

1. Caplan R., Cheung S. C—Y., Omenn G. S. J. Neurochem., v. 22, p. 517—520, 1974.

2. Менделер Д. Биохимия, т. 3, с. 351, 1980.
3. Ашмерин И. П.—В сб.: Фармакология неuropeптидов, с. 102—111, Москва, ВИНТИ, 1982.
4. Лаврская Э. Ф. Фармакологическая регуляция психических процессов, М., Наука, 1985.
5. Loutrup-Rein H., McEwen B. C. J. Cell. Biol., v. 30, № 2, p. 405—415, 1966.
6. Loutrup-Rein H. Brain Res., v. 19, № 3, p. 493—514, 1970.
7. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. K., Randall R. J. J. Biol. Chem., v. 193, № 1, p. 265—275, 1951.
8. Саитмуратова О. Х., Алиходжаева Г., Леонтьев В. Б., Леконцева В. К. Химия природн. соедин., № 4, с. 514—515, 1982.
9. Саитмуратова О. Х., Ахмедова Д., Рашидходжаева Г., Леонтьев В. Б. Узб. биол. журн., № 6, с. 67—69, 1979.
10. Краевский А. А. Биорган. химия, т. 4, № 7, с. 853—878, 1978.
11. Полтораков А. П. Физико-химические свойства производных феноксиазина и их связь с фармакологическим действием. Автореферат канд. дисс., Москва, 1984.
12. Банщиков В. М., Леви В. Э.—В кн.: Терапия психических заболеваний, с. 191, Медгиз, 1961.
13. Чуприков А. П., Липов А. Н., Ковалева Р. И. Тезисы докл. Всесоюзн. симпозиума «Нейрохимические механизмы регуляции памяти», с. 111, Пушкино, 1984.

Поступила 20. VIII 1986



УДК 612.82.821

ВЛИЯНИЕ АНГИОТЕНЗИНА II И АНТИСЫВОРОТКИ
К НЕМУ НА АГРЕССИВНОЕ ПОВЕДЕНИЕ У КРЫС

ПАНФИЛОВ А. Д., ГОМАЗКОВ О. А., КОМИССАРОВА Н. В.

НИИ медицинской физиологии АМН СССР, Москва

Исследовано значение ангиотензина II (А-II) для регуляции агрессивного поведения у спонтанно-мурицидных крыс. Активность ангиотензинпревращающего фермента, исследованная в 6 регионах мозга, у агрессивных животных в 2—3 раза выше в таламо-гипоталамической области и среднем мозгу. Агрессивная реакция тормозится при интрацеребральном и внутрибрюшинном введении А-II. Очищенная антисыворотка к этому пептиду потенцирует проявление агрессивности. Очевидно, система «центрального» ангиотензина принадлежит роль своеобразного индуктора в нейрохимической регуляции эмоциотропных поведенческих реакций и, в частности, агрессивного поведения.

Ангиотензину принадлежит заметная роль в регуляции различных форм поведенческих и вегетативных реакций организма. По мнению Ganten и соавт. [1], «нет другого пептида или биологически активного соединения со столь разносторонним действием на различные регуляторные системы организма». Можно считать доказанным, что в мозгу, независимо от периферии, существует «своя» ренин-ангиотензиновая система с характерным комплексом биохимических компонентов образования, распада и рецепции основного физиологически активного фактора—А-II. Множественность физиологических реакций А-II может быть, в частности, объяснена его сопряженностью с функциями АКТГ, альдостерона, β -эндорфина, серотонина, катехоламинов и др. При этом существенным является аспект регионального образования и действия А-II, приуроченного к определенным отделам и структурам ЦНС.

Комплекс этих вопросов, связанных с регуляторной функцией А-II, может быть рассмотрен на модели агрессивного поведения, которая оценивается как одна из форм эмоциогенного статуса организма. Следует констатировать, что в регуляции различных форм агрессивности участвует несколько групп нейрохимических факторов—классические нейромедиаторы, пептиды, гормоны, во взаимодействии которых не определена какая-либо упорядоченность. Что касается конкретно А-II, информация о его роли в модуляции эмоциотропной активности пред-

ставляется важной [2—4], однако недостаточной в отношении реакций агрессивного поведения.

В данной работе была поставлена задача рассмотреть на примере мурицидной модели (агрессивное поведение крыс, убивающих мышей), активность ангиотензинпревращающего фермента в различных регионах мозга, а также влияние А-II и антисыворотки к этому пептиду на изменения показателей агрессивного поведения.

Материалы и методы

Работа выполнена на 103 беспородных крысах-самцах массой 130—200 г. Крыс из питомника помещали в индивидуальные клетки и давали им стандартную виварийную диету без ограничения пищевого и водного рациона. Из общей группы производили отбор агрессивных животных: крыса признавалась мурицидной, если в течение 3 мин она атаковала подсаженную белую мышь, убивая ее укусами в голову. Тестирование и отбор крыс осуществляли в течение 3-х недель до получения стабильных показателей агрессивности для каждого индивидуального животного. Критериями мурицидного поведения считали процент убивающих крыс из общей группы и латентный период до атаки на мышь с момента ее подсадки. Для более достоверной оценки мурицидности через 5 мин после первого тестирования осуществляли повторную подсадку мыши и учитывали латентный период до второй атаки.

На агрессивных и контрольных крысах были выполнены три серии исследований. В I-й серии исследовали активность ангиотензинпревращающего фермента (АПФ), дипептидилкарбоксипептидаза (К.Ф. 3.4.15.1)—в гипофизе, мозжечке, таламо-гипоталамической области, стриатуме, среднем мозгу и обонятельных луковицах. Выделение зон мозга производилось по схеме [5]. Материал хранили в пластиковых планшетах при -20° до момента исследования ферментативной активности. Активность АПФ определяли по методу Fridland, Silverstein [6] в гомогенатах мозговой ткани, приготовленных на 0,05 М K^{+} -фосфатном буфере, pH 7,5, содержащем 0,01%-ный тритон X-100 в качестве субстрата использовали гиппурил-гистидил-лейцин.

Во II-й серии опытов исследовали влияние А-II на показатели агрессивности при интрацеребральном и внутрибрюшинном введении препаратов. А-II вводили под эфирным наркозом фиксированным на стереотаксической установке крысам, у которых предварительно (за 7 дней) осуществляли частичное скальпирование теменного участка черепа. Препарат вводили 1 раз в объеме 5 мкл в боковые желудочки мозга по стереотаксическим координатам AP+1,5; 2: 6,5 мм. Внутрибрюшинное введение веществ—в дозах 0,3—0,5 мл.

В III-ей серии животным интрацеребрально вводили очищенную кроличью сыворотку к А-II. Исходная антисыворотка была получена в Институте органического синтеза АН Латвийской ССР* и очищена

Авторы приносят глубокую благодарность Г. А. Афанасьевой за предоставление антисыворотки к А-II.

нами на колонке с протеин-А-сефарозой CL-4B. Радиоиммунологическое определение [7] показало, что активность выделенной IgG фракции антител была в 7—10 раз выше исходной антисыворотки.

Статистическая обработка результатов проведена с применением критерия Стюдента и непараметрическим методом с использованием критерия знаков [8]. Последний метод был применен при оценке латентного периода до атаки, который у животных с разной степенью агрессивной реакции достигал значительного диапазона: от I с до полной утраты мурицидности: в этом случае принималась условная величина времени до атаки—180 с.

В работе были использованы следующие реактивы: ангиотензин-II-амид (Экспериментальный завод Института органического синтеза АН Латвийской ССР), гиппурил-гистидил-лейцин, гистидил-лейцин и о-фталевый диальдегид („Serva“, ФРГ), тритон-X-100 („Sigma“, США), протеин-А-сефароза („Pharmacia“, Швеция).

Результаты и обсуждение

Региональные изменения активности АПФ у агрессивных и неагрессивных крыс. На рис. 1 приведены показатели активности АПФ в различных зонах мозга крыс. Наивысшие уровни У.А.—в пределах 3,7—5,5 нмоль His-Leu/мин/мг—отмечаются в ткани гипофиза. Сходные и несколько меньшие значения активности—2,7—3,5 нмоль—обнаружены у неагрессивных крыс в мозжечке, среднем мозгу, стриатуме, таламо-гипоталамической области. Наименьшая активность АПФ выявлена в обонятельных луковицах. Существенным в этих опытах явилось значительное снижение активности АПФ в среднем мозгу и таламо-гипоталамической зоне у крыс с агрессивным поведением. В сравнении с контролем эти величины ниже соответственно в 2,4 и 3,1 раза. У агрессивных крыс в гипофизе и стриатуме отмечается тенденция к увеличению активности АПФ.

Таким образом, агрессивные крысы характеризуются существенно более низким уровнем ферментативной активности, генерирующей образование А-II. Отсюда следует, что изменение концентрации этого пептида в мозгу за счет его экзогенного введения или связывания соответствующей антисывороткой может явиться фактором, модулирующим проявление агрессивности в ту или другую сторону.

Влияние препаратов А-II на агрессивное поведение мурицидных крыс. Следующую серию экспериментов проводили с препаратами А-II, которые вводили интрацеребрально или внутрибрюшинно. Установили, что 7 нг интрацеребрально вводимого А-II приводит к значительному торможению агрессивного поведения (рис. 2). Число животных, утративших мурицидность, в первые 4 ч после введения вещества составляет 57,8—63,1%. Через 24 ч отмечается тенденция к восстановлению показателей агрессивности, через 48 ч эффект интрацеребрально введенного А-II уже отсутствует.

Приведенные данные «процента отказа» подтверждаются изменениями латентного периода атаки у агрессивных крыс. Показано существенное замедление этой реакции у животных, получавших 7 мг А-II в течение первых 4-х ч (табл. 1). Следует обратить внимание, что другая доза А-II—70 мг, вводимого также интрацеребрально, почти не оказывает тормозящего влияния на мурицидное поведение: число убивающих крыс не отличается от таковых в контроле; увеличение латент-

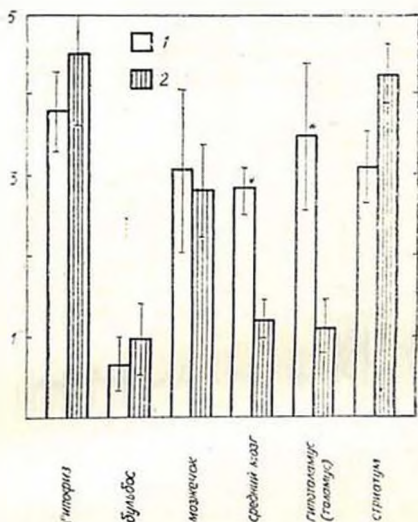


Рис. 1. Активность ангиотензинпревращающего фермента в зонах мозга неагрессивных (1) и агрессивных (2) крыс. Активность фермента в нмоль His-Leu/мин/мг белка. Средние данные для 4—6 определений; достоверность разницы контроль/опыт для $p < 0,05$

ного периода атаки достоверно только для срока 4 ч после введения этой дозы А-II (табл. 1). Торможение агрессивности было обнаружено также и при внутрибрюшинном введении А-II. При этом из серии доз от 1.0 до 10.0 мкг/кг эффективной оказалась лишь последняя доза (табл. 1). Из 13 крыс, получивших 10 мкг А-II, временное исчезновение мурицидности зафиксировано у 3; максимальное увеличение времени латентного периода атаки на жертву приходится на 4-й ч после введения препарата. Через 24 ч этот показатель близок к исходному.

Влияние антисыворотки к А-II на агрессивное поведение. Третья группа исследований была проведена с очищенной антисывороткой к А-II. Были выбраны крысы с нестойким агрессивным поведением, утратившие во время проведения опытов выявленную ранее мурицидность. Эти крысы не обнаруживали признаков агрессивного поведения или

такое было выражено в неполном и замедленном виде (атака без укуса, латентный период более 3-х мин). Из 18 таких крыс 12-и интрацеребрально была введена антисыворотка к А-II. Остальные животные получили физиологический раствор. Через сутки у 7 крыс, получивших антисыворотку, восстановилась агрессивная реакция с характерной быстрой атакой на жертву. В последующие сутки количество крыс с восстановленной мурицидностью увеличилось до 67%, и этот показатель сохранялся в течение 1 месяца периодического тестирования (табл. 2). При этом показатели агрессивной реакции были максимальными. У всех 6 крыс, получивших физиологический раствор, в течение того же срока феномен агрессивного поведения отсутствовал.

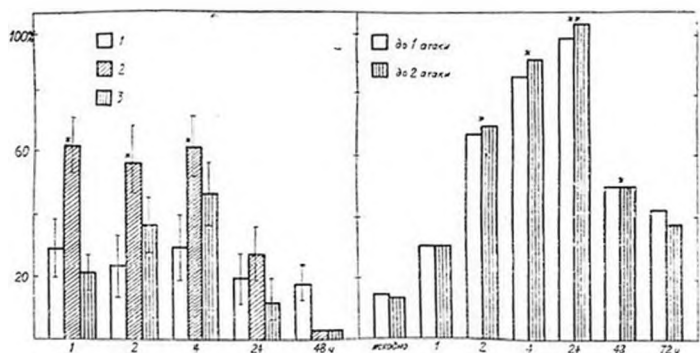


Рис. 2. Торможение агрессивного поведения у мурицидных крыс под влиянием ангиотензина II. По оси абсцисс—время после интрацеребрального введения препарата; по оси ординат—количество животных, утративших мурицидность («процент отказа»). 1—введение физиологического раствора, 2—ангиотензин II, 7 нг, 3—ангиотензин II, 70 нг; *достоверность разницы по отношению к контролю для $p < 0.05$. Средние данные для 19 животных в каждой группе

Рис. 3. Торможение агрессивной реакции под влиянием ангиотензина II у крыс с восстановленной мурицидностью. По оси абсцисс—время после введения ангиотензина II (7 нг, интрацеребрально); по оси ординат—латентный период до атаки на объект (с). Достоверность по «критерию значков» в сравнении с исходным уровнем: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Средние данные для 12 крыс

Наконец, на крысах с восстановленной после введения антисыворотки мурицидностью опыт повторили в обратном порядке: животным интрацеребрально был введен А-II, в дозе 7 нг. Из 8 таких крыс временная потеря мурицидности отмечалась у 5; в группе в целом значительно увеличивался латентный период до первой и второй атаки на жертву (рис. 3). Эти результаты свидетельствуют о тормозящем влиянии А-II на проявления агрессивной реакции у крыс с восстановленной

мурицидностью. Эффект пептида сохранялся в течение 3-х суток—срока, значительно большего, чем в экспериментах, представленных в предыдущей серии (табл. 1).

Таблица 1

Влияние ангиотензина II на агрессивную реакцию мурицидных крыс
(изменение латентного периода до 1 атаки, с)

Вводимые вещества, дозы	Исх.	1 ч	2 ч	4 ч	1 сутки	2 суток
Интрацеребрально Контроль (физиологический раствор) (n=17)	2,05	55,1	62,0	54,3	42,3	30,8
Ангиотензин II, 7 мкг (n=19)	7,9	157,2*	117,3*	123,7*	65,9	38,8
Ангиотензин II, 70 мкг (n=19)	3,1	55,4	70,8	86,3*	39,5	—
Внутрибрюшинно Контроль (физиологический раствор) (n=12)	1,7	1,9	2,0	1,9	10,4**	7,0***
Ангиотензин II, 10 мкг (n=13)	2,7	26,1	34,9	56,4*	27,4**	8,8**

Примечание. * Достоверность разницы ($p < 0,01$) по критерию знаков, вычисленная по отношению к исходному показателю; время после введения препарата—* 6 ч, и *** 1 сутки соответственно

Описанные серии экспериментов показали причастность А-II к реализации агрессивного поведения крыс. Об этом свидетельствует пониженная активность в таламо-гипоталамической зоне и среднем мозгу фермента, генерирующего пептид: тормозящее влияние А-II при интрацеребральной аппликации малых доз: восстановление агрессивного поведения при введении антисыворотки к А-II. Ранее было исследовано влияние ангиотензина и брадикинина на различные формы агрессивного поведения у крыс [9]. Однако, несмотря на большой спектр исследуемых вариантов, отчетливого влияния этих пептидов на агрессивность выявлено не было, вероятно, из-за поздних сроков тестирования. Попытка связать агрессивное поведение мышей с изменениями активности рениновой системы была предпринята Poulsen и соавт. [10, 11]. В этих работах речь идет об увеличении активности ангиотензин-I-генерирующего фермента ренина в крови при отсутствии влияния на уровень артериального давления.

В наших опытах введенный интраперитонеально А-II оказывал тормозящее действие на проявления агрессивности. Эффективные дозы пептида при этом оказывались на три порядка больше, чем при интрацеребральной аппликации. При исследовании нейропептидов остро стоит вопрос о соотношении центральных и периферических звеньев этой регуляторной системы и о возможности проникновения пептида с «периферии» в центральные образования. Ferrario [12] обсуждает возможность достижения субфornикальной области мозга при инфузии А-II в сонную или позвоночную артерию. Этим, возможно, определяется спе-

цифичность регуляторного влияния А-II на секреторную функцию гипофиза, метаболизм минералокортикостероидов или активность адренорецепторов некоторых отделов мозга. Вероятно, пептид может проникать в мозг через перивентрикулярные структуры гипоталамуса, где имеются проходимые участки ГЭБ для молекул подобной величины [13]. Поэтому эффект вводимого интраперитонеально А-II на агрессивность мо-

Таблица 2

Влияние антисыворотки к ангиотензину II на восстановление агрессивного поведения у крыс

Вещество	Животные	Время после инъекции антисыворотки, сутки					
		исх.	1	2	3	18	30
Антисыворотка к ангиотензину II	неагрессивные / агрессивные	12/0	5/7	5/7	4/8	4/8	4/8
Физиологический раствор	неагрессивные / агрессивные	6/0	6/0	6/0	6/0	6/0	6/0

Примечание. Очищенная антисыворотка вводится интрацеребрально в дозе 7 мкг/крысу однократно.

жет быть опосредован через эти пути. Понятно, что доза препарата будет в этом случае во много раз выше той, которая оказывается эффективной при непосредственном введении в желудочки мозга. Поскольку А-II влияет на проявления разнообразных физиологических реакций—увеличение артериального давления, липогенный эффект, высвобождение гормонов, регуляцию эмоционального поведения и др., зависящих от дозы и места образования или введения вещества в мозг, вопрос о региональной специфичности действия нейропептидов имеет особое значение.

В регуляции агрессивного поведения и, в частности, мурицидности принимают участие биохимические системы и тканевые структуры, связанные с метаболизмом серотонина, катехоламинов, ГАМК и др. [14]. Учитывая сопряженность биохимических реакций этих систем с нейропептидами, следует считать, что речь идет о целостной нейрохимической системе регуляции эмоциотропных реакций, в которых А-II принадлежит место своеобразного «индуктора». Вероятно, что эти элементы центральной регуляции сложных поведенческих реакций могут быть объектом специфической коррекции с применением соответствующих факторов и ведущей к активации или торможению процесса в целом.

EFFECT OF ANGIOTENSIN—II AND ANTISERUM TO IT ON THE MODULATION OF THE AGGRESSIVE BEHAVIOR IN MURICIDAL RATS

PANFILOV A. D., GOMAZKOV O. A., KOMISSAROVA N. V.

Institute of Medical Enzymology, USSR Academy of Medical Sciences,
Moscow

The role of angiotensin II in the regulation of aggressive behavior in muricidal (mouse-killing) rats has been studied. The activity of angiotensin-converting enzyme, investigated in 6 regions of the brain, has been found to be 2–3-fold lower in the thalamo-hypothalamic region and in the midbrain of aggressive animals. The muricidal reaction is inhibited by intracerebroventricular and intraperitoneal administration of angiotensin II. A purified antiserum to this peptide potentiates aggressiveness. Probably, the „central“ angiotensin system operates as a trigger in the neurochemical regulation of the emotiotropic behavioral reactions, particularly, muricidae.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ganten D., Lang R., Lehmann E., Unger T. *Biochem. Pharmacol.*, v. 33, p. 3523–3528, 1984.
2. Левшина И. П., Гехт К., Поппай М., Шлезель Г., Кранц Д., Вольмбергтер А. *Журн. высш. нерв. деят-сти*, т. 27, с. 363–367, 1977.
3. Балакова В. И., Ломакина Е. А., Сулакова К. В. *Бюл. эксперим. биол. и мед.* № 10, с. 442–445, 1981.
4. Кольдун М. *Журн. высш. нерв. деят-сти*, т. 35, с. 280–287, 1985.
5. Glowinsky I., Iversen L. L. *J. Neurochem.*, v. 13, p. 655–669, 1966.
6. Fridlund J., Silverstein E. *Amer. J. Clin. Pathol.*, v. 66, p. 416–428, 1976.
7. Афанасьева Г. А., Чипенс Г. Н. *Биохимия*, т. 42, с. 1711–1719, 1977.
8. Гублер Е. В., Генкин А. А. *Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях*, М., Медицина, 1973.
9. Рилова А. А., Шерстнев В. В. *Журн. высш. нерв. деят-сти*, т. 34, с. 904–910, 1984.
10. Pedersen E. B., Poulsen K. *Acta Endocrinol. (Copenh.)*, v. 104, p. 510–512, 1983.
11. Poulsen K., Jacobsen J. *Clin. Exper. Hypert.—Theor. Pract.*, v. A5, p. 969–973, 1983.
12. Ferrurlo C. M. *Hypertension*, v. 5, Suppl. V, p. V73–V79, 1983.
13. Simpson J. B. *Neuroendocrinology*, v. 32, p. 248–252, 1981.
14. Mandel P., Mack G., Kempf E.—In: *Psychopharmacology of aggression* (ed. M. Sandler), p. 95–110, Raven Press, N. Y., 1979.

Поступила 14. II 1987



УДК 577.152.277+577.152.314-611.8

ОЧИСТКА СВЯЗАННОЙ ЩЕЛОЧНОЙ РНКазы ЦИТОЗОЛЯ И
ЕЕ СПЕЦИФИЧЕСКОГО БЕЛКОВОГО ИНГИБИТОРА ИЗ
РАСТВОРИМОЙ ФРАКЦИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

НЕЧАЕВА Г. А.

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

Из растворимой фракции больших полушарий головного мозга крыс фракционированием сульфатом аммония и гель-фильтрацией через сефадекс G-100 выделены специфический белковый ингибитор щелочной РНКазы цитозоля и связанная щелочная РНКазы (эндогенный комплекс ингибитора с РНКазой цитозоля), степень очистки которых составляла около 600 и 900 раз соответственно. Ингибитор РНКазы — кислый белок с M_r около 50 кД. Величина M_r эндогенного комплекса ингибитора с РНКазой цитозоля составляет около 62 кД, что соответствует молярному отношению ингибитора и РНКазы в комплексе 1:1. Свободная щелочная РНКазы в растворимой фракции головного мозга крыс не обнаруживалась. Связанная щелочная РНКазы в присутствии лараклорисхрубензоата (л-ХМБ) интенсивно гидролизвала поли (C), а также полимерную РНК, рРНК и тРНК из мозга и дрожжей, но не расщепляла поли (U), поли (A), поли (G) и ДНК.

РНКазы головного мозга, как и других органов, отличаются локализацией в различных субклеточных фракциях [1, 3, 6]; по оптимуму активности их делят на кислые и щелочные [1—7]. Щелочные РНКазы содержатся в ядерной, микросомной и растворимой клеточных фракциях головного мозга [3, 7]. Щелочная рибонуклеаза растворимой фракции цитозоля головного мозга с оптимумом при pH 7,8 находится в неактивном, латентном состоянии в виде комплексов, образованных с высоколабильным специфическим белковым ингибитором при помощи дисульфидных связей [3—8]. Активность РНКазы цитозоля обнаруживается в присутствии сульфгидрильных реагентов, таких как л-ХМБ, которые инактивируют ингибитор и переводят латентную щелочную РНКазу в активное состояние [1—9]. В растворимой фракции головного мозга большая часть ингибитора находится в свободном, не связанном с РНКазой состоянии [3—5]. Свободный ингибитор из ткани мозга способен тормозить активность РНКазы А из поджелудочной железы быка [3—7, 10]. Ингибитор, активный по отношению к РНКазам типа панкреатической РНКазы А, обнаружен во всех тканях млекопи-

тающих [1, 2], в то время как ингибитор щелочной РНКазы цитозоля печени цыплят с РНКазой А не взаимодействует [2]. Высокая активность свободного ингибитора обнаруживается в тканях, характеризующихся интенсивным синтезом РНК и белков,—в ткани печени [1], плаценты [1, 3], симпатического ганглия [10], головного мозга [1, 3—5]. В коре и подкорковых образованиях больших полушарий головного мозга крыс активность ингибитора примерно одинакова, в мозжечке и стволовой части головного мозга—в 2,5 и 2 раза больше, чем в больших полушариях [11]. Выработка условного оборонительного рефлекса у крыс сопровождается увеличением активности белкового ингибитора щелочной РНКазы цитозоля в гиппокампе и коре больших полушарий головного мозга [9]. По-видимому, лабильная система—щелочная РНКазы цитозоля и ее специфический белковый ингибитор, в отличие от панкреатической РНКазы, участвуют не только в деградации, но и в процессах перестройки цитоплазматических РНК и регуляции биосинтеза белков [1, 2]. Показано, что ингибитор защищает информационную РНК от расщепления РНКазой при выделении полисом [12], а также в процессе синтеза белка *in vitro*, вызывая увеличение выхода синтезируемого белка [13]. Белковый ингибитор щелочной РНКазы цитозоля выделен из головного мозга свиньи [8] и быка [5], величина M_r очищенных препаратов была равна 60 и 51 кД соответственно. Методов, позволяющих осуществить выделение свободного ингибитора и его эндогенных комплексов с щелочной РНКазой цитозоля из одной растворимой фракции в литературе мы не встретили.

В настоящей работе разработаны условия выделения очищенных препаратов белкового ингибитора и его эндогенных комплексов с щелочной РНКазой цитозоля из растворимой фракции больших полушарий головного мозга крыс. Изучение свойств и условий взаимодействия ингибитора с различными РНКазами может способствовать выяснению механизмов регуляции метаболизма РНК и белков в ткани мозга при различных функциональных состояниях ЦНС.

Материалы и методы

В работе были использованы крысы-самцы линии *Wistar* массой 180—200 г. Животных декапитировали в холодной комнате, и все последующие операции проводили на холоду. Большие полушария головного мозга (20—40 животных) гомогенизировали в 0,32 М растворе сахарозы (1:10) с 0,001 М ЭДТА, 0,01 М трис-НСl буфером рН 7,3. Гомогенат подвергали дифференциальному центрифугированию, выделяя ядерную фракцию (1100 г, 10 мин), затем лизосомно-митохондриальную фракцию и микросомы (12000 г, 1 ч или 100000 г, 30 мин). Полученную после этого растворимую фракцию использовали для выделения ингибитора и его комплексов с РНКазой цитозоля.

Гель-фильтрацию сульфатно-аммониевых препаратов белков растворимой фракции проводили на колонке (2,2×86 см) сефадекса G-100.

определение величины M_r (повторную гель-фильтрацию) ингибитора и его комплексов—на колонке сефадекса G-100 ($1,8 \times 84$ см). Обе колонки уравнивали и элюировали 0,02 М трис-HCl буфером pH 7,5 с 0,001 М ЭДТА, 0,005 М дитиотрептолом (ДТТ), 0,15 М NaCl и 15%-ным глицерином (буфер А). В работе использовали сефадекс G-100 («Pharmacia» Швеция).

Активность связанной щелочной РНКазы определяли модифицированным спектрофотометрическим методом [4], добавляя к 0,2 мл растворимой фракции или элюата 0,2 мл раствора л-ХМБ ($1 \cdot 10^{-4}$ М), который инактивирует ингибитор и переводит связанную РНКазу в активное состояние. Опытные и контрольные (определение без фермента) пробы инкубировали в 0,08 М трис-HCl буфере pH 7,8 с 0,1%-ной дрожжевой РНК при 37° в течение 30 мин. Затем пробы охлаждали и осаждали 0,5%-ным уксуснокислым лантаном в 76%-ном этаноле с 1 н. HCl (1 мл) и через 30 мин центрифугировали 15 мин при 1200 g. В надосадочной жидкости определяли поглощение при 260 нм кислоторастворимых продуктов гидролиза РНК. Активность РНКазы выражали в ΔA_{260} на 1 мг белка, определяемого по методу Lowry и соавт. [14]. Величина активности связанной РНКазы позволяет судить о содержании неактивных эндогенных комплексов белкового ингибитора с РНКазой цитозоля.

Для определения активности свободного ингибитора к 0,1 мл надосадочной жидкости, а в контрольных пробах к 0,1 мл 0,32 М сахарозы, pH 7,3 добавляли 0,1 мл раствора панкреатической РНКазы А (0,02 мкг) в 0,1%-ном желатине, а через 15 мин—раствор РНК (0,3%) в 0,08 М трис-HCl буфере, pH 7,8. Контрольные и опытные пробы инкубировали при 37° в течение 15 мин. Дальнейшее определение активности РНКазы проводили по ранее описанному методу [4]. По степени торможения активности РНКазы А (определение с ингибитором и без него) судили об активности ингибитора, которую выражали в % торможения активности 0,02 мкг РНКазы А и в усл. ед. За усл. ед. активности белкового ингибитора принимали такое его количество, которое вызывало торможение на 50% активности 0,01 мкг РНКазы А из поджелудочной железы быка в принятых нами стандартных условиях определения. В работе использована рРНК и тРНК дрожжей (Новосибирский ИОХ) и синтетические полинуклеотиды («Serva», ФРГ и «Reanal», Венгрия). Коммерческие препараты дрожжевой РНК депротенизировали с помощью фенола и выделяли из них полимерную РНК [15]. Из мозга рРНК и тРНК выделяли фенольным методом [15, 16].

Результаты и обсуждение

Белки растворимой фракции осаждали сульфатом аммония. Полученный осадок между 30 и 80% насыщения $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (в предварительных опытах было установлено, что при таком осаждении ингибитор и латентная РНКазы почти полностью переходили в осадок) раст-

воряли в минимальном объеме буфера А, подвергали анализу (2 ч) против этого буфера и наносили на колонку с сефадексом G-100. Собирали и подвергали анализу 55 фракций по 4 мл. На рис. 1 представлены типичные профили элюции белков, свободного ингибитора и латентной РНКазы при гель-фильтрации сульфатно-аммониевых препаратов белков растворимой фракции больших полушарий головного мозга крыс.

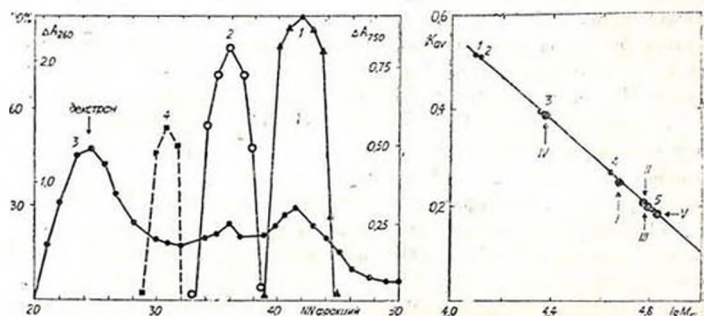


Рис. 1. Гель-фильтрация на колонке с сефадексом G-100 (2,2×86 см) сульфатно-аммониевых препаратов белков растворимой фракции больших полушарий головного мозга крыс. Скорость элюции 16 мл/ч. Объем проб 4 мл. 1—активность ингибитора в % торможения 0,02 мкг панкреатической РНКазы А; 2—эндогенные комплексы ингибитора со щелочной РНКазой цитозоля (связанная щелочная РНКаза)— ΔA_{260} ; 3—белок ΔA_{750} ; 4—кислая РНКаза— ΔA_{260} .

Рис. 2. Определение величин M_r свободного белкового ингибитора щелочной РНКазы (I) и эндогенных комплексов ингибитора с РНКазой цитозоля (II), комплекса ингибитора с панкреатической РНКазой А (III), свободной щелочной РНКазой цитозоля (IV) и кислой РНКазой (V) гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-100 (1,8×84 см). Скорость элюции 16 мл/ч. Маркерные белки: 1—цитохром С, 2—РНКаза А из поджелудочной железы быка, 3—химотрипсиноген, 4—яичный альбумин, 5—альбумин сыворотки быка. По оси абсцисс—логарифм M_r . По оси ординат — $K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_i - V_0}$, где V_0 —объем выхода декстрана голубого,

V_e —объем выхода каждого белка, V_i —общий объем колонки.

Из представленных данных видно, что объем выхода с колонки пика основной массы белков (фракция 25, объем 100 мл) совпадал с объемом выхода декстрана голубого (M_r 300 кД). Связанная РНКаза (эндогенные комплексы ингибитора с РНКазой цитозоля) элюировалась во фракциях 34—38 с максимальной активностью во фракции 36 (объем 144 мл), свободный ингибитор во фракциях 40—44. Объем элюата с максимальной активностью ингибитора составлял 168 мл (фракция 42). Во фракциях 30—32 элюировалась кислая РНКаза с оптимумом активности при pH 5,8—6,0 и M_r 68 кД (рис. 2). Кислая РНКаза локализуется в лизосомах [3], некоторое количество этого фермента переходит в растворимую фракцию. Фракции, обладающие

максимальной активностью ингибитора, и фракции, содержащие связанную РНКазу, объединяли и осаждали сульфатом аммония до 90% насыщения. После центрифугирования (12000 g, 40 мин) каждый осадок растворяли в минимальном объеме буфера А и после диализа против буфера А наносили поочередно на колонку с сефадексом G-100 (1,8×84 см). Для определения величины M_r ингибитора и связанной РНКазы гель-фильтрацией [17] колонку калибровали с помощью стандартных белков (рис. 2). Величина M_r свободного ингибитора по результатам 5 опытов составила $50 \pm 0,5$ кД, а эндогенного комплекса ингибитора с РНКазой цитозоля— $62 \pm 0,6$ кД, оказавшаяся близкой к величине M_r комплекса ингибитора из растворимой фракции головного мозга с панкреатической РНКазой А ($63 \pm 0,55$ кД). Комплекс получали добавлением РНКазы А (3 мг) к элюату (стадия 3), содержащему свободный ингибитор. Необходимо отметить, что при повторной гель-фильтрации через сефадекс G-100 эндогенный комплекс ингибитора с РНКазой частично диссоциировал. В элюате обнаруживалась как связанная щелочная РНКазы (90% активности) с величиной M_r 62 кД, так и свободная щелочная РНКазы (10% активности) с M_r 26 кД (рис. 2). Оптимум ферментативной активности связанной и свободной фракций щелочной РНКазы цитозоля головного мозга крыс, как и щелочных (нейтральных) РНКаз цитозоля из других тканей [10], при определении в трис-HCl буфере соответствовал pH 7,5—7,8.

Таблица 1

Влияние связанной щелочной РНКазы на РНК (1 мг/мл) из мозга и дрожжей и на синтетические полинуклеотиды (0,5 мг/мл). Активность РНКазы в ΔA_{260} на 1 мкг белка ($n=5$)

Субстрат	Длительность инкубации в мин	
	30	40
Поли (С)	$20,82 \pm 2,15$	$26,9 \pm 2,01$
Поли (U)	0	0
Поли (A)	0	0
Поли (G)	0	0
ДНК	0	0
РНК из мозга		
pРНК	$0,79 \pm 0,07$	$1,05 \pm 0,12$
rРНК	$0,68 \pm 0,04$	$0,98 \pm 0,08$
РНК из дрожжей		
Полимерная РНК	$1,45 \pm 0,12$	$2,11 \pm 0,16$
pРНК	$0,82 \pm 0,08$	$1,02 \pm 0,08$
rРНК	$0,75 \pm 0,06$	$0,95 \pm 0,06$

Результаты определения субстратной специфичности очищенных препаратов связанной щелочной РНКазы представлены в табл. 1. Очищенные препараты латентной РНКазы цитозоля в присутствии $1 \cdot 10^{-1}$ М л-ХМБ интенсивно гидролизуют полимерную РНК из дрожжей и поли (С), но не проявляли активности по отношению к поли (U),

поли (А), поли (G) и ДНК. Наибольшую активность связанной РНКазы наблюдали при действии на поли (С) и полимерную дрожжевую РНК: рРНК и тРНК из мозга и дрожжей расщеплялись РНКазой примерно с одинаковой скоростью.

К настоящему времени получены в очищенном состоянии щелочные РНКазы из гомогенатов мозга [18, 19] и других органов [20]. В отдельных работах щелочную РНКазу выделяли из растворимой фракции головного мозга [6, 15, 21]. Щелочную РНКазу из животных тканей обычно экстрагируют 0,25—0,1 н. H_2SO_4 или HCl [20, 21]. После экстракции 0,1 н. HCl из растворимой фракции головного мозга крыс выделена щелочная РНКаз с оптимумом рН 7,8 и M_r 13 кД [21], близкой к M_r панкреатической РНКазы А (13,5 кД). При выделении щелочной РНКазы из растворимой фракции головного мозга быка без экстракции кислотой получена щелочная РНКаз с M_r 25 кД [6].

Таблица 2

Выделение белкового ингибитора щелочной (I) и связанной (II) РНКазы цитозоля из растворимой фракции головного мозга крыс

Стадия выделения	Общий белок в мг	Общая активность		Удельная активность		Степень очистки		Выход в %	
		I (усл. ед.)	II (ΔA_{260})	I (усл. ед./мг белка)	II (A_{260} / мг белка)	I	II	I	II
Растворимая фракция	580	5600	754	9,7	1,3			100	100
Высаливание от 30 до 80 % насыщения $(NH_4)_2SO_4$	92	4800	690	52,1	7,5	5,2	5,8	85	91
После гель-фильтрации через сефадекс G-100	I 1 II 2,2 1,8	3600	500	1636	277	158	213	64	66
После повторной гель-фильтрации через сефадекс G-100	0,24 0,15	1620	180	6750	1200	675	923	29	23

Свойства этого фермента отличались от свойств панкреатической РНКазы А. По-видимому, величина M_r щелочной РНКазы цитозоля мозга, как и щелочных РНКаз других тканей [22], в 2 раза превышает величину M_r РНКазы А. Так, РНКазы спермы быка представляет собой димер субъединиц, гомологичных РНКазе А, способный частично диссоциировать на мономеры [22]. В наших опытах при повторной гель-фильтрации эндогенного комплекса ингибитора с РНКазой обнаруживали свободную щелочную РНКазу с $M_r \sim 26$ кД, что соответствует димерной форме РНКазы. Однако эндогенные комплексы ингибитора с РНКазой цитозоля, как и комплексы ингибитора, полученные с РНКазой А, имели M_r 62 кД. Это соответствует отношению ингибитора и мономерной формы РНКазы цитозоля 1:1, так

как молекулярная масса ингибитора из мозга крысы, как и из мозга быка [5] около 50 кД, а из мозга свиньи [8] 60 кД.

В пяти опытах препарат свободного ингибитора после гель-фильтрации через сефадекс G-100 (стадия 3) в 0,02 М трис-HCl буфере pH 7,4 с 0,001 М ЭДТА, 0,005 М ДТТ (буфер Б) наносили на колонку (1,2×10 см) ДЭАЭ-сефадекса А-50. Колонку промывали затем 50 мл буфера Б. Свободный ингибитор сорбировался на ионообменнике. Ингибитор элюировали 30 мл 0,1 М ацетатного буфера pH 5,5 с 1 М NaCl, 0,001 М ЭДТА, 0,005 М ДТТ и 15%-ным глицерином. Объем элюата с максимальной активностью ингибитора составлял 15 мл. Результаты этих опытов позволяют заключить, что ингибитор из мозга крысы, как и ингибитор из мозга быка [5], свиньи [8] и других органов [13] является кислым белком.

Описанный метод, последовательные стадии которого суммированы в табл. 2, позволяет получить из растворимой фракции головного мозга крыс препарат связанной щелочной РНКазы цитозоля и препарат свободного белкового ингибитора этой РНКазы с выходом около 25% и степенью очистки 900 и 600 раз соответственно. Предложенный метод полностью отличается от описанных в литературе методов очистки свободного белкового ингибитора из головного мозга свиньи [8] и быка [5] и позволяет выделить из одной и той же надосадочной жидкости не только свободный ингибитор, но и его комплексы с РНКазой цитозоля, ранее не исследованные.

ISOLATION OF LATENT ALKALINE CYTOSOLIC RNAase AND ITS SPECIFIC PROTEIN INHIBITOR FROM RAT BRAIN SOLUBLE FRACTION

NECHAEVA G. A.

I. P. Pavlov Institute of Physiology, Leningrad

Using ammonium sulfate fractionation and gel-filtration on Sephadex G-100 a specific protein inhibitor of alkaline cytosolic RNAase and complex of this inhibitor with alkaline RNAase have been purified from rat brain big hemispheres soluble fraction with the yield of 600 and 900 respectively. RNAase inhibitor is acid protein with M_r of 50 kD the M_r of its complex with cytosolic RNAase is approx 62 kD that makes the molar ratio of components equal to 1:1. Free alkaline RNAase is not detected in brain soluble fraction; in the presence of pCMB the bound alkaline RNAase rapidly hydrolyses poly (C), polymeric RNA, sRNA, tRNA from brain and yeast, but does not cleave poly (U), poly (A), poly (G) and DNA.

ЛИТЕРАТУРА

1. Roth J. S. Biochim. et biophys. acta, v. 61, № 6, p. 903—915, 1962.
2. Kraft N., Shortman K. Austr. J. Biol. Sciences, v. 23, № 1, p. 175—184, 1970.
3. Нечасова Г. А. Труды IV Всесоюзн. конф. по биохимии нервной системы, Тарту, с. 323—332, 1966.
4. Нечасова Г. А. Укр. биохим. журн., т. 44, № 2, с. 178—181, 1972.
5. Burton L. E., Blackburn P., Moore S. Int. J. Peptide Proteine Res., v. 16, p. 359—364, 1980.
6. Okazaki H., Ittel M. E., Niedergang C., Mandel P. Biochim. et biophys. acta., v. 391, № 1, p. 84—95, 1975.
7. Okazaki H., Mandel P. J. Neurochem., v. 25, № 2, p. 171—176, 1975.
8. Takahashi Y., Mase K., Suzuki J. Experimentia, v. 23, № 7, p. 525—526, 1967.
9. Нечасова Г. А., Лопатина Н. Г. Тезисы докл. Всесоюз. симп. «Нейрохимические механизмы регуляции памяти». Пуццано, с. 10, 1984.
10. Bates D. J., Good R. T., Austin L. Neurochem. Res., v. 10, № 5, p. 713—727, 1985.
11. Нечасова Г. А. Всесоюз. биохим. съезд, тезисы научн. сообщ., 7 секция, Ташкент, с. 18—19, 1969.
12. Takahashi Y., Mase K., Sugano H. Biochim. et biophys. acta, v. 119, № 3, p. 627—629, 1966.
13. Scheele G., Blackburn P. Proc Nat. Acad. Sci. USA. Biol. Sci., v. 76, p. 4898—4902, 1979.
14. Lowry O. H., Rosebrough N. I., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., v. 193, № 1, p. 435—445, 1951.
15. Аксенова А. Н., Нечасова Г. А. Биохимия, т. 36, № 3, с. 507—512, 1971.
16. Георгиева Г. П. Биохимия, т. 24, № 3, с. 472—480, 1959.
17. Laurent T. C., Killander J. J. Chromatogr., v. 14, p. 317—330, 1964.
18. Elson M. S., Glitz D. G. Biochemistry, v. 14, № 7, p. 1471—1476, 1975.
19. Иванов В. А., Третьяк Т. М., Смирнова Г. Н. Биохимия, т. 43, № 2, с. 287—292, 1977.
20. Gordon J. Arch. Biochem. and Biophys., v. 112, № 3, p. 421—430, 1965.
21. Шелестина Е. П. Биохимия, т. 41, № 7, с. 1313—1318, 1975.
22. D'Alessio G., Malorni M. C., Parente A. Biochemistry, v. 14, p. 1116—1122, 1975.

Поступила 1. III 1987

ФЕРМЕНТЫ БИОСИНТЕЗА ПРОЛИНА И РЕГУЛЯЦИЯ
ИХ АКТИВНОСТИ В МОЗГУ КРЫС

*МАНУКЯН И. П., АГАДЖАНИЯН А. Х., *АРУТЮНЯН А. В.

*Институт биохимии АН АрмССР, Ереван; проблемная лаборатория сравнительной
и эволюционной биохимии ЕГУ

Изучены ферменты биосинтеза пролина (орнитинтрансминаза—ОТА и пирроли-5-карбоксилатредуктаза—П-5-КР) в мозгу крыс, локализованные как в растворимой фракции, так и в осадке, полученном при центрифугировании гомогената. Установлено, что наряду с α -кетоглутаратом (α -КГ), трансаминирование орнитина в мозгу крыс протекает также с пируватом и оксалоацетатом.

АТР, аспарат, аспарагин и аланин являются эффективными ингибиторами ОТА и П-5-КР, причем действие АТР проявляется наиболее отчетливо, если в качестве кофактора П-5-КР используется NADH, а не NADPH.

Во многих органах млекопитающих пролин, в основном, синтезируется из глутамата и орнитина, а также может поступать с кровью в готовом виде. В частности, клетки ЦНС могут обеспечиваться пролином крови [1].

Синтез и катаболизм пролина в мозгу изучены весьма недостаточно. Активность П-5-КР высока в мозгу эмбриона по сравнению с таковой зрелых крыс, а пролиноксидазная активность, наоборот, выше у зрелых животных [2]. Таким образом, в мозгу зрелых крыс деградация пролина происходит с большей скоростью, чем синтез, а в мозгу плода, наоборот, превалирует синтез пролина.

Jonson, Roberts [3] исследовали транспорт аргинина в синапсомы мозга крыс и установили превращение последнего в орнитин и далее в глутамат, ГАМК и пролин. Концентрация указанных веществ может изменяться как под влиянием ингибирования их синтеза по принципу обратной связи, так и в зависимости от уровня содержания кофакторов.

Давтян и соавт. [4] изучили биосинтез пролина из орнитина, аргинина, цитруллина и глутамата в мозгу эмбрионов, беременных и лактирующих крыс. Показано, что у беременных и лактирующих крыс, наряду с орнитином, биосинтез пролина протекает также из цитруллина, а у эмбрионов—из всех указанных субстратов. Очевидно, цитруллин пред-

варительно превращается в аргинин соответствующими ферментами мозга крыс с дальнейшим образованием пролина.

Цель настоящей работы—изучить некоторые стороны обмена пролина и регуляции активности ферментов, участвующих в этом процессе в мозгу крыс.

Материалы и методы

Объектом исследования служили белые крысы линии *Wistar* массой 150—180 г. Для определения ферментативной активности использовали 20%-ный гомогенат мозга в 0.1 М калий-фосфатном буфере (рН 7.4). Инкубационная смесь (3 мл) содержала 50 мкмоль орнитина, 20 мкмоль α -кетоглутарата (или других кетокислот), 100 мкмоль калий-фосфатного буфера (рН 7.4), пиридоксаль-5-фосфата—1 мкмоль и 0.5 мл 5%-ного гомогената. Инкубацию проводили при 37° в течение 60 мин. За это время орнитин инкубационной среды под действием ОТА превращается в L- Δ^1 -пирролин-5-карбоксилат (П-5-К). Затем в среду добавляли 4 мкмоль NADH, 0.5 мл свежего гомогената и смесь инкубировали еще 15 мин. Под действием П-5-КР, присутствующей в гомогенате, П-5-К превращается в пролин. Реакцию останавливали 20%-ной ТХУ (для определения активности ферментов биосинтеза пролина и содержания пролина) и 96%-ным холодным этиловым спиртом (для хроматографического определения пролина). Пробы центрифугировали при 8000 об/мин в течение 10 мин и в надосадочной жидкости определяли пролин. Активность ферментов биосинтеза пролина (ОТА и П-5-КР) выражали в мкмоль образовавшегося пролина на 1 г свежей ткани за 60 мин.

Пролин и оксипролин определяли хроматографическим методом [5].

Результаты и обсуждение

На начальном этапе изучения процесса биосинтеза пролина тканью мозга нами было исследовано содержание в ней пролина и оксипролина. Согласно полученным результатам, свободный эндогенный пролин в мозгу крыс накапливается весьма незначительно (0.06 мкмоль/г ткани), а оксипролин вовсе не обнаруживается, что соответствует данным других авторов [6, 7]. Проведенные нами исследования показали, что процесс биосинтеза пролина из глутамата в гомогенатах мозга крыс протекает весьма слабо (образуется 0.072 мкмоль пролина/г ткани/ч), причем лишь в присутствии NADH. По-видимому, в мозгу крыс глутамат превращается в полуальдегид глутаминовой кислоты не путем образования глутамилфосфата [10], а под воздействием П-5-КР, кофактором которой служит восстановленный NAD. Аналогичные данные были получены ранее в отношении печени птиц [8] и в экстрактах жуков фасолевой зерновки [9].

В специальной серии экспериментов нами был изучен биосинтез пролина из орнитина. При подборе оптимальных условий для протека-

ния этого процесса было исследовано влияние различных концентраций орнитина (10—100 мкмоль) и некоторых буферов (K^+ -фосфатный, трис- HCl и др.), на активность ОТА и П-5-КР в мозгу крыс. Было обнаружено, что наиболее интенсивно процесс биосинтеза пролина протекает при концентрации орнитина 50 мкМ и инкубации в 0,1 М K^+ -фосфатном буфере, рН 7,4 в течение 60 мин.

Таблица 1

Биосинтез пролина (в мкмоль/г ткани/ч) из орнитина в мозгу крыс в присутствии различных кетокислот и кофакторов (n=5)

Субстраты	Кофакторы	Гомогенат	Надосадоочная жидкость	Осадок
α -кетоглутарат	NADH	7,98 $\pm$ 1,12	2,33 $\pm$ 0,31	5,69 $\pm$ 0,85
Пируват	NADH	4,89 $\pm$ 0,42	2,63 $\pm$ 0,42	2,70 $\pm$ 0,55
Оксалоацетат	NADH	1,51 $\pm$ 0,09	0,35 $\pm$ 0,03	0,60 $\pm$ 0,04
α -кетоглутарат	NADPH	7,03 $\pm$ 1,02	2,02 $\pm$ 0,33	5,70 $\pm$ 1,02

Исследовано влияние различных кетокислот (α -КГ, оксалоацетат, пируват) и кофакторов (NADH и NADPH) на биосинтез пролина из орнитина в надосадоочной жидкости и осадке, полученном при центрифугировании при 27000 g гомогената мозга. Показано, что трансаминирование орнитина наиболее интенсивно протекает с α -КГ, несколько слабее с пируватом и гораздо хуже с оксалоацетатом (табл. 1). Как видно из приведенных данных, NADPH в качестве кофактора П-5-КР в мозгу несколько уступает NADH по эффективности. Между тем во многих органах установлено преимущество NADH в указанной реакции [11, 12].

Наблюдаемый нами заметный синтез пролина из орнитина в присутствии пирувата наводит на мысль о наличии в мозгу, помимо трансаминазы орнитина с α -КГ, трансаминазы с пируватом. Об этом свидетельствует также тот факт, что, если этот процесс в присутствии α -КГ проявляется, в основном, в осадке, то в присутствии пирувата протекает с одинаковой интенсивностью как в надосадоочной жидкости, так и в осадке. В полном соответствии с этими данными находятся результаты серии экспериментов по изучению интенсивности процесса биосинтеза пролина из орнитина в гомогенате мозга при совместном присутствии α -КГ и пирувата в различных количественных соотношениях (табл. 2). Оказалось, что пролин синтезируется из орнитина и α -КГ, взятом в отдельности, слабее, чем в опытах, в которых использовалась смесь эквимольных количеств α -КГ и пирувата.

В следующей серии экспериментов было изучено влияние АТР, АДР и АМР на активность ОТА и П-5-КР мозга крыс. Полученные данные (рис. 1, 2) выявили, что АТР оказывает ингибирующее влияние на активность обоих ферментов, тогда как АДР и АМР ингибируют лишь активность П-5-КР. Активность же ОТА в этих условиях, напротив, несколько повышается, особенно в присутствии низких кон-

центраций адениннуклеотидов ($5 \cdot 10^{-5}$ М). Характерно, что ингибирующий эффект АТР на процесс биосинтеза пролина значительно более выражен, если в качестве кофактора П-5-КР используется NADH, а не NADPH.

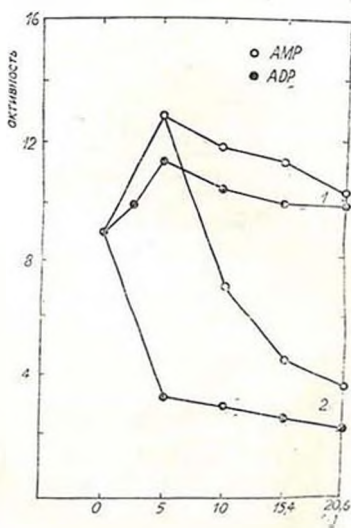
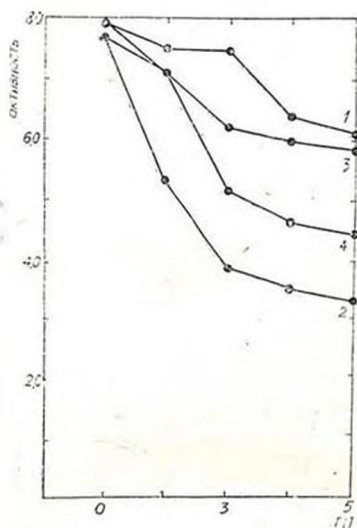


Рис. 1. Влияние АТР на биосинтез пролина (мкмоль/г ткани/ч) в мозгу крыс: 1—ОТА, кофактор П-5-КР NADPH; 2—ОТА, кофактор П-5-КР NADH; 3—П-5-КР, кофактор NADPH; 4—П-5-КР, кофактор NADH. По оси абсцисс—концентрация ингибитора, 10^{-4} М

Рис. 2. Влияние АМР и АДР на биосинтез пролина (в мкмоль/г ткани/ч) в мозгу крыс: 1—ОТА; 2—П-5-КР. В качестве кофактора использовали NADH. По оси абсцисс—концентрация ингибитора, 10^{-5} М

По литературным данным, АТР практически не влияет на NADPH-зависимую активность П-5-КР в сетчатке [13], а у *E. coli* обнаружено подавление этого процесса лишь при высоких концентрациях АТР [14].

В литературе имеются данные по ингибированию процесса биосинтеза пролина у *E. coli* аспаратом, глицином, серином и аланином [14]. В связи с этим мы изучали влияние указанных аминокислот, а также аспарагина на процесс биосинтеза пролина мозга крыс (рис. 3, а, б).

Полученные данные показывают, что в сравнительно высоких концентрациях ($13,5\text{--}26,5 \cdot 10^3$ М) аспарагин, аспарат и аланин значительно подавляют активность ОТА и П-5-КР. Следует отметить, что ингибирующее влияние аспарагина проявляется даже при более низких концентрациях ($2,7 \cdot 10^{-3}$ М). Аспарат в низких концентрациях никакого

влияния на активность обоих ферментов не оказывает. Начиная с $13,5 \cdot 10^{-3}$ М концентрации наблюдается ингибирование активности обоих ферментов, участвующих в процессе биосинтеза пролина. Примечательно, что по сравнению с L-аланином, β -аланин вызывает довольно слабое ингибирование активности как ОТА, так и П-5-КР в мозгу

Таблица 2

Биосинтез пролина (в мкмоль/г ткани/ч) из орнитина в гомогенате мозга крыс при различных соотношениях α -кетоглутарата и пирувата (n=6)

С у б с т р а т ы			Пролин
орнитин (мкМ)	α -кетоглутарат (мкМ)	пируват (мкМ)	
50	50	—	$6,42 \pm 0,72$
50	25	25	$7,47 \pm 0,84$
50	50	50	$13,10 \pm 1,09$
50	100	—	$5,37 \pm 0,23$

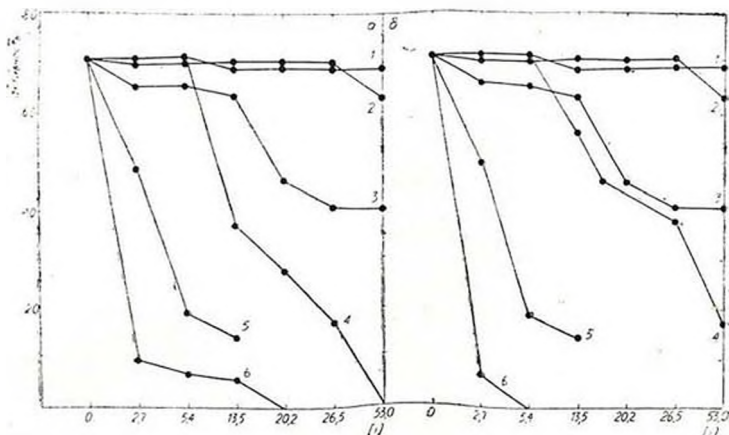


Рис. 3. Влияние некоторых аминокислот на активность ОТА (а) и П-5-КР (б) (мкмоль П-5-К/г ткани/ч) в мозгу крыс: 1—глицин, 2—серин, 3— β -аланин, 4—аспартат, 5—аланин, 6—аспарагин. По оси абсцисс—концентрация аминокислот, 10^{-3} М

крыс. Серин и глицин ни в одной из испытанных концентраций не действуют на процесс биосинтеза пролина в мозгу.

Ингибирование аспартатом и аланином процесса биосинтеза пролина, по-видимому, объясняется интенсивным функционированием в мозгу крыс аспартат- и аланинаминотрансфераз, с которыми орнитинаминотрансфераза не в состоянии конкурировать за α -КГ.

ENZYMES OF PROLINE BIOSYNTHESIS AND REGULATION OF THEIR ACTIVITY IN RAT BRAIN

MANUKYAN I. P., AGADJANYAN A. Kh., *AROUTYUNYAN A. V.

*Institute of Biochemistry, Arm. SSR Acad. Sci., Yerevan
Research Lab. of Comparative and Evolutionary Biochemistry,
Yerevan State University

Activity of ornithine transaminase (OTA) and pyrroline-5-carboxylate reductase (PCR)—the enzymes of proline biosynthesis that are localized both in soluble fraction and in the pellet—has been studied. Transamination of ornithine in rat brain takes place not only with α -ketoglutarate, but with pyruvate and oxaloacetate as well. ATP, aspartate, asparagine and alanine are potent inhibitors of OTA and PCR; the inhibitory effect of ATP is more pronounced if NADPH is used as a coenzyme of PCR instead of NADH.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lodato R. E., Smith R. J., Valle D., Phang J. M., Aocki T. T. *Metabolism*, v. 30, № 9, p. 908–913, 1981.
2. Kowaloff E. M., Granger A. S., Phang J. M. *Metabolism*, v. 15, № 10, p. 1087–1094, 1976.
3. Jonson I. Z., Roberts E. J. *Neurochem.*, v. 42, № 4, p. 1123–1126, 1984.
4. Арутюнян А. М., Агаджанян А. Х., Давтян М. А. *Биол. журн. Армении*, т. 36, № 2, с. 110–114, 1983.
5. Hrabetova E., Tuly L. J. *J. Chromatogr.*, v. 3, № 2, p. 199–201, 1960.
6. Blumenkrantz M. *Clin. Biochem.*, v. 13, № 4, p. 177–183, 1980.
7. Herzfeld A., Mere V. A., Knox E. *Biochem. J.*, v. 166, № 1, p. 95–103, 1977.
8. Давтян М. А., Агаджанян А. Х., Гукасян Дж. Г. *Биол. журн. Армении*, т. 37, № 6, с. 467–471, 1984.
9. Shen T. E., Bird H. R., Sunde M. Z. *Poultry Science*, v. 52, p. 676–682, 1973.
10. Baich A. *Biochim. et biophys. acta*, v. 192, № 3, p. 462–467, 1969.
11. Агаджанян А. Х., Давтян М. А. *Биол. журн. Армении*, т. 27, № 5, с. 19–23, 1974.
12. Miller P. M., Stewart C. R. *Phytochemistry*, v. 15, № 12, p. 1855–1857, 1976.
13. Matsuzawa T. *Biochim. et biophys. acta*, v. 717, № 2, p. 215–219, 1982.
14. Hayzen D. J., Moses V. *Biochem. J.*, v. 173, № 1, p. 207–217, 1978.

Поступила 28. VII 1986



УДК 612. 44. 312

СИНТЕЗ ДНК В НЕОКОРТЕКСЕ РАЗВИВАЮЩИХСЯ КРЫС

ИВАНОВ В. А.

Институт биологической физики АН СССР, Пущино

Исследовали синтез ДНК в неокортексе новорожденных, 14-суточных и 60-суточных крыс, используя *in vitro* изолированные срезы и определяя включение меченого предшественника в ДНК. Суммарный синтез ДНК в тотальных клетках неокортекса резко падает в первые 2 недели постнатального развития, затем постепенно уменьшается. Синтез ДНК в этих же клетках в присутствии оксимочевинки характеризуется низким уровнем, но в клетках 60-суточных крыс его величина на 70% выше, чем в таких же клетках новорожденных животных. Синтез ДНК в нейронах всех исследованных возрастных групп крыс в присутствии оксимочевинки не изменяется. Обсуждаются особенности синтеза ДНК в клетках неокортекса.

Уровень синтеза ДНК в коре головного мозга в постнатальный период онтогенеза строго зависит от вида и возраста животных и обусловлен, в основном, двумя биологическими процессами: репликацией и репарацией ДНК [1, 2]. В первые недели после рождения крыс в неокортексе происходит интенсивное деление и формирование популяций глимальных клеток—астроцитов и олигодендроцитов, что сопровождается активным репликативным синтезом ДНК. В этот период при использовании различных экспериментальных моделей наблюдается высокий уровень включения меченого предшественника в ДНК клеток мозга [3—5]. В то же время сохранение функциональной целостности генома обеспечивает репаративный синтез ДНК [6]. Этот процесс, очевидно, имеет особое значение для нейронов неокортекса, которые не способны к редупликативному синтезу ядерной ДНК, связанному с делением клетки, после рождения животного [7]. Более того, репарация ДНК, по-видимому, функционально вписана в сложный механизм ДНК-координации клеточных процессов и может принимать участие в обеспечении высших функций головного мозга [8, 9].

Немногочисленные данные о синтезе ДНК в клетках головного мозга получены большей частью в экспериментах *in vivo* [3, 5]. Однако использование такой экспериментальной модели затрудняет определение природы синтеза ДНК и делает безуспешным и неадекватным изучение влияния биологически активных веществ—модификаторов этого

процесса. Указанные трудности могут быть преодолены благодаря применению метода переживающих срезов [10].

Недавно был обнаружен репаративный синтез ДНК *in vivo* в неокортексе после γ -облучения крыс и найдены некоторые, по-видимому, тканеспецифические особенности этого процесса [11]. В данной работе представлены результаты исследований синтеза ДНК в клетках неокортекса *in vitro*, которые получены при использовании метода переживающих срезов.

Материалы и методы

Использовали крыс-самцов линии *Wistar* трех возрастных групп: новорожденных, 14- и 60-суточных. Срезы неокортекса толщиной 0,2—0,3 мм препарировали и инкубировали по стандартной методике [12]. Для одного определения 0,5 г (новорожденные), 1,0 г (14-суточные) или 7—8 г (60-суточные животные) ткани неокортекса, приготовленной в виде срезов, делили на две порции и преникубировали 20 мин в бикарбонатном (рН 7,4) буфере Кребса-Рингера (4 мл/г ткани) при 37° в присутствии 10 мМ оксимочевины («Sigma», США) для ингибирования репликативного синтеза ДНК или без нее. Препарат метил- ^3H тимидина («Изотоп», СССР) добавляли из расчета 200 КБк на 1 мл среды и инкубировали в течение 2 ч. Реакцию останавливали, добавляя инкубационную смесь холодным раствором 1 мМ фосфата калия (рН 6,5) с 2 мМ MgCl_2 , 0,32 М сахарозы и центрифугировали. Затем дважды промывали ткань в этом же растворе, собирая осадок центрифугированием. Для определения удельной радиоактивности ДНК тотальных клеток неокортекса из каждой порции отбирали по ~ 20 , ~ 50 или ~ 100 мг ткани новорожденных, 14- или 60-суточных животных соответственно, в зависимости от установленного содержания ДНК [5]. Из оставшейся ткани выделяли ядра нейронов по методу Knüsel и соавт. [12] с небольшими модификациями, как описано ранее [13]. Количество ядер нейронов во фракциях, определенное методом фазово-контрастной микроскопии, превышало 90%. Чтобы дополнительно оценить чистоту нейрональных ядер, использовали известный факт, что нуклеосомная единица хроматина кортикальных нейронов в течение первой недели постнатального развития крыс сокращается до 160—170 пар оснований ДНК по сравнению с неизменными 200 парами оснований ДНК, характерными для нуклеосомы ганглийных клеток [14]. В результате анализа нейрональных фракций 14- и 60-суточных животных была получена величина 166 ± 6 , которая позволила оценить чистоту этих фракций также выше 90%. ДНК из тотальных клеток или ядер нейронов выделяли по методу Шмидта-Танигаузера в известной модификации [15]. Удельную радиоактивность (в имп/мин $\cdot$ мг $^{-1}$ ДНК) определяли в 1 мл гидролизата ДНК на жидкостном сцинтилляционном счетчике SL-30 («Intertechnique», Франция) в 10 мл сцинтилляционной жидкости («Unisolve—Koch Light LTD», Англия). Концентрацию

ДНК в гидролизате определяли спектрофотометрически [16]. Чтобы определить общую радиоактивность пула предшественников ДНК в ядрах клеток инкубированных срезов, тотальные ядра выделяли методом Austoker и соавт., как описано ранее [17], гидролизovali в 0,5 н. HClO_4 и после центрифугирования измеряли радиоактивность в супернатанте, как описано выше. Для контроля условий эксперимента использовали печень 60-суточных животных. Срезы ткани печени инкубировали так же, как срезы неокортекса; ядра выделяли, как описано ранее [17], радиоактивность ДНК или общую радиоактивность пула предшественников ДНК в ядрах определяли так же, как в клетках неокортекса.

Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлены результаты экспериментов по включению ^3H -тимидина в ДНК неокортекса животных трех возрастных групп. Суммарный синтез ДНК в клетках 14-суточных животных резко уменьшается (в 4—5 раз) по сравнению с новорожденными. Этот результат находится в соответствии с данными, полученными другими авторами при изучении синтеза ДНК *in vitro* в клетках головного мозга [4].

Таблица 1

Синтез ДНК в тотальных клетках неокортекса			
Оксимочевина (10 мМ)	Радиоактивность ДНК (имп./мин. мг ⁻¹ ДНК) · 10 ⁻³		
	возраст животных (сутки)		
	0	14	60
—	331 ± 13,0	77,7 ± 3,4	31,1 ± 1,2
+	13,5 ± 0,8	18,2 ± 0,7 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$	22,7 ± 0,9 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$
Ингибирование синтеза в присутствии оксимочевины (%)	96	77	23

Примечание. Здесь и в табл. 2 представлены средние данные из 4-х независимых экспериментов: p_1 —достоверность различия данных по сравнению с отмеченными*, p_2 —достоверность различия данных по сравнению с отмеченными*.

Уменьшение включения меченого предшественника в ДНК мозга в экспериментах *in vivo* в процессе развития животных является установленным фактом, который объясняется падением митотического индекса клеток [3, 5]. Несмотря на принципиальное различие экспериментальных моделей, следует заметить, что в эксперименте *in vivo*, с учетом кинетики включения ^3H -тимидина после внутрибрюшинной инъекции предшественника, удельная радиоактивность тотальной ДНК неокортекса 14-суточных крыс была также ~ в 2 раза выше по сравнению с

60-суточными животными [11], как и в описываемых здесь экспериментах *in vitro*. Такие результаты предполагают хорошее соответствие модели «переживающий срез» процессам синтеза ДНК *in vivo*. Синтез ДНК в этих же клетках в присутствии оксимочевинны—избирательного ингибитора, репликации—характеризуется невысоким уровнем (табл. 1). Этот синтез можно назвать репаративным спонтанным синтезом ДНК в противоположность репаративному индуцированному синтезу. Последний, как известно, инициируется, в основном, экзогенными физическими или химическими факторами, повреждающими ДНК [6]. Репаративный спонтанный синтез обусловлен, по-видимому, рядом причин: а) репарацией спонтанных повреждений ДНК, уровень которых *in vivo* достаточно высок [18]; б) репарацией радиационных повреждений ДНК, вызванных действием изотопа, носителем которого является меченый предшественник [19]; в) дополнительным репаративным синтезом, который может быть индуцирован процедурами приготовления и «переживания» изолированных срезов. Последний имеет место, например, в процессе получения ядер клеток и зависит от процедур их выделения и сохранения [20]. Оценивая долю репаративного спонтанного синтеза в общем синтезе ДНК в процессе онтогенеза, естественно наблюдать ее увеличение, обусловленное падением митотического индекса клеток неокортекса: 4% (новорожденные), 23% (14-суточные) и 77% (60-суточные животные). Иными словами, оксимочевинна ингибирует общий синтез ДНК *in vitro* в клетках неокортекса новорожденных крыс на 96%, а 60-суточных животных—на 23% (табл. 1). Здесь также можно привести данные литературы, которые позволяют оценить адекватность используемой экспериментальной модели. Так, в экспериментах *in vivo* показано, что в первые дни постнатального развития оксимочевинна, введенная внутривентрикулярно, ингибирует общий синтез ДНК в клетках мозга более чем на 90% [21].

Чтобы проверить, не обусловлена ли возрастная зависимость включения тимидина в ДНК различиями в доступной концентрации предшественника, измеряли радиоактивность пула кислоторастворимых предшественников ДНК во фракциях общих ядер (табл. 2). В указанных фракциях заметных различий между необработанными и обработанными оксимочевинной срезами не обнаружено. Можно лишь указать на слабое уменьшение проницаемости ядерной мембраны для меченого предшественника, сопровождающее процесс развития. Результат говорит о том, что выявленные различия в синтезе ДНК не являются следствием нарушения проницаемости мембран клеток для [^3H] тимидина в процессе развития или под действием оксимочевинны.

Поскольку в коре головного мозга представлены популяции нескольких классов клеток, различающихся уровнем или типом синтеза ДНК, представлялось целесообразным изучение общего и репаративного синтеза ДНК в клетках отдельного класса. При исследовании неделящихся клеток неокортекса было обнаружено, что синтез ядерной

ДНК в нейронах характеризуется низким уровнем и небольшими вариациями абсолютных величин в процессе развития животных (табл. 3). Следует подчеркнуть, что этот процесс в нейронах всех исследованных возрастных групп крыс и клетках печени 60-суточных животных не изменялся в присутствии оксимочевины. Такой результат соответствует известному представлению об отсутствии репликативного синтеза ядерной ДНК в постнатальных нейронах неокортекса крыс [1]. В нормальной печени взрослого животного митотический индекс клеток, как известно, гораздо меньше 0,01 [22]. Даже если митотический индекс клеток печени 60-суточных крыс больше этой величины в несколько раз, общий синтез ядерной ДНК таких клеток в условиях эксперимента будет практически полностью обусловлен репаративным спонтанным син-

Таблица 2

Концентрация [^3H]меченых предшественников ДНК в ядерных фракциях неокортекса и печени крыс

Оксимочевина (10 мМ)	Радиоактивность (имп. мин. · мг ⁻¹ ДНК) · 10 ⁻³			
	Неокортекс		Печень	
	возраст животных (сутки)			
	0	14	60	60
-	72,33 ± 2,84	68,77 ± 5,46	59,86 ± 2,30	65,10 ± 1,89
+	71,63 ± 2,81	70,96 ± 3,28	60,59 ± 1,86	64,25 ± 1,93
		p ₁ > 0,05 p ₂ > 0,05	p ₁ < 0,01 p ₂ < 0,01	

тезом. Такое объяснение, по-видимому, находится в соответствии с полученным результатом. Здесь следует заметить, что в тотальных клетках неокортекса 60-суточных крыс репликативный (чувствительный к оксимочевине) синтез составляет 23% от общего синтеза ДНК (табл. 1). Поэтому можно предполагать, что средний митотический индекс клеток неокортекса 2-месячных крыс выше, чем клеток печени. Такой факт косвенно подтверждают данные, полученные при анализе электрофоретических наборов клеточных белков в процессе развития крыс, которые показывают, что изменения в метаболизме ядерных белков мозга могут продолжаться до 3-месячного возраста животных [23]. В соответствии с этим можно предполагать, что развитие интегративной функции головного мозга в онтогенезе обуславливает более продолжительный (по сравнению с временем созревания клеток других тканей) процесс формирования функционирующих популяций клеток неокортекса.

Интересно отметить некоторое увеличение репаративного спонтанного синтеза ДНК в процессе развития животного: в тотальных клетках неокортекса на 68% в течение 60 суток постнатального онтогенеза (табл. 1), в нейронах—на 48 и 60% (в присутствии оксимочевины и

Синтез ДНК в ядрах нейронов неокортекса и клеток печени крыс

Оксимочевина (10 мМ)	Радиоактивность ДНК (имп/мин·мг ⁻¹ ДНК)·10 ⁻³			
	Нейроны			Гепатоциты
	возраст животных (сутки)			
	ноporожден- ные	14	60	60
—	1.19±0.08	1.52±0.07	1.90±0.10	14.6±0.6
+	1.28±0.06	1.40±0.08 p>0.5	1.90±0.09 p<0.001	14.0±0.5

Примечание. Представлены средние данные из 4-х независимых экспериментов. Приписана достоверность различия данных по сравнению с отмеченными*. Различия данных, полученных в присутствии оксимочевины и без нее статистически не достоверны.

без нее соответственно) в этот же период развития (табл. 3). Такой факт, по-видимому, может отражать известное очень интенсивное накопление повреждений ДНК в клетках головного мозга в процессе онтогенеза [24], которое обусловлено, как можно предполагать, тканеспецифическими особенностями структуры хроматина [16] и систем репарации ДНК [1, 25].

Автор выражает благодарность Тирасу Х. П. и Сельвян А. М. (Институт биологической физики АН СССР), а также Мельникову А. А. и Швецову Ю. П. (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР) за участие в постановке экспериментов и техническое обеспечение данной работы.

DNA SYNTHESIS IN NEOCORTEX OF DEVELOPING RATS

IVANOV V. A.

Institute of Biological Physics, Academy of Science of the USSR,
Poustchino

DNA biosynthesis was studied in vitro in neocortex of newborn (0-day), 14-day and 60-day old rats using isolated slices and determining the incorporation of ³H-thymidine into DNA. DNA biosynthesis in total cells of neocortex declines drastically till the 2nd week of post-natal development and then plateaus gradually. In the presence of hydroxyurea the level of DNA synthesis in these cells is low, but in 60-day old rats is 70% higher than in newborn rats. Biosynthesis of neuronal DNA in the presence of hydroxyurea in all age groups studied is not changed. Specificities of DNA biosynthesis in neocortex are discussed.

1. Иванов В. А., Третьяк Т. М. Успехи соврем. биол., т. 101, с. 174—187, 1986.
2. Ресанников К. Ю. Проллиферация клеток головного мозга позвоночных в условиях экспериментального развития мозга и при его травме, М., Наука, 1981.
3. Третьяк Т. М., Виленичик М. М., Терпиловская О. Н., Тирас Н. Ф. Докл. АН СССР, т. 228, с. 749—751, 1976.
4. Supakar P. C., Kanungo M. S. Biochem. Int., v. 5, p. 381—388, 1982.
5. Витвицкая А. В., Бикбулатова Л. С., Яблочков А. А. Журн. эволюц. биохимии и физиологии, т. 20, с. 614—616, 1984.
6. Жестяников В. А. Репарация ДНК и ее биологическое значение, Л., Наука, 1979.
7. Altman J.—In: Handbook of neurochemistry, v. 2, p. 137—182, Plenum Press N. Y., 1969.
8. Ашапкии В. В., Реманов Г. А., Тушмалова Н. А., Ванюшин Б. Ф. Биохимия, т. 48, с. 355—362, 1983.
9. Васильев В. К., Мсерсон Ф. Э. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 94, с. 63—64, 1982.
10. Переживающий срез мозга (под ред. М. Н. Митюшова), Л., Наука, 1986.
11. Иванов В. А., Терпиловская О. Н., Куликов А. В., Третьяк Т. М. Цитология, т. 29, с. 73—78, 1987.
12. Knüsel A., Lehner B., Kuenzle C. C., Kister G. S. J. Cell Biol., v. 59, p. 762—765, 1973.
13. Ivanov V. A., Melnikov A. A. FEBS Lett., v. 177, p. 300—304, 1984.
14. Molecular approaches of neurobiology (ed. I. R. Brown). N. Y.—Toronto—Sydney—San Francisco, Acad. Press, 1982.
15. Орлов А. С., Орлова Е. И. Биохимия, т. 26, с. 834—838, 1961.
16. Спирии А. С. Биохимия, т. 23, с. 656—660, 1958.
17. Ivanov V. A., Gaziev A. I., Tretyak T. M. Eur. J. Biochem., v. 133, p. 517—522, 1983.
18. Lindahl T., Nyberg B. Biochemistry, v. 11, p. 3610—3618, 1972.
19. Hobt R., Kuenzle C. Neurosci. Lett., v. 58, p. 311—314, 1985.
20. Inoue N., Ono T., Kato T. Biochem. J., v. 180, p. 471—480, 1979.
21. Vilenchik M. M., Tretyak T. M. J. Neurochem., v. 29, p. 1159—1161, 1977.
22. Бродский В. Я., Урывасва И. В. Клеточная поликлоидия. Проллиферация и дифференцировка, М., Наука, 1981.
23. Терпиловская О. Н., Иванов В. А., Абрамова Э. И., Бслова М. М. Нейрохимия, т. 2, с. 164—173, 1983.
24. Inoue N., Kato T. J. Neurochem., v. 34, p. 1574—1583, 1980.
25. Heyting C., Veer L. Carcinogenesis, v. 2, p. 1173—1180, 1981.

Поступила 19. III 1987



УДК 577.125+616.831

ИЗУЧЕНИЕ ГАНГЛИОЗИДОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА И СОСУДИСТЫХ СПЛЕТЕНИЙ ПРИ МЕНИНГОЭНЦЕФАЛИТАХ РАЗЛИЧНОЙ ЭТИОЛОГИИ

КАРПОВА О. Б., АВРОВА Н. Ф., *ЦИНЗЕРЛИНГ В. А.

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

*Научно-исследовательский институт детских инфекций, Ленинград

Обследовано 15 случаев менингоэнцефалита, которые различались как по своей этиологии, так и по степени тяжести. Наиболее выраженное снижение концентрации ганглиозидов наблюдалось у детей, умерших от поражений, вызванных вирусом герпеса. При поражении мозга менингококками или вирусом гриппа также наблюдалось значительное снижение концентрации ганглиозидов в сером веществе мозга, свидетельствующее о деструкции нервных клеток. Результаты биохимического анализа хорошо согласовались с данными морфологического изучения мозга при этих поражениях. Достоверные изменения состава выявлены в ткани мозга только лишь при менингоэнцефалитах герпетического происхождения. Относительное содержание ганглиозида Gm_{15} в сером веществе мозга этих больных было значительно выше по сравнению с контролем. Содержание ганглиозидов в сосудистых сплетениях мозга было, напротив, намного выше, чем в контролях (в 3—8 раз), при их дистрофических изменениях, что, возможно, имеет защитное значение. Комплексное изучение биохимических и морфологических изменений при менингоэнцефалитах в сочетании с клиническими и этиологическим изучением тех же случаев существенно для понимания патогенетических механизмов поражения мозга и сосудистых сплетений при этих болезнях.

Ганглиозиды представляют собой сложные гликофинголипиды, содержащие сialовые кислоты. Они являются характерными компонентами мембран нервных клеток, позвоночных, в том числе и человека. Содержание и состав ганглиозидов нервных клеток изменяется в зависимости от возраста и при различных поражениях ЦНС.

В настоящее время установлено, что содержание ганглиозидов в нервной ткани является адекватным критерием для количественной оценки количества синапсов и массы плазматических мембран нейронов [1, 2]. Определение активности ферментов обмена ганглиозидов и состава этих липидов при болезнях Тея-Сакса, Сандхоффа и других формах липидозов позволяет проводить дифференциальную диагностику наследственных нарушений метаболизма липидов [3, 4]. Изучению молекулярной организации ганглиозидов при инфекционных заболеваниях посвящены пока лишь единичные исследования.

Менингоэнцефалиты представляют собой группу широко распространенных инфекционных болезней различной этиологии [5]. Работ, посвященных изучению ганглиозидов при этих формах болезней, в литературе мы не нашли. Между тем, использование такого биохимического показателя, как содержание ганглиозидов в нервной ткани для оценки степени поражения нервных клеток при различных формах менингоэнцефалитов представляет значительный интерес. Изучение состава ганглиозидов при инфекционных поражениях ЦНС приобретает особую значимость в связи с имеющимися в современной литературе данными о ганглиозидной природе ряда вирусных рецепторов [6, 7, 8].

Целью настоящей работы является изучение содержания и состава ганглиозидов головного мозга и сосудистых сплетений мозга у детей, умерших от менингоэнцефалитов, и сопоставление полученных данных с результатами клинического, морфологического и этиологического изучения этих случаев.

Материалы и методы

Нами было изучено 15 случаев менингоэнцефалитов различной этиологии и различной степени тяжести у детей разных возрастных групп. В качестве контроля служил мозг детей, погибших в результате травмы или от заболеваний, не связанных с поражением ЦНС.

Для биохимических исследований на вскрытии из серого и белого вещества лобной доли головного мозга брались навески по 1—3 г, а из хориоидальных сплетений боковых желудочков по 0,25—0,5 г. Содержание ганглиозидов определяли по реакции с резорцином и выражали в мкг N-ацетилнейраминовой кислоты [9, 10]. Разделяли ганглиозиды на индивидуальные фракции методом восходящей тонкослойной хроматографии, как это было описано ранее [11].

Для гистологического исследования кусочки серого и белого вещества лобной доли головного мозга и других участков мозга фиксировали в растворе Кайзерлинга и заливали в целлоидин-парафин. Срезы окрашивались гематоксилином-эозином, азураэозином, тионинном по Нисслю, а при необходимости и с помощью других методов. Определение этиологии процесса базировалось на иммунофлуоресцентных исследованиях материала из легких и головного мозга, серологических исследованиях крови и ликвора, а также подробного бактериологического изучения. В результате исследований по определению этиологического фактора оказалось, что изученные нами случаи менингоэнцефалитов были вызваны менингококком, микоплазмой, вирусом герпеса и различными штаммами вируса гриппа.

Результаты исследований

Обследовано 15 случаев менингоэнцефалитов, различающихся по своей этиологии. Наиболее выраженное снижение концентрации ганглиозидов в сером веществе мозга наблюдалось у детей, умерших от поражений, вызванных вирусом герпеса по сравнению с контролями

(446 ± 56 и 833 ± 32 мкг соответственно, см. табл.). В одном из случаев содержание ганглиозидов снижалось до уровня, характерного для белого вещества мозга, что указывает на распад серого вещества. Наблюдалась тенденция к снижению содержания ганглиозидов в белом веществе мозга, однако достоверных изменений не было выявлено. Эти данные свидетельствуют о далеко зашедшем процессе дегенеративного распада нервных клеток при менингоэнцефалитах этой этиологии. Во всех трех случаях морфологические исследования также показали сильно выраженные некротические процессы в сером веществе (рис. 1, а, б, г). Клинические симптомы свидетельствовали о тяжелых поражениях не только оболочек мозга, но и самой ЦНС при менингоэнцефалитах, вызванных вирусом герпеса.

В тех случаях, когда болезнь была вызвана менингококками или вирусом гриппа, также наблюдалось достоверное снижение концентрации ганглиозидов в коре мозга, но не в белом веществе по сравнению с контрольными величинами, однако оно было менее выражено, чем при герпетическом поражении (табл.). Эти результаты свидетельствуют о дегенерации значительного числа нервных клеток при этих формах болезни. По данным, полученным с помощью гистологических методов, в случаях менингоэнцефалитов, вызванных менингококками или вирусом гриппа, наблюдаются ишемические и дистрофические поражения нейронов. И, наконец, при одном из случаев менингококковой инфекции (больной Н., 8 мес.) содержание ганглиозидов как в белом, так и в сером веществе мозга находилось в пределах колебаний контрольных величин, то есть не отличалось от этих показателей в мозгу детей, не имеющих поражений ЦНС. Данные морфологического анализа также свидетельствуют о том, что в этом случае имели место лишь слабые изменения нервных клеток (рис. 1, в).

Особую группу болезней составляли менингоэнцефалиты, вызванные микоплазменной инфекцией. Нами обследовано 4 случая новорожденных детей, умерших от этой инфекции. В сером и в белом веществе мозга не наблюдалось достоверных изменений в концентрации ганглиозидов по сравнению с мозгом детей того же возраста, умерших от причин, не вызывающих поражения ЦНС (таблица). Гистологическими методами также не выявлено некротических и выраженных дистрофических изменений нервных клеток при этой форме инфекции.

Нами также были изучены концентрации ганглиозидов в сосудистых сплетениях боковых желудочков, которые особенно поражаются при менингоэнцефалитах. *A priori* можно было бы ожидать снижение содержания ганглиозидов в сосудистых сплетениях мозга в результате деструктивных изменений, входящих в их состав эпендимоцитов (рис. 1, г, д), развивающихся как и нейроны из клеток нервной трубки. Однако, как оказалось, содержание ганглиозидов в сосудистых сплетениях больных менингоэнцефалитом, напротив, выше, чем в норме (табл.). Интересно отметить, что самая высокая концентрация ганглиозидов в хорриондальных сплетениях наблюдалась у больных с наиболее выраженным

Таблица

Содержание ганглиозидов в головном мозгу и в сосудистых сплетениях при менингоэнцефалитах различной этиологии

Этиология болезни	Степень поражения мозга по данным гистологического анализа	Число наблюдений	Концентрация ганглиозидов мкг N-ацетилнейраминовой кислоты 1 г сырого веса мозга		
			Серое вещ-во	Белое вещ-во	Сосудистое сплетение
Вирус герпеса (Herpes simplex virus 1)	Некротические поражения нейронов	3	446±56 p<0,01	192±51 p>0,1	92±42
Менингококковая инфекция (Neisseria meningitidis B)	Ишемические и дистрофические поражения нейронов	3	574±27 p<0,01	290±13 p>0,1	51±10
Вирус гриппа (Myxovirus influenzae)		4			
Менингококковая инфекция (Neisseria meningitidis B)	Слабые изменения нейрона	1	704	237	63
Контроль—10 лет	Без поражения ЦНС	5	833±32	255±41	18±1,5
Микоплазменная инфекция (Mycoplasma hominis)	Слабые изменения нейронов	4	448±82	401±22,4	—
Контроль—новорожденные	Без поражений ЦНС	2	394	420	

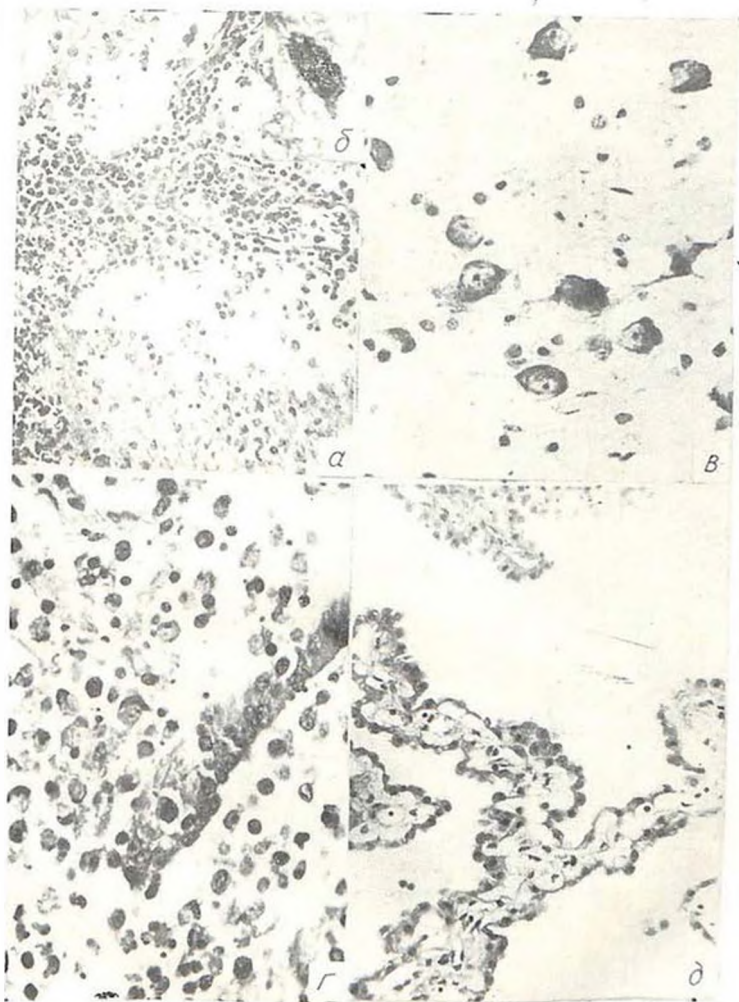


Рис. 1. Морфологические изменения головного мозга при менингоэнцефалитах различной этиологии: а—обширные некрозы и периваскулярная инфильтрация при герпетическом менингоэнцефалите (окраска гематоксилином-эозином, X 375); б—интрануклеарные базофильные включения в нервной клетке при герпетическом менингоэнцефалите (окраска гематоксилином-эозином, X 945); в—дистрофические изменения, увеличение в объеме и базофилия цитоплазмы нервных клеток при гриппозном менингоэнцефалите (окраска по Нисслю, X 750); г—слущивание, дистрофические изменения и мелкодымчатый разлад ядер астроцитов бокового желудочка при герпетическом менингоэнцефалите (окраска гематоксилином-эозином, X 450); д—небольшая пролиферация клеток инстилки сосудистого сплетения при нейротоксикозе на фоне острой вирусной респираторной инфекции (окраска гематоксилином-эозином, X 375).

некротическим распадом нейронов. Так, у больного Б. (8 лет, у которого наблюдался почти полный распад серого вещества), содержание ганглиозидов в сосудистых сплетениях увеличено почти в 10 раз. В 2—3 раза была увеличена концентрация в хориондальном сплетении и в других случаях болезни, вызванных вирусом герпеса, для которых характерен менее выраженный некротический распад нейронов. У больных менингоэнцефалитом, вызванным менингококковой инфекцией или вирусом гриппа, содержание ганглиозидов в сосудистых сплетениях колебалось от величин, незначительно превышающих контрольные величины, до 4—5-кратного увеличения этих гликолипидов. Значительное увеличение концентрации ганглиозидов (до 63 мкг/1 г ткани) обнаружено у одного из больных с менингококковой инфекцией, у которого наблюдались лишь слабые изменения нейронов и содержание ганглиозидов находилось в пределах индивидуальных колебаний у детей без поражения ЦНС (табл.).

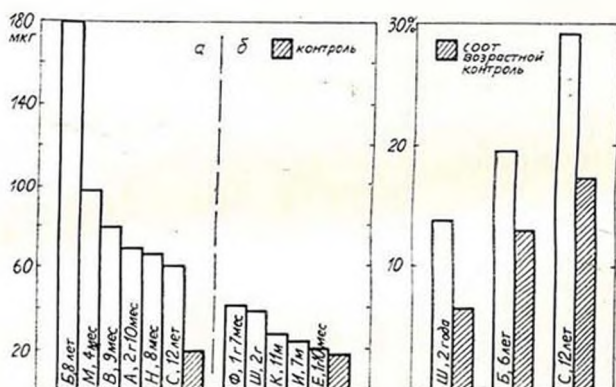


Рис. 2. Содержание ганглиозидов в сосудистых сплетениях при менингоэнцефалитах (мкг сиаловой кислоты ганглиозидов/1 г сырой ткани): а—сосудистые сплетения с дистрофическим изменением; б—сосудистые сплетения без деструктивных изменений

Рис. 3. Содержание фракции ганглиозида G'Dib в сером веществе головного мозга больных герпетическим менингоэнцефалитом (% от суммы сиаловой кислоты ганглиозидов)

На рис. 2 изученные случаи подразделены не в зависимости от этиологии и степени поражения нервной ткани, а по результатам гистологического посмертного обследования состояния сосудистых сплетений. В тех случаях, когда на основании гистологического исследования были обнаружены дистрофические изменения хориондальных сплетений, когда можно было говорить о дистрофических изменениях эндимиоцитов, о нарушении обычных контактов между ними, уровень ганглиозидов был в 3—10 раз выше по сравнению с нормой и составлял 62—178 мкг

сиаловой кислоты ганглиозидов. Другие наблюдения показали, что когда гистологическая картина позволяла говорить об относительной сохранности сосудистого сплетения при поражении коры головного мозга, уровень ганглиозидов был лишь незначительно выше возрастной нормы (рис. 2, б).

Состав ганглиозидов в коре и в белом веществе головного мозга с менингоэнцефалитами, вызванными вирусом гриппа или менингококковой инфекцией, не отличался сколько-нибудь существенно от контрольных величин. Не обнаружено выраженных изменений состава ганглиозидов по сравнению с контролями и при микоплазменной инфекции. Как в норме, так и при этих формах болезни на долю ганглиозидов G_м, G_в, G_в и G_т приходилось 80—90% от суммы сиаловой кислоты ганглиозидов.

Достоверные изменения состава выявлены в ткани мозга только лишь при менингоэнцефалитах герпетического происхождения. Относительное содержание ганглиозида G_в в сером веществе мозга этих больных было значительно выше по сравнению с контролем (рис. 3).

Обсуждение результатов

Данные по содержанию ганглиозидов в сером и в белом веществе мозга человека в норме (табл.) согласуются с литературными данными [12, 13].

Нами найдено, что содержание ганглиозидов в хориоидальных сплетениях человека в 40—50 раз ниже, чем в коре мозга. В литературе сведений о содержании ганглиозидов в сосудистых сплетениях нам не встретилось, но полученные величины хорошо укладываются в интервал колебаний, характерных для других органов и тканей. Как правило, в экстракционных тканях содержание ганглиозидов на 1—2 порядка ниже, чем в нервной ткани [14, 15].

Содержание ганглиозидов в ткани мозга снижается существенно при старческом слабоумии и ряде других неврологических болезней, связанных с деградацией нейронов [13, 16, 17]. Обучение, напротив, может сопровождаться достоверным увеличением содержания и скорости обмена ганглиозидов, что показано в опытах на животных [18, 19].

При менингоэнцефалитах имеет место нарушение кровоснабжения мозга, что приводит к гипоксическим состояниям. В литературе имеются данные о том, что гипоксические состояния не вызывают достоверных изменений концентрации ганглиозидов в ткани мозга [20]. Поэтому снижение содержания ганглиозидов при менингоэнцефалитах не связаны, очевидно, даже частично, с развитием гипоксических состояний, которые имеют место при данной болезни. Некоторые вирусы, например, вирус гриппа, обладают нейраминидазной активностью, однако в литературе нет указаний на существенные изменения содержания и состава ганглиозидов в ткани мозга под влиянием нейраминидазы вирусов, в том числе вируса гриппа [21]. Нами не найдено сколько-нибудь

выраженных изменений состава ганглиозидов серого и белого вещества головного мозга под влиянием вируса гриппа, которые бы свидетельствовали о влиянии нейраминидазы вируса на состав ганглиозидов мозга. В свете этих данных снижение содержания ганглиозидов в мозгу при менингоэнцефалитах различной этиологии, особенно выраженной при герпетических поражениях мозга, представляет собой показатель, который является адекватным биохимическим критерием для количественной оценки степени дегенерации нервных клеток. Данные проведенных биохимических исследований, показавшие снижение содержания ганглиозидов, при всех формах менингоэнцефалитов хорошо согласуются с результатами гистологических анализов.

При герпетических поражениях мозга во всех трех исследованных случаях обнаружено увеличение содержания дисналоганглиозида Gb₃ по сравнению с контролями того же возраста в 1.6—2 раза. При менингоэнцефалитах другой этиологии существенных изменений нами не было выявлено. Изменение состава ганглиозидов под влиянием нейраминидазы вирусного происхождения в случае менингоэнцефалитов, вызванных вирусом герпеса, представляется маловероятным, так как основным продуктом реакции под воздействием этого фермента являются, как правило, мононалоганглиозиды [22]. Логичнее предположить, что вирус герпеса обладает способностью избирательно ингибировать синайл-трансферазу, осуществляющую перенос N-ацетилнейрамининовой кислоты на Gb₃, в результате чего этот ганглиозид не утилизируется и накапливается.

При менингоэнцефалитах различной этиологии сосудистые сплетения боковых желудочков являются местами серьезных поражений. В состав этих структур, основной функцией которых является образование цереброспинальной жидкости, входят мелкие артерии, переходящие в капиллярные сплетения и окутывающие их эпендимоциты. В настоящее время трудно объяснить, чем вызвано увеличение содержания ганглиозидов в сосудистых сплетениях мозга. Можно предположить, что происходит накопление этих липидов в составе мембранных цитоплазматических телец. Накопление ганглиозидов в клетках различных органов и тканей показано для наследственных болезней, вызванных нарушением обмена ганглиозидов [23].

Возможно, что увеличение содержания ганглиозидов в хореоидальных сплетениях связано с тем, что при массивном некрозе мозговой ткани, в том числе и в паравентрикулярных областях, часть веществ, освободившихся в результате распада нервной ткани, попадает в ликвор, а оттуда в сосудистые сплетения. Причина изменений в содержании ганглиозидов в сосудистых сплетениях требует дальнейшего изучения, однако нельзя исключить, что их повышение имеет какое-то защитное значение.

STUDY OF BRAIN AND VASCULAR PLEXIS GANGLIOSIDES IN MENINGOENCEPHALITES OF DIFFERENT ETIOLOGY

KARPOVA O. B., AVROVA N. F., *TSINZERLING V. A.

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

*Research Institute of Infantile Infections, Leningrad

The amount of brain gangliosides and their composition have been studied in 15 cases of meningoencephalitis of various etiology and degree of disease. The most pronounced decrease of ganglioside concentration was found in brain tissue of children, who died from disease caused by herpes virus. Considerable decrease of ganglioside concentration was revealed in the grey matter of brain tissue in patients with influenza virus or meningococcus infection but not in patients with mycoplasma infection. These data provide evidence of nerve cell destruction in brain tissue due to meningoencephalitis of various etiology. The biochemical data obtained are in good agreement with the results of the morphological studies. Significant changes of ganglioside composition were revealed only in brain tissue of children infected by herpes virus: relative content of disialoganglioside GD_{1b} in grey matter of these patients was much higher compared to control values.

Ganglioside content in vascular plexes of patients with meningoencephalitis was, on the contrary, much higher (3–8 fold than in the controls). The increase of gangliosides in dystrophic vascular plexes may have a protective role. Complex studies of biochemical and morphological changes in meningoencephalitis in combination with clinical and etiological studies of the same cases are of importance for better understanding of the pathogenesis of various forms of these diseases.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hess H. H., Bass N. H., Thalheimer C., Davarakonda R. J. *Neurochem.*, v. 26, № 6, p. 1115–1121, 1976.
2. Thangnipon W., Smith R. M., Atkinson D. G., Balaze R. J. *Neurochem.*, v. 44, suppl. S., p. 36, 1985.
3. Pilz H., Helperts R., Seidel D. *Hum. Genet.*, v. 47, № 2, p. 113–134, 1979.
4. Okada S., O'Brien J. *Science*, v. 165, p. 598–700, 1969.
5. Лонгсон М., Бэйли А. Последние достижения в области клинической вирусологии, М., 1980.
6. Holmgren I., Elwing H., Fredman P., Stannegard O., Svennerholm L. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 125, p. 453–470, 1980.
7. Osborne G. C., Moss J., Fishman P. H., Nakaya S., Robertson D. C. *Biochim. et biophys. acta*, v. 710, № 2, p. 168–169, 1982.
8. Букринская А. Г., Корнилова Т. В., Воркунова Н. К., Тимофеева Н. Г., Шапошникова Г. И., Бергельсон А. Д. *Вопр. вирусологии*, т. 27, № 6, с. 661–666, 1982.
9. Svennerholm L. *Biochim. et biophys. acta*, v. 24, № 4, p. 604–611, 1957.
10. Svennerholm L. *Acta Chem. Scand.*, v. 17, p. 239–244, 1963.

11. *Aurora N. F.* J. Neurochem., v. 18, № 4, p. 667—674, 1971.
12. *Svennerholm L.* Mod. Probl. Paediat., v. 13, № 1, p. 104—115, 1974.
13. *Svennerholm L., Gottfrids C. G., Karlsson J.* J. Neurochem., v. 44, suppl. S, p. 193, 1985.
14. *Puro K., Maury P., Huttunen J. K.* Biochem. et biophys. acta, v. 187, № 2, p. 230—237, 1969.
15. *Аврова Н. Ф., Обухова Е. А.* Успехи соврем. биол., т. 79, № 1, с. 133—147, 1975.
16. *Cherayil G. D.* J. Neurochem., v. 16, № 6, p. 913—920, 1969.
17. *Marchbanks R. M.* J. Neurochem., v. 39, № 1, p. 9—15, 1982.
18. *Marchionatti A. M., Caputto R. L.* Neurochem. Int., v. 6, № 2, p. 219—263, 1984.
19. *Morgan Brain L. G., Winek Myron.* Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., v. 161, № 4, p. 534—537, 1979.
20. *Lowden J. A., Blankier J. J.* J. Neurochem., v. 23, № 2, p. 439—441, 1974.
21. *Bergelson L. D., Bukrinskaya A. D., Prokuzova N. V., Shaposhnikova J. J., Kocharov S. D., Shevchenko V. P., Kornilova J. V., Fomina-Ageeva E. I.* Eur. J. Biochem., v. 128, № 2—3, p. 467—474, 1982.
22. *Velt R. W., Sander M.* Perspectives in the Inherited Metabolic Diseases, v. 4, p. 71—109, 1981.
23. *Brady R. O.* Sphingolipidoses., Ann. Rev. Biochem., v. 47, p. 687—713, 1978.

Поступила 19. I 1987



УДК 591.484+617.735—002.156+577.153

ОСОБЕННОСТИ ПРОЦЕССА ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ
ЛИПИДОВ В ТКАНЯХ СЕТЧАТКИ И МОЗГА КРЫС С
НАСЛЕДСТВЕННОЙ ДЕГЕНЕРАЦИЕЙ СЕТЧАТКИ

ЕФИМОВА М. Г., ОСТАПЕНКО Н. А., ЭТИНГОФ Р. Н.

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

Показаны изменения интенсивности процесса перекисного окисления липидов в тканях сетчатки и мозга больных крыс на 20-й и 40-й день постнатальной жизни. Установлена разнонаправленность изменений первичных (диеновые конъюгаты) и вторичных (малоновый диальдегид) продуктов перекисного окисления липидов в сетчатке больных крыс. В ткани мозга отличия между больными и здоровыми наблюдали только по содержанию малонового диальдегида. При индукции перекисного окисления липидов системой железо+аскорбат в гомогенатах сетчатки и мозга обнаружили, что интенсивность этого процесса у 20-дневных больных крыс больше, чем у здоровых. У 40-дневных животных отличия в скорости индуцированного перекисного окисления липидов в ткани мозга практически отсутствовали. Также не обнаружили существенной разницы в интенсивности индуцированного освещением перекисного окисления липидов в гомогенатах сетчатки 40-дневных крыс *Campbell* и *Wistar*.

Процесс перекисного окисления липидов (ПОЛ) привлекает в настоящее время внимание многих исследователей. Показаны функциональные сдвиги этого процесса в различных тканях, имеется ряд примеров его нарушения при некоторых заболеваниях [1, 2]. Процесс ПОЛ протекает в несколько стадий: одним из его первичных продуктов являются гидроперекиси полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), о содержании которых можно судить по количеству конъюгированных двойных связей—диеновых конъюгатов (ДК); промежуточные продукты ПОЛ обычно реагируют с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК); основным среди них является малоновый диальдегид (МДА). Последний, в свою очередь, может соединяться с NH_2 -группами белков, фосфолипидов, образуя шиффовы основания (ШО) [3]. Учитывая трудность интерпретации выраженности процесса ПОЛ по одному показателю (особенно это касается МДА), необходимо определять несколько продуктов ПОЛ, возникающих на разных стадиях процесса [4].

Изучение процесса ПОЛ в сетчатке имеет особый интерес, так как эта ткань, и, в частности, наружные сегменты палочек (НСП), характе-

ризируются крайне высоким содержанием ПНЖК [5, 6], которые являются основным субстратом ПОЛ. При различных патологиях сетчатки—световое поражение, алиментарный Е-авитаминоз—процессы ПОЛ в ней изменены [7, 8]. При наследственной дегенерации сетчатки, механизм которой неизвестен [9], процесс ПОЛ может внести определенный вклад в его развитие, ускоряя наступление слепоты. Показано, что введение в глаз животных ионов двухвалентного железа, которые ускоряют процесс ПОЛ, приводит к дегенеративным изменениям сетчатки [10].

Ранее у нас в лаборатории были получены данные, свидетельствующие об изменениях процесса ПОЛ в сетчатке крыс с наследственной дегенерацией. Было установлено, что содержание одного из промежуточных продуктов ПОЛ—МДА в сетчатке больных крыс меньше, чем у здоровых [11]. Это изменение проявилось на очень ранних сроках развития заболевания (12-й день жизни) и оставалось выраженным и на более поздних этапах болезни. В дальнейшем нами были подтверждены изменения процесса ПОЛ в сетчатке больных крыс. Однако направленность этих изменений носила обратный характер: содержание ДК—первичных продуктов ПОЛ, было в сетчатке больных животных на 15- и 50-й дни жизни больше, чем у здоровых [12]. Косвенные данные также свидетельствуют об изменении процесса ПОЛ при наследственной дегенерации сетчатки. Так, у больных животных относительно легко возникают катаракты, образование которых связывают с интенсификацией процесса ПОЛ [13].

В связи с приведенными данными представляло интерес более подробное и систематическое изучение ПОЛ в ткани сетчатки больных крыс. Наше внимание привлекли ранние сроки болезни, то есть те, при которых еще не происходит деструкция НСП—основного депо ПНЖК. Для сравнения с сетчаткой мы полагали целесообразным изучить процесс ПОЛ в близкой ей по происхождению ткани мозга. В работе также оценивали величину индуцированного ПОЛ в этих тканях под влиянием ионов двухвалентного железа, имеющего ведущее значение для процесса ПОЛ. В ряде работ показано, что освещение индуцирует ПОЛ в сетчатке здоровых животных [7]. В настоящей работе было исследовано влияние освещения на процесс ПОЛ в сетчатках больных и здоровых животных.

Материалы и методы

Работу проводили на крысах-самцах линии *Campbell* в возрасте от 20 до 45 дней, в качестве контроля использовали крыс линии *Wistar* того же возраста. Животных декапитуировали, ткань сетчатки и мозга гомогенизировали на холоду в 0,02 М трис-НСI буфере, рН 7. 4, содержащем 0,175 М КСI. МДА определяли спектрофотометрически [14] по поглощению продукта его взаимодействия с ТБК при длине волны 532 нм. Содержание МДА выражали в нмоль на мг белка. Белок определяли методом Lowry и соавт. [15]. Для определения ДК и ШО липиды экстрагировали методом Folch и соавт. [16]. ДК регистрировали

спектрофотометрически по поглощению при длине волны 232 нм в растворе метанол—гексан (5:1). Содержание ДК рассчитывали на мг липидного фосфора. Липидный фосфор определяли методом Васьяковского [17]. ШО определяли по спектру флуоресценции в хлороформе при длине волны возбуждения 365 нм и длине волны испускания 420 нм. Флуоресценцию рассчитывали в усл. ед. относительно флуоресценции растворителя и относили её к мг липидного фосфора. Все спектрофотометрические и флуориметрические измерения выполняли на спектрофотометре с флуоресцентной приставкой Spexord M-40 (ГДР).

Скорость индуцированного ПОЛ оценивали по накоплению МДА. Индукцию ПОЛ *in vitro* проводили добавлением к гомогенатам тканей растворов FeSO_4 и аскорбиновой кислоты в концентрациях 10 мкМ и 0,5 мМ соответственно при температуре 23°. Индуцированный процесс ПОЛ останавливали прибавлением 3 мМ раствора ЭДТА через 1, 3 и 6 минут. Освещение гомогенатов сетчаток осуществляли светом электрической лампы накаливания через водяной фильтр при температуре 23°. Уровень освещенности составлял 5000 лк, время освещения—1 ч. Контролем служили гомогенаты сетчатки, находившиеся это же время в темноте. Индуцированный процесс ПОЛ останавливали добавлением в гомогенаты ионола из расчета 1 мг ионола на 100 мл гомогената.

Обработку результатов измерений проводили методом Стьюдента [18].

Результаты исследования

В табл. 1 суммированы данные, полученные нами ранее, а также результаты экспериментов, проведенных в настоящей работе по изменению показателей ПОЛ в сетчатке больных крыс по сравнению со здоровыми. Мы подтвердили заключение об увеличении содержания ДК в сетчатках больных крыс в ранние и поздние сроки болезни [12]. Однако при этом содержание МДА в сетчатке больных крыс было меньше, чем у здоровых, а не больше, как мы предполагали. Таким образом, во все изученные сроки мы отмечали противоположную направленность изменений в содержании ДК и МДА.

Из данных, приведенных в табл. 2, видно, что в мозгу здоровых животных увеличивается содержание всех продуктов ПОЛ от 20-го до 40-го дня постнатальной жизни. Что касается больных животных, то у них на 20-й и 40-й день жизни в ткани мозга МДА было существенно меньше, чем у здоровых, хотя по содержанию ДК мозг больных и здоровых крыс не отличался, так же, как и по содержанию ШО.

Опыты по индукции ПОЛ системой железо+аскорбат показали, что в гомогенатах ткани сетчатки и мозга больных крыс 20-дневного возраста ПОЛ индуцируется легче, чем у здоровых (рис., а, б), а в гомогенатах ткани мозга 40-дневных больных крыс разницы в скоростях индукции ПОЛ по сравнению со здоровыми не было обнаружено (рис., в).

В последней серии опытов была изучена индукция процесса ПОЛ в гомогенатах ткани сетчатки больных и здоровых крыс при освещении. В этих опытах использовались сетчатки 20-дневных животных, так как этот срок заболевания наиболее интересен—животное уже прозрело, НСП частично сформированы и электрофизиологическая характеристика

Таблица 1

Показатели ПОЛ в ткани сетчатки крыс линии *Campbell* и *Wistar*; сопоставление с литературными данными (n=6—8)

Возраст животных	Линия крыс	Диевые конъюгаты		Малоновый диальдегид	
		(нмоль/мг липидного фосфора)	% изменения по отношению к <i>Wistar</i>	(нмоль/мг белка)	% изменения по отношению к <i>Wistar</i>
15 дней	<i>Wistar</i>	—	—	—	—
	<i>Campbell</i>	—	+51 [12]	—	—39 [11]
20 дней	<i>Wistar</i>	74,0±3,9	—	0,167±0,015	—47
	<i>Campbell</i>	92,0±2,9*	+24	0,089±0,011*	—43 [11]
35 дней	<i>Wistar</i>	50,6±5,0	—	—	—
	<i>Campbell</i>	76,0±9,0*	+52	—	—31 [11]
45 дней	<i>Wistar</i>	44,0±5,3	—	—	—
	<i>Campbell</i>	71,0±6,2*	+69	—	—

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3 различия между крысами линий *Campbell* и *Wistar* достоверны при * $p < 0,05$; n—число животных в опыте.

Таблица 2

Показатели ПОЛ в ткани меза крыс линии *Campbell* и *Wistar* (n=4—6)

Возраст животных	Линия крыс	Диевые конъюгаты (нмоль/мг липидного фосфора)	Малоновый диальдегид (нмоль/мг белка)	Шиффовы основания (усл. ед. ×10/мг липидного фосфора)
20 дней	<i>Wistar</i>	12,7±1,1	0,184±0,013	2,3±0,28
40 дней	<i>Wistar</i>	36,3±7,1	0,206±0,028	5,8±1,5
20 дней	<i>Campbell</i>	12,6±0,9	0,059±0,005*	2,7±0,6
40 дней	<i>Campbell</i>	36,5±1,7	0,077±0,011*	4,2±1,1

ответа на освещение еще близка к норме [19]. Как видно из данных, приведенных в табл. 3, значительное увеличение содержания МДА наблюдается в гомогенатах сетчаток, находившихся в течение часа в темноте, что свидетельствует об активном течении процесса ПОЛ за счет эндогенных ресурсов. Показано также, что такой индуктор ПОЛ, как освещение, вызывает усиление этого процесса, что совпадает с литературными данными [5], однако существенной разницы в процентах прироста МДА при освещении в гомогенатах ткани сетчатки больных и здоровых крыс по сравнению с соответствующими контролями выявлено не было.

Обсуждение результатов

Обращает на себя внимание тот факт, что в ткани сетчатки больных крыс во все изученные сроки наблюдалась разная направленность изменений в содержании ДК и МДА в отличие от здоровых животных.

В ткани мозга 20- и 40-дневных больных крыс также отмечали уменьшение содержания МДА, хотя количество ДК и ШО в мозгу больных и здоровых крыс было одинаковым. Феномен уменьшения МДА в исследованных тканях больных животных можно, по-видимому, объяснить или замедлением его образования, или ускорением его утилизации. В первом случае это можно было бы связать с повышением активности глутатионпероксидазы, которая эффективно конкурирует за гидроперекиси ПНЖК, включенные в цепь радикального процесса, ведущего к

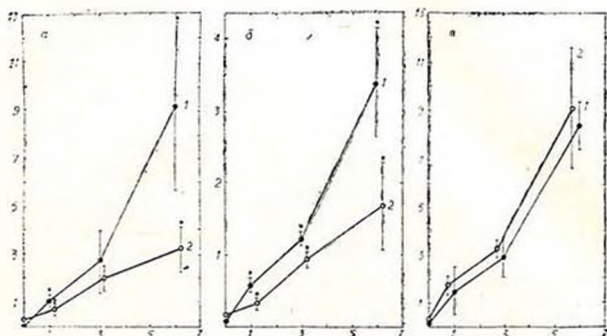


Рис. Индукция перекисного окисления липидов системой железо-аскорбат в гомогенатах ткани сетчатки (а) и мозга (б) 20-дневных и мозга 40-дневных (в) крыс линий Campbell (1) и Wistar (2). По оси абсцисс—время индукции (мин), по оси ординат—содержание МДА (нмоль/мг белка)

Таблица 3
Влияние освещения на содержание малонового диальдегида (МДА) в гомогенатах ткани сетчатки 20-дневных крыс линии Campbell и Wistar (n=6)

Линия крыс	МДА (нмоль/мг белка)			
	исходное содержание	контроль (темнота)	Освещение	% прироста МДА при освещении по сравнению с контролем
Wistar	0.167 ± 0.015	0.95 ± 0.12	1.57 ± 0.09	65
Campbell	$0.089 \pm 0.011^*$	0.77 ± 0.04	$1.19 \pm 0.08^*$	55

образованию МДА. Во втором случае—с повышением активности одного или нескольких ферментов метаболизма МДА, таких как альдегиддегидрогеназа или карбоксилаза. Увеличение же количества ДК, свидетельствующее об ускорении начальных этапов ПОЛ в ткани сетчатки больных крыс, может быть как следствием снижения эффективности работы защитных систем (уменьшение активности супероксиддисмутазы и каталазы или снижение содержания α -токоферола и др.), так и происходить за счет повышенного содержания в этой системе восстановитель-

ных эквивалентов, которые могут восстанавливать молекулярный кислород. Итак, анализ показателей ПОЛ в ткани сетчатки и мозга больных крыс в онтогенезе позволил сделать вывод о том, что нарушение ПОЛ в этих тканях происходит уже на ранних стадиях заболевания. Опыты по индукции процесса ПОЛ системой железо+аскорбат подтвердили наш вывод. Показано (рис., а, б), что скорость индукции процесса ПОЛ в сетчатке и в мозгу 20-дневных больных крыс выше, чем у здоровых. Однако к 40-му дню развития скорости индуцированного ПОЛ в ткани мозга больных и здоровых животных одинаковы (рис., в). По-видимому, к этому сроку в ткани мозга больных крыс уже начинает происходить какая-то компенсация обусловленных болезнью сдвигов.

Резюмируя полученные данные, следует отметить, что процессы ПОЛ у крыс с наследственной дегенерацией сетчатки и у здоровых крыс протекают по-разному как в ткани сетчатки, так и на ранних стадиях заболевания в ткани мозга. Остается неясным вопрос о том, с чем связано уменьшение количества МДА в тканях больных животных и чем обусловлено изменение индукции ПОЛ системой железо+аскорбат в тканях сетчатки и мозга 20-дневных больных животных по сравнению со здоровыми. Заслуживает дополнительного анализа разнонаправленность изменений содержания первичных и промежуточных продуктов ПОЛ у больных животных. Изучение этих вопросов является предметом дальнейшего исследования.

Авторы статьи выражают глубокую благодарность сотрудникам лаборатории нейрхимии Института эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова АН СССР В. А. Тюрину и Н. В. Горбунову за помощь в работе и обсуждении результатов.

PECULIARITIES OF LIPID PEROXIDATION IN RETINA AND BRAIN OF RATS WITH INHERITED RETINA DEGENERATION

EPHIMOVA M. G., OSTAPENKO I. A., ETINGOF R. N.

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

Lipid peroxidation in retina and brain of *Campbell* rats with inherited degeneration of retina was studied and compared to that of Wistar rats. A change in the intensity of this process is revealed as early as the 20-th day of postnatal life. In retina and brain homogenates of 20 day old *Campbell* rats, compared to Wistar, ferrous ion-ascorbic acid increased lipid peroxidation to a greater extent, whereas in 40 day old diseased and control rats the rate of induced lipid peroxidation in these tissues was quite similar. Light-induced lipid peroxidation in the homogenate of retina of 20 day-old *Campbell* and Wistar rats showed no essential difference.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абрамова Ж. И., Оксенглендер Г. И. Человек и противокислительные вещества, Л., Наука, 1985.
2. Free radicals in biology (ed. W. D. Pryor), New York, Academic Press, 1976.
3. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах, М., Наука, 1972.
4. Казан В. Е., Орлов О. Н., Прилипко Л. Л. Проблема анализа эндогенных продуктов перекисного окисления липидов, Биофизика (Итоги науки и техники ВИНТИ АН СССР), т. 18, 1986.
5. Казан В. Е., Шведова А. А., Новиков К. Н., Козлов Ю. П. Биофизика, т. 20, с. 1043—1048, 1975.
6. Fliesler S. J., Anderson R. E. Prog. Lipid Res., v. 22, p. 79—131, 1983.
7. Зусова М. В., Шведова А. А., Щербатова О. И. Вестн. офтальмологии, № 3, с. 56—59, 1977.
8. Казан В. Е., Барыбина Г. В., Новиков К. Н. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 83, с. 411—413, 1977.
9. Matuk Y. Can. J. Biochem., v. 62, p. 535—546, 1984.
10. Rapp L. M., Wiegand R. D., Anderson R. E.—In: Problems of normal and genetically abnormal retinas (eds. Clayton R. M., Haywood J., Reading H. W., Wright A.) p. 109—119, London U. K., Academic Press, 1982.
11. Этингоф Р. Н., Остапенко И. А., Чусова Г. Г.—В кн.: Физиологические науки медицине, с. 67—76, Л., Наука, 1983.
12. Остапенко И. А., Шабанова М. Е., Тюрин В. А., Борин М. А., Горбунов Н. В., Этингоф Р. Н. Нейрохимия, т. 5, с. 391—396, 1986.
13. Zigler J. S., Hess H. H. Exp. Eye Res., v. 41, № 1, p. 67—76, 1985.
14. Стальная И. Д., Гаришвили Т. Г.—В кн.: Современные методы в биохимии, с. 68—70, М., Медицина, 1977.
15. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Randall R. J. J. Biol. Chem., v. 193, № 1, p. 423—434, 1951.
16. Folch J., Lees M., Stanley G. H. J. Biol. Chem., v. 226, № 1, p. 497—509, 1957.
17. Препаративная биохимия липидов (под редакцией Бергельсона Л. Д.), М., Наука, 1981.
18. Белецкий А. Н. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта, Рига, АН Латв. ССР, 1959.
19. Herron W. L., Riegel B. W., Ruben M. L. Invest. Ophthalmol., v. 10, № 1, p. 54—63, 1971.

Поступила 19. II 1987



ВЛИЯНИЕ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ НА ПРОВОДИМОСТЬ ФОТОРЕЦЕПТОРНОЙ МЕМБРАНЫ ДИСКА

РЕБРИК Т. И., КАЛАМКАРОВ Г. Р., ОСТРОВСКИЙ М. А.

Институт химической физики АН СССР, Москва

Рассмотрено явление быстрого фотоиндуцированного повышения проводимости фоторецепторной мембраны и его возможные причины. Показано, что процесс фотоокисления липидов не является причиной быстрого повышения проводимости фоторецепторной мембраны диска в ответ на свт. Перекисное окисление липидов вызывает повышение проводимости фоторецепторной мембраны, но при накоплении значительных количеств продуктов окисления. Регенерация родопсина в обесцвеченных дисках при добавлении 11-дис-ретиналя приводит к восстановлению амплитуды фотответа и к уменьшению проводимости фоторецепторной мембраны. Предполагается, что фотоиндуцированное повышение проводимости мембраны диска связано с фотопревращениями молекул родопсина.

Известно, что фоторецепторная мембрана (ФРМ) отличается чрезвычайно высоким содержанием полиненасыщенных жирных кислот. Поэтому липиды ФРМ легко подвергаются перекисному окислению. Длительное и яркое освещение вызывает накопление продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в суспензии ФРМ, а также окисление SH-групп родопсина [1]. С другой стороны, ранее нами показано, что сопротивление ФРМ диска очень велико и составляет $\sim 1-3 \text{ МОм} \cdot \text{см}^2$ [3]. При этом неясно, какова функциональная роль столь высокого сопротивления. Кроме того, было обнаружено, что яркая вспышка света, интенсивность которой существенно превышает физиологический уровень освещенности, вызывает быстрое увеличение проводимости мембраны диска [4]. Это повышение проводимости пропорционально энергии поглощенного света. В связи с этим интересно было выяснить, не связано ли такое повышение проводимости с фотоокислением молекулярных компонентов мембраны.

Материалы и методы

Наружные сегменты палочек быка выделяли в градиенте плотности сахарозы [5]. Затем путем их лизиса в 10-кратном объеме дистиллированной воды и последующего центрифугирования при $100\,000g$ в течение 30 мин получали суспензию дисков, которую добавляли в один из отсеков кюве-

ты, разделенной на две части мембранным фильтром «Sartorius» или «Fluorog», пропитанным раствором азолектина в декане (120 мг/мл). Конечная концентрация родопсина в кювете составляла 0,25 мг/мл. Диск инкубировали в этой кювете при перемешивании в темноте 3—4 ч. Среда инкубации содержала 100 мМ NaCl, 5 мМ MES-буфер, pH 6,0. Разность потенциалов на мембранном фильтре регистрировали неполяризуемыми Ag/AgCl электродами с помощью операционного усилителя LF-355 и запоминающего устройства DL-905 («Data Lab.»). Записи электрических ответов представлены (рис. 3). Полученные данные обрабатывали на вычислительной машине IN-110 («Inter-technique», Франция). Освещение образцов проводили ксеноновой вспышкой со сплошным спектром излучения на основе стробоскопической лампы ИСШ-100-3М (длительность вспышки 10 мксек, энергия 50 Дж) или лазером на итрий-алюминиевом гранате, активированном ионидом, с удвоением частоты на кристалле ниобата лития, энергия вспышки 30 мДж, $\lambda = 532$ нм. ПОЛ индуцировали добавлением прооксидантов— 10 мкМ Fe^{2+} и 200 мкМ аскорбата. Степень окисления определяли по концентрации малонового диальдегида [6]. Через определенные промежутки времени после начала окисления отбирали пробы по 0,5 мл суспензии с концентрацией родопсина 0,25 мг/мл и останавливали окисление добавлением 10^{-4} М ЭДТА и 0,5 мл 50% ТХУ. Затем в каждую пробу добавляли 1 мл 0,8%-ного раствора тиобарбитуровой кислоты (ТБК) и выдерживали смесь 15 мин на кипящей водяной бане. После этого пробы центрифугировали 10 мин при 4000 об/мин. Оптическую плотность супернатанта определяли на спектрофотометре «Specord UV—VIS» (ГДР). $\lambda_{\text{макс}} = 532$ нм, коэффициент экстинкции окрашенного комплекса малонового диальдегида с ТБК $\epsilon_{\text{макс}} = 1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Фотоокисление суспензии НСП проводили в тех же условиях освещения, в которых регистрировался фотопотенциал.

Результаты и обсуждение

ПОЛ в суспензии дисков вызвало заметное повышение проводимости фоторецепторных мембран. На рис. 1, а представлен процесс накопления продуктов ПОЛ в суспензии дисков во время инкубации с прооксидантами в течение часа, на рис. 1, б показано изменение постоянной времени спада фотоответа дисков, вызванное ПОЛ. Из приведенных данных видно, что накопление продуктов ПОЛ в мембране в количестве 10^{-3} М/л, приводящее к уменьшению постоянной времени спада фотопотенциала, сопровождается заметным повышением проводимости мембраны диска.

В следующей серии опытов было определено фотоиндуцированное накопление продуктов ПОЛ в тех же условиях освещения, в которых мы регистрировали ранее [4] существенное фотоиндуцированное повышение проводимости ФРМ (рис. 2). В этих условиях количество образующихся продуктов ПОЛ крайне незначительно. Оно на порядок меньше, чем в случае аскорбат- Fe^{2+} -индуцированного окисления, приводяще-

го к заметному повышению проводимости ФРМ. Следовательно, повышение проводимости ФРМ в ответ на свет непосредственно не связано с фотоокислением липидов. Не исключено, что в основе этого явления лежат индуцированные светом конформационные изменения молекулы родопсина. На это указывает обнаруженная нами связь между регенерацией предварительно обесцвеченного родопсина и восстановлением проводимости ФРМ к исходному уровню. На рис. 3 представлен результат одного из таких опытов. Обесцвеченную суспензию в течение часа инкубировали с 10-кратным избытком 11-цис-ретинала. После этого диски с регенерированным таким образом родопсином встраивали в пропитанный липидами мембранный фильтр и регистрировали фотоответ. Как видно из рис. 3, регенерация родопсина привела к восстановлению высокого сопротивления ФРМ.

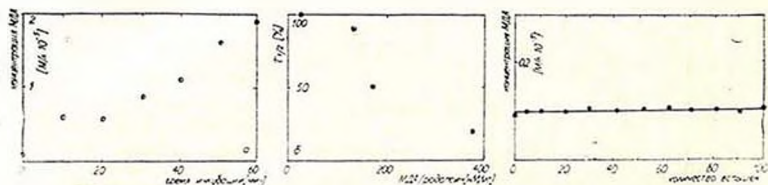


Рис. 1. а. Кинетика накопления малонового диальдегида в суспензии дисков при индукции перекисного окисления липидов системой Fe^{2+} + аскорбат. По оси абсцисс—время инкубации с прооксидантами; по оси ординат—концентрация малонового диальдегида; концентрация родопсина в суспензии 0,25 мг/мл. б. Влияние ПОЛ в ФРМ на кинетику фотопотенциала. По оси абсцисс—количество малонового диальдегида и имоль на 1 мг родопсина; по оси ординат—постоянная времени спада фотопотенциала. Рис. 2. Накопление малонового диальдегида в суспензии дисков при освещении лазерными вспышками. По оси абсцисс—число вспышек; по оси ординат—концентрация малонового диальдегида. Концентрация родопсина в суспензии 0,25 мг/мл

В другой серии опытов обесцвечивали предварительно встроенные в мембранный фильтр диски. Затем к кювету добавляли 10-кратный избыток 11-цис-ретинала и через 1 ч регистрировали ответ на свет. И в этом случае регенерация родопсина приводила к замедлению спада фотоответа, то есть к уменьшению проводимости ФРМ.

Таким образом, фотоиндуцированное увеличение проводимости ФРМ может быть связано с конформационными перестройками в родопсине или с нарушениями в ней родопсин-липидных взаимодействий.

Ранее нами было показано, что в ответ на мощную лазерную вспышку происходит заметное увеличение проводимости мембран фоторецепторных дисков, которое пропорционально энергии поглощенного света и концентрации обесцвеченного родопсина. В физиологических условиях, когда палочка работает в диапазоне освещенностей 1—100 квантов/с и диск поглощает не более одного кванта, проводимость мембраны практически не меняется. Поэтому увеличение проводимости мембраны диска

в ответ на мощную вспышку, по-видимому, не играет существенной роли в физиологическом механизме фоторецепции.

Вместе с тем, полученные данные свидетельствуют о развитии в зрительной клетке патологического процесса фотоповреждения. Как было показано, в основе этого процесса лежат реакции фотосенсибилизированного свободнорадикального окисления белков и липидов ФРМ [1]. Однако наблюдаемые нами изменения проводимости, по-видимому, не связаны с фотоокислением, поскольку при освещении короткой лазерной вспышкой практически не наблюдается появления продуктов ПОЛ (рис. 2). В то же время накопление большого количества таких продуктов приводит к повышению проводимости мембраны фоторецепторного диска, но по другому механизму (рис. 1).

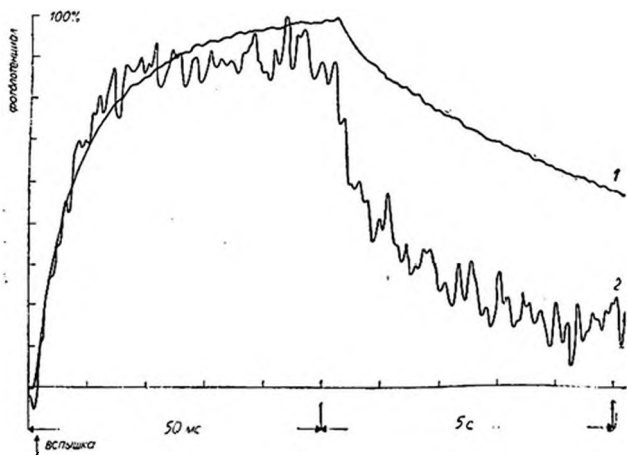


Рис. 3. Восстановление проводимости фоторецепторной мембраны диска в результате регенерации родопсина при добавлении 11-цис-ретинала (родопсин обесцвечивали, затем добавляли 11-цис-ретинал и инкубировали 1 ч). Фотоответ дисков до обесцвечивания не представлен, он близок к кривой 1. Кривая 1—ответ на 1 вспышку после регенерации; кривая 2—ответ на 10-ую вспышку

Изменения проводимости в ФРМ диска палочек вряд ли имеют функциональное значение. Однако в колбочках, где нет дисков, а плазматическая мембрана содержит родопсин, фотоокисление может приводить к повышению проводимости. Фотоповреждение, в частности увеличение проводимости родопсинсодержащей мембраны, приводило бы к снижению отношения сигнал/шум в фоторецепторе. Предельная светочувствительность палочек требует специальных механизмов выделения сигнала из шума. Возможно, одним из таких механизмов, возникших в ходе эволюции, было разделение в палочках фоторецепторной и плазматических мембран.

EFFECT OF LIPID PEROXIDATION ON THE PHOTORECEPTOR DISC MEMBRANE CONDUCTION

REBRIK T. I., KALAMKAROV G. R., OSTROVSKY M. A.

Institute of Chemical Physics, USSR, Acad. Sci., Moscow

The phenomenon of light-induced increase of the photoreceptor disc membrane conductivity has been studied. The process of the lipid photooxidation is shown not to be the cause of the light-induced conductivity growth. Treating of bleached discs with 11-cis retinal leads to the rhodopsin regeneration and membrane conductivity decrease. This points to the interrelation of light-induced membrane conductivity changes with rhodopsin molecule photoconversion.

ЛИТЕРАТУРА

1. Положева Н. Д., Федорович И. Б., Островский М. А., Эмануэль Н. М. Биофизика т. 26, № 3, с. 398—403, 1981.
2. Kagan V. E., Shvedova A. A., Novikov K. N., Kozlov Yu. P. Biochim. et biophys., acta, v. 330, № 1, p. 76—79, 1973.
3. Ребрик Т. И., Каламкаргов Г. Р., Островский М. А. Биофизика, т. 31, № 6, с. 985—989, 1986.
4. Drachev L. A., Kalamkarov G. P., Kaulen A. D., Ostrovsky M. A., Skulachev V. P. Eur. J. Biochem., v. 117, № 3, p. 471—481, 1981.
5. Шевченко Т. Ф., Каламкаргов Г. Р., Островский М. А. Биофизика, т. 25, № 3, с. 462—468, 1980.
6. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах, М.: Наука, 1972.

Поступила 7. I 1987



КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 577.7+577.3+615.833

ИЗУЧЕНИЕ ОПИАТНОЙ РЕЦЕПТОРНОЙ СИСТЕМЫ В
ОБОГАЩЕННЫХ ФРАКЦИЯХ ГЛИИ И НЕЙРОНОВ

АБУТИДЗЕ К. Д., СОЛОМОНΙΑ Р. О., МИКЕЛАДЗЕ Д. Г.

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

В настоящее время при исследовании нервной ткани местом действия гормонов и многих гормональных веществ считают глиальные клетки [1]. Глиальные клетки *in vivo* и в культуре в значительной мере определяют развитие нейронов, влияют на их дифференциацию [2]. Имеется множество данных, свидетельствующих о присутствии рецепторных систем нейротрансмиттеров на глиальных клетках. В астроглии, выделенной из мозга быка [3], крыс [4], а также в культуре глиальных клеток [5] были обнаружены холинорецепторы мускаринового типа. Кроме того, в глиальных клетках головного мозга крыс был найден α -адренергический рецептор [6]. На основании ряда экспериментов было установлено, что важная роль в осуществлении нейронально-глиального взаимодействия принадлежит аденилатциклазной системе, сопряженной с β -адренергическим рецептором [7].

Наши исследования были направлены на изучение системы опиатных рецепторов головного мозга крыс. Как известно, опиоидным пептидам и соответствующим рецепторным системам отводится одно из ведущих мест в механизме анальгезии, интенсификации и стимуляции памяти, в возникновении эйфорических состояний, в эффектах консолидации и расслаблении воли [8]. Еще в 1969 г. Ройтбаком было высказано предположение, что нейроглия является мишенью для действия морфина и других анальгетиков, а также принимает участие в механизме возникновения болевых ощущений [9]. Целью настоящей работы явилось изучение системы опиатных рецепторов в нейрональных и глиальных клетках, выделенных из мозга крыс.

В опытах были использованы белые крысы массой 120—150 г. Выделение обогащенных фракций глии и нейронов осуществляли по методу Blomstrand, Hamberger [10] с некоторыми модификациями. Головной мозг крыс (без мозжечка) после механического размельчения в буфере, содержащем 20%-ный фикола, 20 мМ HEPES (рН 7,4) про-

пускали через сита с размерами пор 500, 100, 75, 50 микрон. Затем суспензию насаивали на линейный градиент фикола-сахарозы (10%-, 20%-, 30%-ный фикола, 2 М сахароза) и центрифугировали при 50000g в течение 90 мин. По данным световой микроскопии, обогащенная фракция глальных клеток концентрировалась на границе фаз 10—20% фикола, в то время как фракция нейронов находилась на границе фаз 30%-ного фикола—2 М сахарозы. Фракции глии и нейронов отмывали от высокой концентрации фикола и сахарозы 2-кратным центрифугированием в течение 40 мин при 50000g в буфере, содержащем 50 мМ HEPES (pH 7.4): 1 мМ л-метилсульфонилфторид (PMSF), 1 мМ ЭДТА. В зависимости от цели опыта использовали клеточную суспензию или гомогенат клеток в вышеуказанном буфере. Количество опиятных рецепторов определяли по разнице между общим и неспецифическим связыванием [^3H]налоксона с мембранами (43 К_d/мМ CGA). Пробы в объеме 1 мл содержали 50 мМ HEPES (pH 7.4), 10 нМ [^3H]налоксона и приблизительно 1 мг белка. Для определения неспецифического связывания в пробы добавляли немеченый налоксон в концентрации 10 мМ. Инкубация продолжалась 60 мин при 4°. Пробы фильтровали на GF/B фильтрах и просчитывали на жидкостно-сцинтилляционном спектрометре (Intertechnique® SL-4000, Франция). Белок определяли по Bradford [11]. Подтипы опиятных рецепторов определяли с помощью специфических лигандов: леворфанола—агониста μ -рецептора, D-Ala-Leu-энкефалина (DALA)—агониста δ -рецептора [12].

Для изучения вопроса взаимодействия лигандов с нервными клетками была определена временная зависимость специфического связывания. Из рисунка (а) видно, что продолжительная инкубация нейронов (до 60 мин) при 37° не приводила к повышению удельной радиоактивности в пересчете на мг белка. Максимального связывания [^3H]налоксона достигали при инкубации в течение 30 мин, и дальнейшее продолжение инкубирования не приводило к повышению включения. В отличие от этого связывание [^3H]налоксона с нейронами, инкубированными при 4°, постепенно возрастало и достигало максимума на 60-й мин. Следует отметить, что удельная радиоактивность при инкубации в течение 60 мин при 4° превышает связывание [^3H]налоксона с нейронами, инкубированными при 37°, почти в два раза. Это может свидетельствовать о том, что продолжительная инкубация нейронов при 37° приводит к деструкции белков рецепторного комплекса и изменению его надмолекулярной организации, в результате чего происходит переориентация мембранных белков и их частичная инактивация. Интересно отметить, что подобные температурные изменения не происходят в глальных клетках, что указывает на иную организацию глальных рецепторов. Кроме того, равновесие между свободным лигандом и лиганд-рецепторным комплексом в глальных клетках достигается быстрее, чем в нейронах, что свидетельствует о неидентичности организации опиятных рецепторов в этих клетках (рис. б).

Изучение распределения опиатных рецепторов выявило наличие в обогащенных фракциях глии μ -рецепторов, на долю которых приходилось 73—75% связывания от всего меченого [^3H]налоксона, тогда как содержание κ -рецепторов составляло 23—25%. В нейрональной фракции количество μ -рецепторов было равно 48—50%, а κ -рецепторов 46—48%. Использование специфического лиганда DALA выявило практически полное отсутствие δ -рецепторов. Так как в процессе получения клеточной фракции из-за механического разрушения полностью теряются отростки клеток, можно предположить, что этот подтип опиатных рецепторов локализован на мембранах нервных окончаний.

В экспериментах по связыванию при различных концентрациях меченого налоксона (0,5—20 нМ) в координатах Скэтчарда была получена двуфазная кривая. Этот факт объясняется присутствием двух мест связывания с низкой и высокой степенью сродства.

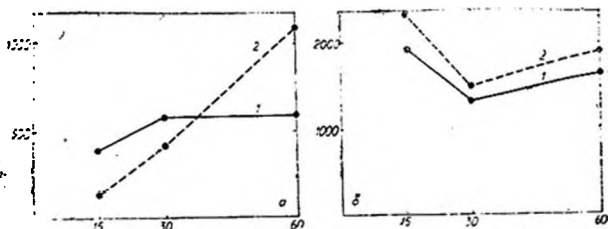


Рис. Распределение связывания [^3H]налоксона в нейрональной (а) и глиальной (б) фракциях: 1—при 37°, 2—при 4°

Кинетические константы для глии в случае рецептора с высоким сродством к лиганду равны $B_{\text{max}}=47$ фмоль/мг, $K_d=0,57$ нМ. Во фракции нейронов соответствующие константы равны $B_{\text{max}}=43$ фмоль/мг, $K_d=0,63$ нМ. Таким образом, полученные нами данные указывают на наличие высокоспецифической системы опиатных рецепторов как в нейрональных, так и в глиальных клетках.

Обнаружение опиатной системы рецепторов в глиальных клетках указывает на возможность участия глиальной системы в процессах, опосредованных опиоидными пептидами, и может служить отправной точкой для дальнейшего изучения их функционального значения. В настоящее время предполагается, что опиатные рецепторы сопряжены с GTP-связывающим Gi-белком, подавляющим активность аденилатциклазы [13]. Поскольку метаболическая активность глиальных клеток зависит от внутриклеточного уровня cAMP, ингибирование аденилатциклазы этих клеток может привести к определенным биохимическим сдвигам. Из 300 фосфорилирующихся в глиальных клетках белков 7 являются чувствительными к колебаниям cAMP [14]. Эти белки расположены в плазматических мембранах, цитоплазме, митохондриях и ядре и их

cAMP-зависимое фосфорилирование может играть ключевую роль в метаболизме глияльных клеток.

Таким образом, вышеприведенные данные показывают, что глияльные клетки содержат в большом количестве опиатные рецепторы. Эти рецепторы проявляют максимальную связывающую активность к лигандам μ - и κ -типов. Временная и температурная зависимость связывания [^3H]налоксона указывает на различные свойства опиатных рецепторов в глияльных и нейрональных клетках.

Авторы выражают благодарность член-корр. АН ГССР, проф. А. И. Ройтбаку за предложенную тему и ценные указания, а также проф. И. К. Сванидзе за консультации и обсуждение в проведении морфологических экспериментов.

STUDY OF OPIOID RECEPTOR SYSTEM IN ENRICHED GLIAL & NEURONAL FRACTIONS

ABUTIDZE K. D., SOLOMONIA R. O., MIKELADZE D. G.

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

A high number of opioid receptors is present in glial cells. These receptors reveal specific binding activity for ligands of μ - and κ types. Temporary and temperature $^3\text{H}^+$ -naloxone binding-dependence shows different properties of opioid receptors in glial and neuronal cells.

ЛИТЕРАТУРА

1. Henn F. A., Oderfeld-Nowak B., Roskoski R. *Neurosci. Abstr.*, v. 5, № 1, p. 590, 1979.
2. Sensenbrenner M., Mandel P. *Exp. Cell. Res.*, v. 87, № 1, p. 159—167, 1974.
3. Hurko O. *Arch. Biochem. and Biophys.*, v. 190, № 2, p. 434—440, 1978.
4. Kayaalp S. O., Neff N. H. *Brain Res.*, v. 196, № 2, p. 429—436, 1980.
5. Repke H., Maderpack K. *Brain Res.*, v. 232, № 1, p. 205—212, 1982.
6. Levitzki A. *Cellular Receptors for Hormones and Neurotransmitters* J., N. Y., Wiley & Sons, Chichester, 1980.
7. Maderpack K., Fajszl C. *Develop. Brain Res.*, v. 252, № 3, p. 251—257, 1983.
8. Simon E. J. *Handbook of Neurochemistry* (ed. A. Lajtha), chapter 12, p. 331—352, N. Y., Plenum Press, 1984.
9. Rottbak A. I. *Acta Biol. Exp.*, v. 29, № 1, p. 125—134, 1969.
10. Blomstrand C., Hamberger A. J. *J. Neurochem.*, v. 16, № 1, p. 1401—1407, 1969.
11. Bradford M. M. *Anal. Biochem.*, v. 72, № 1, p. 243—254, 1976.
12. Simon J., Benyhe S., Abutidze K., Borsodi A., Szucs M., Toth G., Wollemann M. J. *Neurochem.*, v. 46, № 3, p. 695—701, 1986.
13. Enomoto, Asakawa T. *FEBS Lett.*, v. 7, № 2, p. 233—239, 1984.
14. Ehrlich Y. H. *Handbook of Neurochemistry* (ed. A. Lajtha), chapter 20, p. 541—574, N. Y., Plenum Press, 1984.

Поступила 5. I 1987



УДК 612.822.1

ВЛИЯНИЕ ДЕЛЬТА-СОН ИНДУЦИРУЮЩЕГО ПЕПТИДА НА СОДЕРЖАНИЕ ГАМК, ГЛУТАМАТА И АКТИВНОСТЬ ГЛУТАМАТДЕКАРБОКСИЛАЗЫ В ОТДЕЛАХ МОЗГА КРЫС

*МЕНДЖЕРИЦКИЙ А. М., МАКЛЕЦОВА М. Г., КАРПУХИНА И. Ю.

*НИИ нейрокибернетики и НИИ биологии РГУ им. М. А. Суслова

Поиски гуморальных факторов сна привели к открытию нейропептида, который получил название Δ -сон индуцирующего пептида или пептида дельта-сна (ПДС). Его введение животным приводит к развитию сонноподобного состояния с индукцией медленных волн Δ -диапазона [1]. Установлена структура ПДС и произведен его синтез [2, 3]. При интракнистеральном введении кроликам или крысам как природного, так и синтетического пептида происходит значительное увеличение процента колебаний Δ -диапазона и веретенообразных ритмов. Действие пептида достоверно проявляется через 15—20 мин после начала введения и достигает максимума через 40—60 мин [4]. Методом радиоиммунного анализа установлено сравнительно равномерное распределение ПДС во всех отделах и структурах мозга, что привело к заключению об отсутствии определенного участка мозга, с которым связана функция ПДС [5].

Многочисленные исследования последних лет показали, что влияние ПДС на фазы сна не является его единственной функцией. Большинство авторов относят ПДС к классу нейромодуляторов [5—7]. ПДС оказывает определенное влияние на метаболизм нейромедиаторов в головном мозгу. При его интракнистеральном введении в дозе от 1 до 20 мкг в мозгу крыс увеличивается концентрация серотонина, наблюдается активация МАО типа А с субстратом серотонином и ингибирование МАО типа Б, изменяется метаболизм АХ [8], установлен антигистаминный эффект ПДС [9].

В литературе отсутствуют сведения о взаимоотношении ПДС с тормозным медиатором ЦНС—ГАМК, хотя известно, что при естественном сне содержание ГАМК увеличивается [10].

Изучали действие ПДС при его интракнистеральном введении на активность системы ГАМК в мозгу крыс, исследовали содержание

ГАМК, глутамата и активность глутаматдекарбоксилазы (ГДК, КФ 4.1.1.16).

Белым крысам-самцам массой 150—176 г в третий желудочек мозга стереотаксически вводили ПДС в дозе 15 нмоль/кг массы животного. Выбор дозы определялся как собственными предварительными экспериментами, так и литературными данными [6]. Контролем служили животные, которым интрацистернально вводили физиологический раствор.

Через 60 мин после введения ПДС в 4-х отделах мозга определяли содержание ГАМК, глутамата и активность ГДК. Содержание аминокислот определяли методом высоковольтного электрофореза [11], активность ГДК—по приросту ГАМК [12]. Данные обработаны статистически [13].

Результаты определения состояния системы ГАМК в больших полушариях головного мозга, среднем, продолговатом мозгу и мозжечке через 60 мин после интрацистернального введения ПДС представлены в таблице. По данным литературы, в мозгу интактных крыс содержится 2—4 мкмоль ГАМК, 9—12 мкмоль глутамата [14]. В наших опытах после интрацистернального введения физиологического раствора содержание исследованных компонентов не отличается от исходных величин.

Таблица

Содержание ГАМК, глутамата и активность глутаматдекарбоксилазы в мозгу крыс при интрацистернальном введении Δ -сеп индуцирующего пептида (ГАМК и глутамат в мкмоль/г ткани, ГДК в мкмоль ГАМК/г/ч)

Отделы мозга	ГАМК	Глутамат	ГДК
Большие полушария контроль опыт	2,44 $\pm$ 0,11 3,96 $\pm$ 0,28*	10,41 $\pm$ 0,82 18,49 $\pm$ 3,21**	8,19 $\pm$ 0,31 18,96 $\pm$ 1,42*
Средний мозг контроль опыт	3,04 $\pm$ 0,37 3,68 $\pm$ 0,28	9,98 $\pm$ 0,38 11,93 $\pm$ 2,95	12,39 $\pm$ 1,53 6,33 $\pm$ 0,49
Продолговатый мозг контроль опыт	2,57 $\pm$ 0,14 2,64 $\pm$ 0,29	10,39 $\pm$ 0,21 11,69 $\pm$ 0,90	8,43 $\pm$ 0,79 9,97 $\pm$ 0,45
Мозжечок контроль опыт	2,31 $\pm$ 0,25 2,38 $\pm$ 0,31	9,82 $\pm$ 0,17 8,63 $\pm$ 0,56	10,32 $\pm$ 0,92 7,83 $\pm$ 0,75

Примечание. * $p < 0,001$; ** $p < 0,01$.

В больших полушариях головного мозга после интрацистернального введения ПДС содержание ГАМК возрастает на 62%, глутамата—на 78%, а активность ГДК—на 132%. Такое состояние системы ГАМК в больших полушариях головного мозга согласуется с известными взаимоотношениями компонентов системы и их связью с другими метаболическими путями. Повышение содержания глутамата активирует ГДК, что является одной из причин возрастания концентрации ГАМК и развития тормозного процесса. В то же время одновременное высокое содер-

жание ГАМК и глутамата, несомненно, связано со снижением их использования в энергетических процессах. В митохондриях мозга глутамат активно дезаминируется и α -кетоглутарат включается в цикл трикарбоновых кислот. ГАМК через шунтовый механизм метаболизма также включается в цикл Кребса. Накопление их в мозгу при действии ПДС согласуется с тем, что в медленноволновую фазу сна снижается обмен веществ в головном мозгу, потребление кислорода мозгом, уменьшается частота дыхания и газообмен легких [15].

Необходимо отметить, что генерация Δ -волновой активности, стимулируемая в наших опытах пептидом, наблюдается в коре больших полушарий головного мозга. Одной из причин появления характерных для первой фазы сна медленных волн и веретен служит активация серотонинергической ретикулярной формации, расположенной в подкорковых областях мозга. В таблице показано, что в среднем мозгу в контроле содержание ГАМК и активность ГДК выше, чем в коре больших полушарий. Содержание ГАМК и глутамата и активность ГДК в продолговатом мозгу, мозжечке и больших полушариях одинаковы. Введение пептида приводит к некоторому увеличению содержания ГАМК и глутамата и значительному снижению активности ГДК в среднем мозгу. Это указывает на иной, чем в коре больших полушарий, способ поддержания определенного уровня ГАМК в среднем мозгу. В продолговатом мозгу и мозжечке изменений в системе ГАМК при интрадистернальном введении ПДС практически не происходит.

Проведенные исследования подтверждают предположение о возможной нейромодуляторной функции ПДС, осуществляющего свое действие через системы нейромедиаторов.

Авторы выражают благодарность И. И. Михалевой (Институт биорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР) за предоставленный препарат ПДС.

EFFECT OF DELTA SLEEP-INDUCING PEPTIDE (DSIP) ON THE AMOUNT OF GABA, GLUTAMATE AND THE ACTIVITY OF GLUTAMATE DECARBOXYLASE IN VARIOUS RAT BRAIN AREAS

*MENDJERITSKY A. M., MAKLETZOVA M. G., KARPUKHINA I. Yu.

*Research Institute of Neurocybernetics,
Research Institute of Biology, Rostov State University

It was demonstrated that i. v. injection of DSIP increases the amounts of GABA, glutamate and the activity of glutamate decarboxylase in the cerebellum, while in midbrain increase in the amounts of GABA and glutamate is accompanied with decrease in the activity of glutamate decarboxylase.

These results corroborate the supposition about possible neuromodulatory function of DSIP, which acts through neurotransmitters systems.

ЛИТЕРАТУРА

1. Монье М., Шенберг Г.—В кн.: Механизмы деятельности головного мозга, с. 209—221, Тбилиси, Медицина, 1975.
2. Monnier M., Dubber L., Gachter R., Schoenenberger G. *Neurosci. Lett.*, v. 6, p. 9, 1977.
3. Михалева И. И., Саргсян А. С., Балашова Т. А., Дешко Т. Н., Нобисе И. Р., Ефремов Е. С., Иванов В. Т.—В кн.: IV Всесоюз. симпозиум по целенаправленному изысканию физиологически активных веществ. Тезисы докл. (Рига, 1980), с. 5, Рига, 1981.
4. Медведев В. И., Бахарев В. Д. Журн. эволюц. биохимии и физиологии, т. 15, № 4, с. 379—384, 1979.
5. Рожанец В. В., Юхананов Р. Ю., Чижевская М. А., Наволоцкая Е. В. *Нейрохимия*, т. 2, № 4, с. 353—363, 1983.
6. Ашмарин И. П. *Вопр. мед. химии*, т. 30, № 3, с. 2—7, 1984.
7. Бахарев В. Д., Саргсян А. С., Михалева И. И. *Нейрохимия*, т. 2, № 3, с. 272—279, 1983.
8. Доведова Е. А., Попова Н. С., Качалова Л. М. *Нейрохимия*, т. 2, № 2, с. 138—147, 1983.
9. Коплик Е. В., Хованская Т. П.—В сб.: *Химия белков и пептидов. Тезисы докл. VI Всесоюз. симпозиума* (Рига, 1983), с. 407—408, Рига, 1983.
10. Honda J., Mandel P. J. *Neurochem.*, v. 12, p. 455—460, 1965.
11. Young A. B., Snyder S. H. J. *Neurochem.*, v. 21, p. 387—396, 1973.
12. Roberts E., Frankel S. J. *Biol. Chem.*, v. 183, p. 789—795, 1951.
13. Бейли Н. *Статистические методы в биологии*. М., ИЛ, 1962.
14. Сытинский И. А. Гамма-аминомасляная кислота—медиатор торможения, Л., Наука, 1977.
15. *Физиология человека* (под ред. Р. Шмидта, Г. М. Тевса), т. 1, с. 231—243, М., Мир, 1985.

Поступила 29. III 1987



УДК 547.952:547.963.3:591.481.1

БЕЛКИ И РНК В НЕЙРОНАХ И ГЛИОЦИТАХ ДОРЗАЛЬНОГО ЯДРА ШВА ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫ ПРИ СНЕ И ДЛИТЕЛЬНОМ ЕГО ЛИШЕНИИ В ЦИЛИНДРИЧЕСКОМ ТРЕТБАНЕ

КРИВЕНКО Н. Е., МАЛИКОВ У. М., ПАНОВ А. Н.

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

Функционирование нейрона при различных состояниях, в частности при сне и его депривации [1, 2], неразрывно связано с изменением в нем интенсивности синтеза белков, что отражается и в количественных сдвигах их содержания. При этом в зависимости от метаболизма белков меняется также количество РНК [3, 4].

При изучении нейрохимических коррелятов сна было установлено [2, 5], что 20-минутный сон приводил к накоплению в головном мозгу крыс РНК в перинейрональных глиоцитах супраоптического и красного ядер, а также синего пятна; содержание РНК повышалось и в цитоплазме нейронов красного ядра. При этом суммарное содержание белков, значительно (приблизительно на 30% от величины при бодрствовании) увеличиваясь наряду с количеством РНК в глиоцитах супраоптического ядра, несколько снижалось (приблизительно на 15%) в цитоплазме нейронов синего пятна и красного ядра.

К числу ядер, участвующих в организации процесса сна, принадлежит дорзальное ядро шва (ДЯШ). Ранее было показано [6], что нарушения процесса сна оказывают существенное влияние на белковый и нуклеиновый метаболизм в клетках ДЯШ. Так, при полном лишении сна и вращении в цилиндрическом третбане в течение 24 и 48 ч выявилось резкое увеличение количества белков и РНК в первый период депривации, сменявшееся затем таким же выраженным его снижением, особенно белков. Целью нашей работы было сравнение сдвигов содержания белков и РНК в клетках ДЯШ при сне с результатами влияния еще более продолжительного лишения сна—96-часового. Следует заметить, что дальнейшее увеличение продолжительности депривации сна при вращении в третбане могло привести к гибели части животных [7].

Опыты проводили на крысах-самцах линии *Wistar* массой около 200 г. Одну группу животных исследовали при естественном сне, а дру-

гую после 96-часового вращения в третбане. Одновременно с подопытными декапитуировали контрольных, находившихся в бодрствующем состоянии. При изучении сна крыс декапитуировали после непрерывного сна продолжительностью 20—25 мин. В опытах в третбане животных помещали попарно в отсеки цилиндра с диаметром 50 см; скорость вращения была 2, 3 об./мин [7]. В отсеках были подвешены поилки и насыпан сухой корм. Каждые 12 ч крыс извлекали из третбана на 30 мин и давали им мягкий корм и воду. После декапитации мозг быстро извлекали, удаляли большие полушария и мозжечок, а стволочную часть фиксировали в реактиве Бродского (10%-ный формалин—96%-ный этанол—ледяная уксусная кислота; 3:1:0,3); обезжизняли и парафинировали пробы обычным гистологическим методом; готовили срезы толщиной 7 мкм. Срезы помещали на стекло, депарафинировали и окрашивали галлоцанин-хромовыми квасцами на нуклеиновые кислоты по Einarson в модификации Bergbe и соавт. [8] и амидо-черным 10 Б на общие белки [9]. Измерения оптической плотности окрашенных клеток проводили на микрофотометре МУФ-5 при 595 нм для нуклеиновых кислот и при 620 нм для белков. Размер зонда позволял измерять интенсивность окраски в отдельных участках цитоплазмы нейронов: глиоциты же полностью попадали в площадь зонда. Таким образом, в нейронах определяли цитоплазматические РНК и белки, а в глиоцитах—ядерные и цитоплазматические белки (суммарно) и общее количество РНК и ДНК. Так как количество ДНК в определенных клетках практически постоянно у животных одного вида и не зависит от функционального состояния клетки [3], все изменения в глиоцитах можно отнести к РНК. Оптическая плотность окрашенных клеток пропорциональна концентрации исследуемых веществ. Определив соответствующие линейные размеры и вычислив величины объема цитоплазмы нейронов или всего тела глиоцитов, умножением величины концентрации (оптической плотности) на объем устанавливали содержание РНК и белков в одной клетке [10].

В табл. 1 приведены данные по объемам глиоцитов и цитоплазмы нейронов ДЯШ крысы, оптической плотности клеток и содержанию в них РНК и белков в результате 20—25-минутного сна. Обращает на себя внимание одинаковая направленность в сторону снижения всех показателей. Различия объемов цитоплазмы нейронов и концентрации РНК в нейронах и глиоцитах между опытом и контролем были не достоверны ($p > 0,05$). Однако в результате одинаковой направленности сдвигов снижение содержания и РНК и белков на 1 клетку оказалось значительным по величине (особенно белков в глиоцитах—на 23%). Такие данные являются, вероятно, следствием общего снижения функциональной активности нейронов этого центрального серотонинергического ядра в период сна [11, 12]. В общем эти сдвиги в клетках ДЯШ при сне отличаются от описанных в случае других исследованных ядер (см. выше).

В качестве одного из подходов к изучению нейробиохимических при-

чин необходимости регулярных периодов сна у высших позвоночных, а также явлений, имеющих место при определенных экстремальных условиях, служат исследования результатов тех или других видов искусственной бессонницы, которую, в известной мере, можно рассматривать как состояние затянувшегося активного бодрствования [2]. Методом возможно полного лишения сна различной продолжительности и является вращение в третбане. Этот метод имеет ряд недостатков, одним из которых является действие такого фактора, как вынужденная, почти непрерывная многочасовая (в течение 4 суток в наших опытах) двигательная активность, которая, собственно, и препятствует погружению животного в сон. Возможно некоторое влияние и вестибулярного раздражения от постоянного вращения, хотя и медленного. Тем не менее, то, что депривация сна в третбане в наших условиях не истощала нейроны, связанные с осуществлением акта движения, подтверждается результатами исследований Маликова [13], в которых не было выявлено изменений белкового и нуклеинового метаболизма в нейронах поясничного утолщения спинного мозга крыс, лишаемых сна во вращающемся третбане.

Таблица 1

Объемы перинейрональных глиоцитов и цитоплазмы нейронов дорзального ядра шва мозга крысы, оптическая плотность клеток и содержание в них нуклеиновых кислот и белков при естественном сне продолжительностью 20—25 мин

Тип клеток	Группа	Объемы клеток (мкм ³)	РНК		Белки	
			Оптическая плотность ($\times 100$)	Содержание (усл. ед.)	Оптическая плотность ($\times 100$)	Содержание (усл. ед.)
Нейроны	Контроль	725 $\pm$ 34	33,0 $\pm$ 0,9	239 $\pm$ 13	59,0 $\pm$ 1,1	428 $\pm$ 22
	Опыт	652 $\pm$ 35	31,0 $\pm$ 0,9	202 $\pm$ 12	53,0 $\pm$ 1,3	346 $\pm$ 20
	Разница, в %	-10	-6	<0,02 -15	<0,001 -10	<0,01 -19
Глиоциты	Контроль	39,0 $\pm$ 1,2	22,0 $\pm$ 0,8	8,6 $\pm$ 0,4	56,0 $\pm$ 1,4	22,0 $\pm$ 1,0
	Опыт	35,0 $\pm$ 1,1	21,0 $\pm$ 0,8	7,4 $\pm$ 0,4	47,0 $\pm$ 0,8	17,0 $\pm$ 0,6
	Разница, в %	p<0,02 -10	-5	<0,05 -14	<0,001 -16	<0,001 -23

Как следует из данных, приведенных в табл. 2, 96-часовое лишение крыс сна сопровождалось уменьшением объема цитоплазмы нейронов ДЯШ (на 12%), тогда как объем глиоцитов не отличался от величины при бодрствовании. Концентрация РНК была на уровне, характерном для бодрствования, как в цитоплазме нейронов, так и в глиоцитах, а концентрация белков немного, но достоверно уменьшалась в глиоцитах (на 10%). В цитоплазме нейронов содержание (на 1 клетку) как РНК, так и белков, снижалось; в глиоцитах же достоверных различий с контролем обнаружено не было.

Таким образом, в нейронах ДЯШ как при сне, так и при продолжительном его лишении, содержание таких важнейших компонентов клетки, как РНК и белки, изменялось примерно одинаково не только

по направленности, но и по величине. Другими словами, противоположные по поведенческим критериям состояния характеризовались одним и тем же метаболическим результатом. Однако рассмотрение нейрональных взаимоотношений свидетельствует о том, что такое сходство вызывалось, вероятно, различными причинами и являлось следствием разных процессов. Если при сне направленность изменений в нейронах и глиоцитах ДЯШ была одинаковой и отражала общее градуальное

Таблица 2

Объемы глиоцитов и цитоплазмы нейронов дорзального ядра шва мозга крысы, оптическая плотность клеток и содержание в них нуклеиновых кислот и белков после полного лишения сна в цилиндрическом третбане в течение 96 ч

Тип клеток	Группа	Объемы клеток (мм ³)	РНК		Белки	
			Оптическая плотность (×100)	Содержание (усл. ед.)	Оптическая плотность (×100)	Содержание (усл. ед.)
Нейроны	Контроль	559±29	40,0±1,1	224±13	90,0±1,5	503±27
	Опыт	492±27	37,0±1,3	182±12	84,0±1,3	413±24
	р	<0,01	—	<0,02	—	<0,02
	Разница, в %	-12	-7	-19	-7	-18
Глиоциты	Контроль	46,0±1,2	31,0±1,1	14,0±0,6	91,0±1,6	42,0±1,3
	Опыт	48,0±1,5	31,0±1,1	15,0±0,5	82,0±1,5	39,0±1,5
	р	—	—	—	<0,001	—
	Разница, в %	+4	0	+7	-10	-7

снижение активности этого ядра, то при лишении сна (путем вращения в третбане), когда становились невозможными периодические «отключения» нейронов ДЯШ, трофическая деятельность перинейрональной глии была особенно важна для поддержания работоспособности нейронов; содержание РНК и белков в ней и не отличалось от уровня при активном бодрствовании, что может свидетельствовать о высокой метаболической активности нейроглии в этот период [3, 10, 14].

THE PROTEIN AND RNA CONTENT IN NEURONS AND GLIOCYTES OF THE RAT NUCLEUS RAPHE DORSALIS DURING THE SLEEP AND AFTER PROLONGED SLEEP DEPRIVATION IN A CYLINDRIC TRETBAHN

KRIVENKO N. E., MALIKOV U. M., PANOV A. N.

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

The content of total proteins and RNA in the rat brain nucleus raphe dorsalis neuron cytoplasm and perineuronal gliocytes during the sleep and immediately after 96-h. sleep deprivation in a rotating cylindric tretbahn has been studied by the cytospectrophotometric method. It was revealed that the sleep during 20—25 min led to some decrease

of the protein and RNA content in cells under study.—The RNA and protein content in the neuron cytoplasm after sleep deprivation was also reduced, whereas their content in the gliocytes was the same as during wakefulness.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Oswald J.* New Scientist, v. 46, p. 170—172, 1970.
2. Демин Н. Н., Козан А. Б., Моисеева Н. Н. Нейрофизиология и нейрохимия сна. Л., Наука, 1978.
3. Бродский В. Я. Трофика клетки, М., Наука, 1966.
4. *Giuditta A.*—In: Biochemical correlates of brain structure and function (ed. A.N. Davison), L.—N. Y.—San Francisco, Academic Press, p. 293—337, 1977.
5. Демин Н. Н., Маликов У. М., Рубинская Н. А. Физиол. журн. СССР, т. 66, с. 1626—1631, 1980.
6. Маликов У. М., Панов А. Н. Физиол. журн. СССР, т. 67, с. 1506—1510, 1981.
7. Покровский А. А., Малахов Н. Е., Кишманова О. Д. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 63, № 6, с. 123—125, 1967.
8. *Berube G. R., Powers M. M., Kerkay J., Clark G.* Stain Technol., v. 41, p. 73—81, 1966.
9. *Geyer G.* Acta histochem., B. 10, S. 286—292, 1960.
10. Певанскр Л. З. Функциональная биохимия нейроглии, Л., Наука, 1972.
11. *McGinty D. J., Harper R. M.* Brain Res., v. 101, p. 569—575, 1976.
12. *Puizillout J. J., Gaudin-Chazal G., Daszuta A., Seiffitz N., Ternoux J. P.* J. Physiol. (Paris), v. 75, p. 531—537, 1979.
13. Маликов У. М. Цитология, т. 22, с. 666—669, 1980.
14. Гейнисман Ю. Я. Структурные и метаболические проявления функции нейрона. М., Наука, 1974.

Поступила 14. III 1987



УДК 547.963.3

ПОЛУЧЕНИЕ КЛОНОТЕКИ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК
(БАНКА КЛОНОВ), СОДЕРЖАЩИХ НУКЛЕОТИДНЫЕ
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ мРНК, СПЕЦИФИЧНЫЕ К
БЕЛКУ NSE ИЗ МОЗГА КРЫСЫ

СКОБЕЛЕВА Н. А., ЗАХАРЯН Р. А., НАЗАРЯН К. Б., КАЗАРЯН Б. А.

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР, Ереван

Как известно, нейрон-специфическая енолаза (2-фосфо-D-глицерат гидролаза КФ 4.2.1.11)—NSE является молекулярным маркером для дифференциации нейронов [1]. Ранее нами были проведены исследования по биосинтезу белка NSE в бесклеточной белоксинтезирующей системе из ретикулоцитов кролика на поли (A)⁺РНК-матрице, выделенной из мозга крысы [2]. В настоящем сообщении приведены данные о получении рекомбинантных ДНК, содержащих последовательности мРНК, специфичные к белку NSE из мозга беспородных крыс.

В работе были использованы dNTP, dT₍₁₀₎ [³H] dCTP, [³²P] АТФ «Amersham», Англия), актиномицин D («Calbiochem», США), олиго (dT)-целлюлоза («Biochemicals», США), агароза, трис, HEPES, хлорафеникол, лизоцим, бромид этидия («Sigma», США), нитроцеллюлозные фильтры («Millipore», США), GF/C-фильтры («Whatman», Англия), сефадекс G-50 fine, белок (A)-сефароза («Pharmacia Fine Chemicals», Швеция), дрожжевой экстракт, триптон, агар («Difco», США) и другие аналитической чистоты реактивы. Все растворы приготовлены на деионизованной воде. Терминальная дезоксирибонуклеотидтрансфераза выделена по методу Bollum и соавт. [3], нуклеаза S₁—по методу Сенченко и соавт. [4], ДНК-полимераза I из E. coli—по методу Jovin и соавт. [5]. Часть препаратов ревертазы из вируса птичьего миеобластома, использованных в работе, любезно предоставлена проф. Дж. Бирдом (США).

Выделение из мозга крысы свободных полисом и полисомной поли (A)⁺РНК, получение белка NSE и антисыворотки к этому белку описано ранее [2]. Обогащение и очистку препарата мРНК, специфичной к белку NSE, проводили по методу иммуноадсорбции [6].

Синтез структурных генов на поли (A)⁺ РНК, выделенной из мозга крысы, включал следующие стадии: 1) синтез кДНК (компле-

ментарной ДНК) по матрице поли(А)-РНК, катализируемый ревертазой; 2) синтез второй нити ДНК (анти-кДНК) с помощью ДНК-полимеразы I; 3) обработка «шпильчатых» генов нуклеазой S_1 для превращения их в открытую двутяжевую форму [7]. После синтеза кДНК в системе обратной транскрипции получается смесь продуктов разной длины [8] (рис. 1). Эта кДНК в соответствии с данными другой работы [9] без добавления затравки может служить матрицей для синтеза ДНК, комплементарной кДНК, под действием ДНК-полимеразы I.

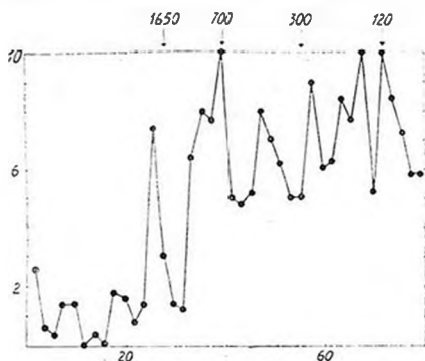


Рис. 1. Электроферетическое разделение $[^3H]$ кДНК, синтезированных по матрице поли(А)-РНК из мозга крысы, в 4% ПААГ в 98%-ном формамиде [13]. Маркерами служили: тРНК (4S), рРНК (5S и 16S) и фрагменты ДНК фага λ . Цифрами сверху обозначено количество нуклеотидов в маркерах. По оси ординат — радиоактивность, 10^{-3} имп/мин, по оси абсцисс — миграция, мм

Встраивание двухспиральной кДНК в плазмидный вектор рВР 322 проводили с помощью метода дГ-дЦ коннекторов по участку узнавания рестрикционной эндонуклеазы Pst I, находящемуся в гене, кодирующем устойчивость к ампициллину. В полученной двухспиральной кДНК формировали липкие концы наращиванием 25—30 остатков дезоксицитидиловой кислоты с помощью терминальной дезоксиинуклеотидилтрансферазы, а в молекуле вектора—рВР 322, расщепленной рестриктазой Pst I, включением примерно 25 остатков дезоксигуаниловой кислоты. Вектор и двухспиральную кДНК, подготовленные таким образом, смешивали и отжигали как описано в работе Clarke, Carbon [10], после чего использовали для трансформации клеток *E. coli* JC [11]. Эффективность трансформации с помощью ДНК рВР 322 составляла 10^8 колоний на мкг ДНК, а эффективность трансформации рекомбинантной ДНК была равна 10^5 колоний/мкг ДНК. Всего было получено $12 \cdot 10^5$ колоний трансформантов, устойчивых к тетрациклину, из них $5 \cdot 10^3$ были чувствительны к ампициллину, то есть должны были содержать вставку в области гена, определяющего устойчивость к ампициллину. Рекомбинанты анализировали с помощью гибридизации колоний, используя в качестве молекулярного зонда высокоомеченую $[^{32}P]$ кДНК (У.А. $6 \cdot 10^8$ имп/мин/мкг), синтезированную в системе обратной транскрипции по матрице мРНК, специфичной к белку NSE, обогащенной на белок А-сепарозе методом иммунопреципитации [6].

Клоны, устойчивые к тетрациклину, но чувствительные к ампициллину

лину, выращивали в течение ночи на нитроцеллюлозных фильтрах, после чего проводили гибридизацию колоний, как описано в работе Thayer [12]. Радиоавтограф одного из фильтров с колониями после гибридизации приведен на рис. 2. Колонии, дающие сильный сигнал, составили 39 из $2 \cdot 10^3$ проанализированных клонов. Полученные клоны обозначены как клоны серии pRSE.

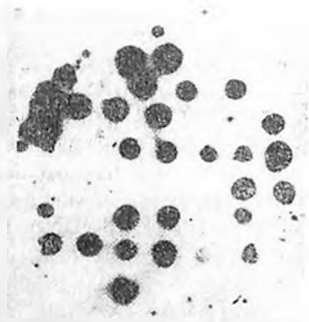


Рис. 2. Колонии *E. coli*, перенесенные на нитроцеллюлозный фильтр и дающие положительный сигнал при гибридизации с $[^{32}\text{P}]$ кДНК, синтезированной по обогащенной мРНК NSE

Известно, что метод клонирования с применением дГ-дЦ коннекторов по Pst I-сайту плазмиды pBR 322 удобен тем, что вставка двухспиральной кДНК может быть выщеплена из состава рекомбинантной молекулы с помощью рестриктазы Pst I. Мы тестировали плазмиды на чувствительность к рестриктазе Pst I и установили, что в 33 из 39 плазмид происходит выщепление вставки двухспиральной ДНК, то есть клоны с регенерированными по обе стороны от двухспиральной кДНК Pst I-сайтами составляют около 84% от количества проанализированных клонов.

Из гибридизирующихся клонов выделены и очищены рекомбинантные плазмиды, которые анализировали методом гибридно-селективной трансляции по белку NSE в бесклеточной белоксинтезирующей системе из ретикулоцитов кролика. Детальные данные по их характеристике будут опубликованы отдельно.

Полученные рекомбинантные плазмиды, содержащие вставку структурного гена NSE, могут быть использованы в качестве молекулярного зонда в опытах по гибридизации для выделения пре-мРНК, исследования процессинга этой пре-мРНК, картирования природного гена NSE, а также для определения аминокислотной последовательности NSE по нуклеотидной последовательности мРНК.

Авторы благодарят В. А. Бухмана и проф. А. А. Киселева за проявленный интерес и помощь, оказанные при выполнении данной работы.

ISOLATION OF RECOMBINANT DNAs LIBRARY (BANK OF CLONES), CONSISTENT OF MESSENGER RNAs NUCLEOTIDE SEQUENCES SPECIFIC TO NSE PROTEIN FROM RAT BRAIN

SKOBELEVA N. A., ZAKHARYAN R. A., NAZARYAN K. B.,
KAZARYAN B. A.

Institute of Experimental Biology, ArmSSK Acad. Sci., Yerevan

Double-stranded DNA synthesized from rat poly (A)⁺ RNA by the subsequent action of avian myeloblastosis virus reverse transcriptase and E. coli DNA polymerase I was splitted with nuclease S1 and inserted into PstI site in the plasmid pBR 322 by poly(dG)-poly(dC) homopolymer extension technique using terminal deoxynucleotidyltransferase. E. coli transformants have been shown to contain rat NSE sequences by colony hybridization with [³²P] cDNA synthesized on enriched mRNA of rat NSE protein.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zomzely-Neurath C. E.—In: Handbook of Neurochemistry (ed. A. Lajtha), v. 4, p. 403—433, N. Y., Plenum Press, 1983.
2. Скобелева Н. А., Бухман В. А., Захарян Р. А., Назарян К. Б., Казарян Б. А. Нейрохимия, т. 3, № 3, 280—283, 1984.
3. Bollum F. J., Chang L. M. S., Tsiapalis C. M., Darson J. W.—In: Methods enzymol. 1 ed. Grossman L., Moldave K.—N. Y.—London: Acad. Press., v. 29, part E., p. 70—80, 1974.
4. Семченко В. Н., Колбановская Е. Ю., Бонсров А. А. Молекуляр. биология, т. 13, № 6, с. 1377—1383, 1978.
5. Jovin T. H., Englund P. T., Bertch L. L. J. Biol. Chem., v. 244, № 11, p. 2996—3008, 1969.
6. Kraus J. P., Rosenberg L. E. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Biol. Sci., v. 79, № 13, p. 4015—4019, 1982.
7. Скобелева Н. А., Коалов К. А., Прасолов В. С., Дубовая В. И., Джумагалиев Е. Б., Гауас Г. Г., Фролова Л. Ю. Молекуляр. биология, т. 15, № 6, с. 1224—1233, 1981.
8. Efstratiadis A., Maniatis T., Kafatos F. C., Jeffrey A., Vournakis J. N. Cell., v. 4, № 4, p. 267—278, 1975.
9. Efstratiadis A., Kafatos F. C., Maxam A. M., Maniatis T. Cell., № 7, № 2, p. 279—288, 1976.
10. Clarke L., Carbon J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Biol. Sci., v. 72, № 11, p. 4361—4365, 1975.
11. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. Molecular Cloning A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.).
12. Thayer R. E. Anal. Biochem., v. 98, № 1, p. 60—63, 1979.
13. Фролова Л. Ю., Теннов А. В., Захарян К. Г., Тарантул В. Э., Баранов Ю. Н., Кутель Ч., Грютцман Х., Хан В., Хише Ф., Гравская Н. А., Киселев Л. Л. Молекуляр. биология, т. 10, № 4, с. 944—951, 1976.

Поступил 10. VI 1986



УДК 612.821.6+612.822.1+613.83

ЭФФЕКТ ОКСИТОЦИНА, МИКРОИНЪЕЦИРОВАННОГО В ГИППОКАМП ПРИ ФОРМИРОВАНИИ ВЛЕЧЕНИЯ К ГЕРОИНУ

ГАСАНОВ Г. Г., ИБРАГИМОВ Р. Ш., *КОВАЧ Г.,
*САБО Дж., *ТЕЛЕГДИ Г.

Институт физиологии им. А. И. Карасва АН АзССР, Баку

*Институт патофизиологии Сегедского медицинского университета, ВНР

Результаты исследований последних лет свидетельствуют о том, что окситоцин (ОКТ: нейропептид задней доли гипофиза) ослабляет развитие толерантности к различным наркотическим анальгетикам [1, 2]. Ряд биохимических и поведенческих данных [3—5] указывает на то, что этот эффект нейропептида связан с функциями ЦНС и, в частности, лимбических структур мозга. Было показано, что микроинъекция малых доз ОКТ в дорзальный гиппокамп и прилегающее ядро мезолимбической области ослабляет морфиновую толерантность, подобно системным инъекциям этих пептидов в больших дозах [6]. Однако участие лимбических структур в этих процессах до сих пор остается не выясненным.

В связи с вышесказанным нами поставлена задача изучить влияние ОКТ микроинъектированного в вентральный гиппокамп, на приобретение навыка внутривенного самовведения героина у крыс с целью выяснения зависимости от наркотика в условиях свободного поведения.

Крысам линии CFY массой 200—240 г в вентральный гиппокамп вживляли канюлю для микроинъекции ОКТ ** ($F=4$, $L=4$, $N=9$).

Методика внутривенного вживления катетера для самоинъекции героина, а также реакция внутривенной самостимуляции в свободном поведении животного описаны в работе венгерских исследователей [7].

Героин растворяли в стерильном солевом растворе. Окситоцин («Gedeon Richter», ВНР) и анти-окситоциновая сыворотка (Институт

** Авторы выражают свою признательность Г. Рихтеру (Фармакологическая лаборатория, Будапешт, ВНР) за предоставление окситоцина и Т. Барту (Институт химии и биохимии, АН ЧССР) за предоставление анти-окситоциновой сыворотки для проведения наших исследований.

химии АН ЧССР) растворяли в 0,9%-ном изотоническом растворе NaCl. Контрольной группе животных вводили физиологический солевой раствор.

Полученные данные подвергали статистическому анализу по методам *t*-критерия Стьюдента и Крускала-Уоллиса. По окончании эксперимента локализацию канюли определяли гистологически.

Процесс обучения крыс самовведению героина представлен на рис. 1, 2. При введении NaCl на 6-й день обучения было установлено, что регистрируемое в течение 2-х ч общее количество нажатий на педаль, санкционирующую подачу героина, достоверно ($p < 0,05$) превышало значения, соответствующие первым двум дням (рис. 1). Одновременно наблюдали незначительное увеличение длительности нажатия на педаль (рис. 2).

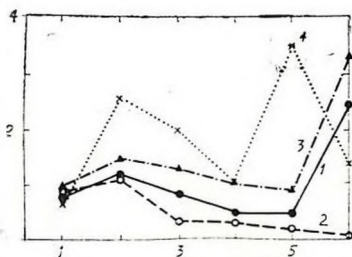


Рис. 1. Изменение общего количества нажатий на педаль, санкционирующую подачу героина. По оси абсцисс—дни обучения навыку; по оси ординат—общее количество нажатий. 1—NaCl, 2—ОКТ (окситоцин), 3—ANT (антиокситоциновая сыворотка), 4—ANT+ОКТ

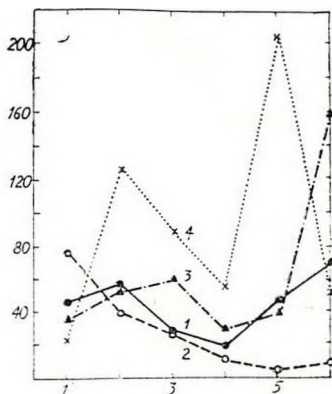


Рис. 2. Изменение общего параметра длительности нажатия на педаль, санкционирующую подачу героина. По оси ординат—длительность нажатия на педаль; остальные обозначения те же, что и на рис. 1

Микроинъекция ОКТ в вентральный гиппокамп способствовала торможению приобретения навыка, что проявлялось в достоверном ($p < 0,05$) снижении показателей, отражающих количество и длительность нажатия на педаль (рис. 1, 2).

С целью изучения специфичности полученного эффекта ОКТ, следующая серия экспериментов была направлена на изучение влияния его антагониста антиокситоциновой сыворотки (ANT) на обучение внутривенному самовведению героина. Были получены противоположные эффектам ОКТ данные, приближающиеся по своим значениям к результатам, полученным при микроинъекции NaCl (рис. 1, 2). Наблюда-

лось достоверное ($p < 0,05$) увеличение значений характеристик общего количества и длительности нажатия на санкционирующую героин педаль (рис. 1, 2).

Для выявления характера воздействия ОКТ (эндогенный или экзогенный) в ЦНС следующая серия экспериментов была нацелена на изучение действия ОКТ после микроинъекции ANT на реакцию самостимуляции у крыс. Процесс обучения самовведению героина, как это представлено на рис. 1, 2, отражался в виде зигзагообразных кривых, общее значение характеристик которых было более высоким, чем значения, полученные в предыдущих сериях. Так, регистрируемое в течение 2-х ч общее количество и длительность нажатия на педаль, санкционирующую подачу героина, значительно ($p < 0,05$) превышали значения, соответствующие ОКТ группе животных (рис. 1, 2).

Введение ОКТ в гиппокамп способствовало торможению формирования навыка внутривенного самовведения героина, что выражалось в уменьшении показателей количества и длительности нажатия на педаль.

Полученные результаты подтверждают данные [7] о том, что страстное влечение к наркотику развивается не только у толерантных, но и у животных, не обученных к героину. В то же время было показано, что интрацеребровентрикулярное введение ОКТ тормозит приобретение и сохранение навыка внутривенного самовведения героина.

На специфичность полученного факта указывают данные, полученные при введении ANT. В отличие от эффектов ОКТ, микроинъекция ANT в вентральный гиппокамп способствовала значительному увеличению показателей, характеризующих процесс самостимуляции героинном.

Так как нейтрализация ОКТ путем микроинъекции ANT в гиппокамп приводила к облегчению процесса обучения самостимуляции героинном, то можно предположить, что нейрональный субстрат этих процессов находится под тоническим контролем эндогенного ОКТ. Правомерность этого предположения подтверждается полученными нами данными о том, что введение ОКТ после микроинъекции ANT не приводило к уменьшению значений характеристик процесса обучения внутривенному самовведению героина, а, напротив, увеличивало их. В то же время известно [8], что нейтрализация ОКТ при внутривенной инъекции ANT приводила к увеличению активности лимбических клеток, генерирующих тета-ритм [8].

Полученные факты свидетельствуют о том, что действие ОКТ на склонность к героину опосредуется лимбическими структурами мозга, в частности гиппокампом.

EFFECT OF OXYTOCIN MICROINJECTED IN HIPPOCAMPUS AND FORMATION OF HEROIN ADDICTION

GASANOV G. G., IBRAGIMOV R. Sh., *KOVACS G., *SABO G.,
*TELEGDY G.

A. I. Karaev Institute of Physiology, Azerbaidjan Academy of Sciences,
Institute of Pathophysiology, Szeged Medical University, Hungary

The effect of oxytocin (OXT) and its antagonist—antioxytocin serum (ANT) microinjected in ventral hippocampus on learning of intravenous heroin selfadministration and tolerance in rats was studied.

It has been established that OXT weakens the processes of heroin selfadministration in animals, while ANT in contrast improves learning.

The investigation and data analysis suggest that OXT is involved in mechanisms of behavioral reactions, mediating its action through the structures of limbic system, hippocampus in particular.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kovacs G. L., Faludi M., Telegdy G. *Psychopharmacology*, v. 86, № 1, p. 377—379, 1985.
2. Van Ree J. M., De Wied D. *Eur. J. Pharmacol.* v. 43, № 2, p. 199—202, 1977.
3. Ашмарин Н. П., Крузников Р. И. *Нейрохимия*, т. 2, № 3, с. 327—341, 1983.
4. Чепурнов С. А., Чепурнова Н. Е.—В кн.: *Нейропептиды и миндалина*, с. 5—20, М., МГУ, 1985.
5. Kovacs G. H., Izbeki F., Horvath Zs., Telegdy G. *Behav. Brain Res.*, v. 14, № 1, p. 1—8, 1984.
6. Telegdy G., Kovacs G. H.—In: *From the single neuron to man*. (ed. Brazier M., A. B.), p. 249—268, N. Y., Raven Press, 1979.
7. Kovacs G. H., Borthatser Z., Telegdy G. *Life Sci.*, v. 37, № 1, p. 17—26, 1985.
8. Urban I. J. *Exp. Neurol.*, v. 74, № 1, p. 131—141, 1981.

Поступила 26. II 1987



МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИИ

УДК 577.121.7

ОБ УРОВНЯХ ФОСФОРСОДЕРЖАЩИХ МЕТАБОЛИТОВ
В МОЗГУ КРЫС ПО ДАННЫМ ^{31}P -ЯМР

ЛИХОДИН С. СТ., СЕМЕНОВА Н. А., ДУБИНСКИЙ В. З.

*ЛИХОДИН С. С., СИБЕЛЬДИНА А. А.

Институт химической физики, Москва;

*Целиноградский государственный медицинский институт

В настоящей работе методом ^{31}P -ЯМР высокого разрешения *in vitro* и *in vivo* проведено сравнение уровней фосфорсодержащих метаболитов в мозгу крыс при нормотермии и гипотермии.

Использовали беспородных крыс-самцов массой 120—150 г. Температуру тела снижали, вводя животным внутривенно аминазин в дозе 50 мг/кг под легким эфирным наркозом и помещая их в бокс с температурой 0°. Через 2—3 ч, когда ректальная температура снижалась до 15—20°, мозг извлекали из черепной коробки и помещали в охлажденный до 0° физиологический раствор. С момента вскрытия черепной коробки до помещения мозга в физиологический раствор проходило не более 10 с. У контрольных животных мозг извлекали под эфирным наркозом. Спектры ЯМР регистрировали на ЯМР-спектрометре WH-360 с рабочей частотой 145, 78 МГц для ядер фосфора. Использовались 60°-ный импульс и релаксационная задержка 0,45 с. Для получения спектра производили 2000 накоплений. Для количественных измерений спектры снимались с задержкой 10 с, с тем, чтобы исключить насыщение сигналов. Концентрации метаболитов по спектрам ЯМР определяли с помощью калиброванного внешнего стандарта. Спектры ^{31}P -ЯМР мозга *in vivo* были получены на ЯМР-спектрометре AM-400 (162 МГц для ядер фосфора) с помощью специально изготовленного датчика с поверхностной катушкой. Задержка на релаксацию в этих экспериментах равна 3 с, длительность зондирующего импульса 30 мкс.

На рис. 1 представлены типичные спектры ^{31}P -ЯМР изолированно то мозга контрольного животного (а) и животного с ректальной температурой 15° (б). Видно, что спектры практически тождественны. Из приведенных в таблице относительных интенсивностей сигналов, усредненных по нескольким опытам, также следует, что снижение температуры тела не приводит к заметному изменению уровней фосфорсодержа-

щих соединений в мозгу. Полученные нами значения концентраций фосфорсодержащих метаболитов в основном хорошо согласуются с наиболее достоверными результатами биохимических исследований, а именно, с такими, в которых приведены наибольшие концентрации лабильных креатинфосфата и АТР [1]. При биохимических исследованиях метаболизма мозга крыс в условиях гипотермии было показано [2], что при температурах до 20° уровни макроэргов и P_i увеличиваются по сравнению с нормой на 5—10%, что также хорошо согласуется с нашими данными

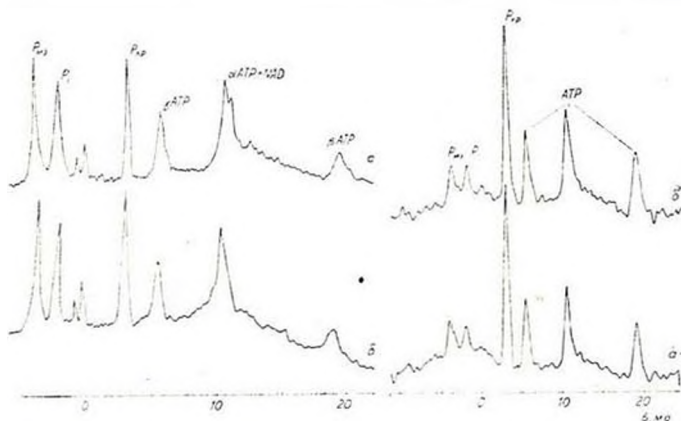


Рис. 1. Спектры ^{31}P -ЯМР изолированного мозга контрольного животного (а) и животного при гипотермии 15° (б). P_m — фосфомоноэфиры. P_k — креатинфосфат, P_i — неорганический фосфат

Рис. 2. Спектры ^{31}P -ЯМР мозга крыс *in vivo* при нормотермии (а) и при гипотермии 15° (б). Химические сдвиги определены относительно креатинфосфата, для которого принято $\delta = 3,0$ м. д. Обозначения те же, что и на рис. 1

(таблица). Вместе с тем возникает вопрос, не может ли эффект гипотермии маскироваться амплитудными изменениями уровней фосфорных метаболитов, происходящими при выделении мозга? Чтобы ответить на него, мы получили ^{31}P -ЯМР спектры мозга крысы *in vivo* с помощью поверхностной катушки. На рис. 2 представлены типичные спектры, полученные для контрольного животного (а) и животного с ректальной температурой 15° (б). Видно, что спектры *in vivo* и *in vitro* действительно заметно различаются, а в опытах *in vivo* эффект гипотермии не наблюдается.

Обращает на себя внимание аномально высокий уровень фосфомоноэфиров (3—5 м. д. по шкале химических сдвигов) в спектрах *in vitro*. Методика измерений *in vivo* не позволяет получить из спектров значения концентраций метаболитов в абсолютных единицах. Оценки, сделанные на основании относительных интенсивностей сигналов ЯМР, показывают, что в спектрах *in vivo* величина сигналов в области моно-

Интенсивности сигналов ^{31}P -ЯМР фосфорных метаболитов, приведенные к интенсивности сигнала P_i и абсолютные концентрации фосфорных метаболитов (ммоль/г) ($n=5$)

	Неорганический фосфат (P_i)		Фосфомоноэфиры		Креатинфосфат		АТФ	
	отн.	абс.	отн.	абс.	отн.	абс.	отн.	абс.
Контроль	100	—	95 ± 18	8.45 ± 1.60	67.0 ± 4.7	2.70 ± 0.19	23 ± 2	2.10 ± 0.13
Опыт	100	—	103.0 ± 4.1	—	76.0 ± 5.0	—	24.0 ± 5.0	—

эфиров достаточно хорошо согласуется с определенной биохимически суммарной концентрацией фосфатов сахаров и АМР. Полученные же из спектров *in vitro* концентрации фосфомоноэфиров на порядок превышают эти значения, но хорошо согласуются с результатами, полученными на срезах мозга [3]. Причина этих различий неясна. Возможно, сама процедура отделения мозга уже сопровождается процессами, приводящими к увеличению концентрации регистрируемых методом ^{31}P -ЯМР фосфомоноэфиров.

STUDY OF THE PHOSPHOROUS CONTAINING METABOLITE LEVELS IN THE RAT'S BRAIN BY MEANS OF ^{31}P -NMR

LIKHODY S. St., SEMIONOVA N. A., DUBINSKY W. Z., *LIKHODY St. S.,
SIBELDINA L. A.

Institute of Chemical Physics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow
*Tselinograd Medical school

The levels of phosphorous containing metabolites of the rat's brain during hypothermia are evaluated by ^{31}P -NMR *in vivo* and *in vitro*. It is shown that the reducing of the rat's body temperature from normal to 15°C does not cause any changes in ATP and phosphocreatine content. It is found that the content of the phosphomonoesters in an isolated rat brain is about ten times higher than in the intact brain of a living rat.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kopp S. J., Kriegstein J., Freidank A., Kachman A., Scilert A., Cohen M. M. J. *Neurochem.*, v. 43, p. 1716, 1984.
2. Эмирбеков Э. Э., Львова С. П. Механизмы биохимических изменений при низких температурах тела, Ростов-на-Дону, Изд-во РГУ, 1985.
3. Cox O. W. C., Morris P. G., Feeney S., Sachelard H. S. *Biochem. J.*, v. 212, p. 365, 1983.

Поступила 8. IV 1987



СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ГЛИКОПРОТЕИНЫ НЕРВНОЙ ТКАНИ

БЕРЕЗИН В. А., ГАЙДАР Л. И.

Кафедра бисфизики и биохимии Днепропетровского госуниверситета

Обобщены литературные и собственные данные авторов о разнообразии, клеточной и субклеточной локализации, структуре, свойствах, метаболизме, модификации в онтогенезе и биологической роли нейроспецифических гликопротеинов. Приведены данные, указывающие на важное практическое значение изучения специфических гликопротеинов при патологических состояниях нервной ткани.

В последнее десятилетие достигнуты значительные успехи в области изучения нейроспецифических белков [1]. Среди этих белков наибольший интерес представляют гликопротеины, выполняющие важные биологические функции в различных типах клеток нервной ткани. Углеводные цепи гликопротеинов являются регуляторами процессинга белков, ответственны за протеолитическую и конформационную стабильность белковых компонентов. Гликаны участвуют в регуляции катаболизма гликопротеинов, в секреторных функциях клетки, вовлечены в транспорт метаболитов через клеточную мембрану, надлежащую ориентацию гликопротеинов в плазматической мембране. Особый интерес вызывают мембранные гликопротеины клеточной поверхности мозга, благодаря которым осуществляются специфические для каждого типа клеток нервной ткани процессы рецепции регуляторных молекул, адресации клеток и перестройки специфических межклеточных контактов в онтогенезе [2]. Изучение специфических гликопротеинов дает возможность использовать их в качестве уникальных дифференцировочных маркеров отдельных типов клеток мозга в экспериментальной и клинической неврологии, нейроонкологии и нейрохирургии [3].

Для идентификации, очистки и изучения гликопротеинов мозга широко используются иммунохимические методы анализа, свободные меченые и иммобилизованные лектины, электрофорез в ПААГ с последующей специфической окраской на гликопротеины, получение отдельных гликопептидов ограниченным протеолизом, методы определения последовательности моносахаридных звеньев. К аффективным способам

выявления специфических гликопротеинов относятся различные сочетания иммунохимических и иммуногистохимических методов с методами электрофореза и связывания свободных лектинов. Примерами могут служить методы аффинного иммуноэлектрофореза в присутствии свободных лектинов [4], иммуноблоттинг, разделение меченных по фукозе гликопротеинов электрофорезом в ПААГ [5], связывание лектинов с гликопротеинами после их электрофоретического разделения с последующим иммунохимическим или ферментным выявлением связывающихся лектинов [6]. Для выявления гликопротеинов клеточной поверхности наиболее перспективным является получение и использование моноклональных антител [7]. При очистке специфических гликопротеинов чаще всего используют методы аффинной хроматографии на иммобилизованных лектинах [8].

Специфические гликопротеины мозга недостаточно изучены. Применение оригинальных методических подходов позволяет в настоящее время выявлять в мозгу все новые нейроспецифические гликопротеины [9].

При дальнейшем изложении рассматриваемые гликопротеины будут сгруппированы не по химической структуре гликанов и способам их связей с белками, а по особенностям клеточной и субклеточной локализации и специфическим функциям.

Гликопротеины развивающегося мозга

В мозгу животных в пренатальный и ранний постнатальный периоды обнаружены гликопротеины, характерные только для развивающегося мозга. Они получили название «временных» или «преходящих» (transient) гликопротеинов [10, 11]. Молекулярный состав гликопротеинов синаптических структур продолжает изменяться даже после первоначального образования синаптических контактов и может служить специфическим показателем определения периодов синаптогенеза [5]. Показано, что резкое снижение количества временных конканавалин А-специфических гликопротеинов на поверхности аксонов гранулярных клеток мозжечка при развитии обусловлено взаимодействием этих клеток с нейронами, которые служат мишенями (клетки Пуркиньи) [12]. В развивающемся мозгу выявлены необычные специфические гликопептиды, отсутствующие во взрослом мозгу, печени, сердце и содержащие 10% всей связанной с белком нейрамининовой кислоты. Гликопептиды обладают уникальными по сравнению со взрослым мозгом свойствами, состоят из сердцевины с отходящими наружу ветвями общей структуры: (Neu-Ac-2→8) и Neu-Ac-2→3Gal. Число сиаловых кислот варьирует от 8 до 12 [13]. Концентрация полисиалогликопептидов, выделенных из мозга новорожденных крыс, уменьшается на 75% в течение 1 месяца развития [14].

Специфические для эмбрионального состояния гликопротеины мозга, за редким исключением, не изучены как индивидуальные белки. По-

казано, что в мозгу мыши на 11-й день эмбрионального развития появляется полипептид с M_r 68 кД и изоэлектрической точкой (pI) 5,6. Через 3 дня число индивидуальных молекул с такой же M_r увеличивается, но их pI снижается. Поскольку обработка нейраминидазой приводит к повышению pI до прежнего уровня, можно предполагать, что эта группа молекул — сialogликопротеины. Последние на 16-й день эмбрионального развития в мозгу уже не определяются [15].

В 1982 г. из мозга эмбриона человека был выделен фетальный мембранный гликопротеин (ФМГ), связывающийся с конканавалином А и лектином из проростков зерна пшеницы [16]. Концентрация ФМГ в мозгу эмбриона в 5 раз выше, чем в мозгу взрослого человека. В следовых количествах ФМГ обнаруживается в почках и желудке эмбриона человека. ФМГ видоспецифичен и характерен только для мозга человека [16]. Очищенный препарат ФМГ состоит из 2-х полипептидов с M_r 128 и 180 кД. Однако в препаратах ФМГ выявлены в небольших концентрациях гликопротеины с M_r 31, 47 и 68 кД, представляющие, вероятно, продукты деградации высокомолекулярных форм белка.

Строго говоря, ФМГ нельзя отнести к специфическим гликопротеинам развивающегося мозга, поскольку он присутствует в значительных количествах и во взрослом мозгу. Известны и другие гликопротеины, концентрация которых значительно снижается во взрослом состоянии по сравнению с эмбриональным мозгом, а также гликопротеины, претерпевающие изменения углеводной и белковой структуры (модификации) при развитии. Группа таких нейроспецифических гликопротеинов, относящихся к молекулам клеточной адгезии, будет рассмотрена ниже.

Растворимые (цитозольные) специфические гликопротеины

Цитозольные нейроспецифические гликопротеины были обнаружены значительно ранее мембранных, однако их функциональная роль в целом остается невыясненной. Выделение отдельной группы цитозольных гликопротеинов довольно относительно. Многие интегральные мембранные гликопротеины имеют растворимые дериваты. Так, например, для мембранного гликопротеина D2 характерно наличие в мозгу человека растворимого производного, составляющего 12% по отношению к содержанию мембранной формы [17].

В 1963 г. α_2 -гликопротеин был обнаружен как компонент водорастворимой белковой фракции, мигрирующей при электрофорезе в зоне α_2 -глобулинов. Подтверждение его специфичности для ткани головного мозга появилось позднее — в 1967 г. [18]. Величина M_r гликопротеина — 45 кД. Углеводная часть включает глюкозамин, маннозу, глюкозу, галактозу, галактозамин, N-ацетилнейраминную кислоту и фукозу в молярном отношении соответственно 6,3, 1,5, 1,4, 1,0, 0,8, 0,7 и 0,5. В онтогенезе α_2 -гликопротеин появляется на 16-й неделе эмбриональной жизни человека, что соответствует стадии миелинизации [19]. Поэтому ранее предполагали, что функции этого белка связаны с процессом

миелинизации, а сам гликопротеин присущ олигодендроглиам. Однако проведенное в 1982 г. иммуногистохимическое изучение клеточной локализации α_2 -гликопротеина в мозжечке крысы показало, что антиген встречается только в астроцитах и их отростках и отсутствует в нейронах, олигодендроглиах, клетках эндотелия и может рассматриваться как специфический маркер астроцитов [20].

Сиалогликопротеин GP-350 с M_r 11,6 кД и pI 2.0 был выделен из растворимой фракции мозга быка в 1972 г. [21]. Белок характеризуется большим количеством остатков Glu и Asp, содержит 1 остаток сиаловой кислоты на молекулу белка, локализуется в аксонах и перикарионе нейронов. Помимо растворимой в синаптической фракции выявлена иммунохимически идентичная мембранная форма GP-350 [22]. Функции GP-350 неизвестны.

В мозгу золотой рыбки были обнаружены растворимые экстракционные белки—эпендимины α , β и γ (M_r соответственно 37, 32 и 26 кД), метаболизм которых усиливался при адаптации рыб к новым условиям плавания. Гликопротеины эпендимины β и γ —специфические для мозга компоненты, которые синтезируются клетками эпендимы в больших количествах и выделяются в экстракционную среду при обучении [23, 24]. Эпендимины β и γ обнаружены не только в мозгу золотых рыбок, но также и в мозгу амфибий и крыс; они связываются с конканавалином А, имеют сходный аминокислотный состав и образуют комплексы γ_2 , β_1 и β_2 . Под действием протеазы, содержащейся во внеклеточной среде в мозгу и СМЖ, эпендимин β превращается в эпендимин γ и секретируется из нейронов в димерной форме. Предполагают, что эпендимины играют определенную роль в процессах формирования долговременной памяти [25]. Среди цитоплазматических гликопротеинов головного мозга обнаружен высокомолекулярный гликопротеин (M_r 250—300 кД), формирующий натриевый канал в искусственных мембранах. При электрофорезе в денатурирующих условиях (ДДС-Na) гликопротеины представлены двумя полипептидами (55 и 67 кД) [26]. Возможно, это предшественники мембранных гликопротеинов натриевых каналов электровозбудимых мембран. Все три субъединицы быстрого натриевого канала мозга крысы—это гликопротеины с M_r 260 кД (α), 39 кД (β_1) и 37 кД (β_2) [27].

В 1984 г. с использованием истощенных полиспецифических антисывороток, которые в тест-системе ферментного иммуносорбционного анализа реагировали с гликопротеинами, разделенными электрофорезом в ПААГ и изоэлектрофокусированием [9], было обнаружено 9 специфических гликопротеинов мозга быка, которые, по-видимому, представляют собой растворимые антигены, так как используемый авторами тритон X-100 в концентрации 0.1% практически не экстрагирует интегральные мембранные белки, а способен лишь диспергировать мембранные образования, освобождая растворимые компоненты из замкнутого мембранного пространства. Неясно, новые ли это нейроспецифические гликопротеины, или некоторые из них идентичны ранее описанным растворимым антигенам.

Специфические гликопротеины миелина центральной и периферической нервной системы

Миелиновые мембраны содержат ряд специфических гликопротеинов, выполняющих пажные функции в поддержании интактной структуры миелиновых образований. К широко распространенным гликопротеинам относится так называемый миелинассоциированный гликопротеин (МАГ), который несет галактозные остатки и расположен на экстрацеллюлярной поверхности элементарной мембраны миелина ЦНС. МАГ обнаруживается также в олигодендроцитах до миелинизации и в миелине периферической нервной системы (ПНС) [28]. МАГ в ЦНС человека представлен тремя полипептидами (92, 107 и 113 кД), а ПНС—одним белком с M_r 107 кД. Очищенный МАГ из мозга крысы содержит избыток моноаминодикарбоновых кислот: углеводный компонент составляет 1/3 часть всей молекулы и содержит 5% фукозы, 23% маннозы, 20% галактозы, 34% N-ацетилглюкозамина и 18% N-ацетилнейраминной кислоты [29].

У больных с периферической полинейропатией наблюдалась IgM-парапротеинемия, при которой моноклональные IgM реагировали с МАГ ЦНС и ПНС человека. Предполагают, что мишенью аутоиммунной атаки при данном заболевании является углеводный компонент [30]. Моноклональные IgM к МАГ из сыворотки больных демиелинизирующей нейропатией и моноклональные мышинные антитела к естественным киллерам человека реагировали с общими детерминантами для гликопротеинов НС и естественных киллеров человека [31].

Из миелина ПНС человека и животных выделен гликопротеин P_0 , составляющий 50—60% общего белка миелина. Это интегральный мембранный гликопротеин (M_r 30 кД), специфичный для ПНС и выходящий углеводной частью на экстрацеллюлярную поверхность элементарной мембраны [28]. P_0 обнаруживается также в аппарате Гольджи шванновских клеток. Углеводная часть P_0 у кролика представлена остатками N-ацетилглюкозамина, маннозы, фукозы, галактозы и N-ацетилнейраминной кислоты [32].

В 1984 г. методом иммуноблотинга с использованием моноклональных антител к гликопротеинам мозжечка был идентифицирован новый специфический для миелина ЦНС гликопротеин с M_r 51 кД, который при хранении распадается на иммунологически перекрестнореагирующие продукты с M_r 20—26 кД [33].

Помимо вышеохарактеризованных, миелиновые структуры содержат большой набор других специфических гликопротеинов. Так, например, электрофорез в ПААГ белков миелина ПНС крысы, человека и быка в сочетании с электроблоттингом и обработкой радиоподированными лектинами позволил обнаружить 26 гликопротеинов. Еще большее число гликопротеинов выявляется в культуре шванновских клеток крысы. Некоторые из гликопротеинов шванновских клеток являются предшественниками гликопротеинов миелина. Среди выявляемых 26 глико-

протеинов ПНС, помимо хорошо охарактеризованного белка Р₀, обнаружен и изучен высокомолекулярный гликопротеин с M_r 170 кД [34].

Гликопротеины синаптических образований и нейросекреторных гранул

Практически все виды синаптических образований (плазматические мембраны синапсом, постсинаптические уплотнения, синаптические везикулы) содержат свои специфические гликопротеины. Наибольшая гетерогенность состава гликопротеинов характерна для синаптических везикул. Из очищенных синаптических везикул мозга взрослых крыс последовательным фракционированием на 4-х иммобилизованных лектинах различной специфичности (конканавалин А, лектин из проростков зерна пшеницы, лектин из английского дрока *Ulex europaeus*, лектин из клещевины *Ricinus sanguinis*) получено 9 фракций гликопротеинов, различающихся концевыми углеводными остатками. Общее количество детектируемых во фракции синаптических везикул субъединиц гликопротеинов составило 68. Большинство гликопротеинов не выявляется в других субклеточных образованиях мозга [35].

К наиболее изученным гликопротеинам мембраны синаптических везикул относится синаптин, охарактеризованный нами ранее [1].

С помощью моноклональных антител в мозгу быка идентифицирован гликопротеин с M_r 38 кД и изоэлектрической точкой при рI 4, 8, названный синаптофизинном. Синаптофизин локализован на цитоплазматической поверхности синаптических везикул и выявляется во многих образованиях нейроэпителиального генеза [36].

Еще один гликопротеин с M_r 100 кД пересекает мембрану секреторных везикул нейронов и эндокринных клеток таким образом, что антигенная детерминанта расположена на цитоплазматической стороне, а углеводный компонент на внутренней стороне синаптических везикул [37].

Гомологами синаптических пузырьков являются нейросекреторные гранулы гипоталамуса и катехоламинсодержащие везикулы хромаффинных гранул мозгового слоя надпочечников. Для этих образований также характерны гликопротеины, выполняющие специфические функции. Так, из нейросекреторных гранул и синапсом гипоталамуса крупного рогатого скота были выделены гликопротеины—носители коронарорасширяющих гормонов «К», «С» и «Г», отличающиеся по физико-химическим свойствам от известных белков мозга ($M_r=30, 20$ и 24 кД соответственно, а рI находится в диапазоне 5,6—6,3). Радиоммунологически эти гликопротеины в небольших концентрациях определяются в сердце, надпочечниках, скелетных, мышцах, печени, почках). Инкубация гликопротеинов гипоталамуса с трипсином приводит к появлению ряда коронарорасширяющих пептидов, стимулирующих гликогенолиз и регулирующих уровень циклических нуклеотидов путем ингибирования соответствующих фосфодиэстераз [38, 39].

В катехоламинсодержащих везикулах хромаффинных клеток мозгового слоя надпочечников показано наличие еще трех специфических глико-

протеинов, один из которых представляет собой мембраносвязанную допамин- β -гидроксилазу [40], а два других соответственно обозначены как гликопротеины II и III. Допамин- β -гидроксилаза из хромаффинных гранул медуллы надпочечников и головного мозга является тетрамерным гликопротеином с M_r 300 кД, содержащим 4 атома меди. Помимо гидролизующей функции показана также и оксидазная функция фермента [41]. Мембранные и растворимые формы гликопротеина III ($M_r=45$ кД) иммунологически идентичны и обнаружены также в адено- и нейрогипофизе. Широкие пределы рН (4,5—5,3) указывают на микрогетерогенность гликопротеина. Хромаффинные гранулы содержат также несколько кислых О-гликозилированных гликопротеинов, получивших название хромаггенинов [42].

Специфические белки плазматической мембраны синапсом уже были нами охарактеризованы ранее [1].

Постсинаптические уплотнения также характеризуются наличием специфических гликопротеинов: 13 конканавалин А-связывающих гликопротеинов в переднем мозгу взрослых крыс и 14—в мозжечке [43]. Гликопротеины, локализованные в участках синаптических соединений (junction), могут служить субстратами для ряда протеиназ и синаптаз. Последние играют роль в локальной модификации этих гликопротеинов в ответ на изменение функционального состояния синапса [39].

Гликопротеины клеточной поверхности нейронов и глии

Наиболее изучены гликопротеины, локализованные на поверхности плазматической мембраны нейронов и астроцитов. К ним относятся обсуждавшиеся нами ранее гликопротеины NSA-3, Thy-1, BSP-2, BSP-3 [1].

Некоторые низкомолекулярные гликопротеины, локализованные на поверхности клеток мозга, обладают ингибирующим действием на клеточное деление и синтез белка в нормальных клетках в культуре. Такие фруктосодержащие гликопротеины (30 и 45 кД) и гликопептиды (6—10 кД) выделены из мозга быка и мыши [44].

Специфические поверхностные гликопротеины симпатических нейронов в культуре могут секретироваться в культуральную среду в результате последовательной модификации белковой и углеводной части молекулы. Содержащие маннозу и несиалированные гликопротеины симпатических нейронов мыши P1 (210 кД) и P3 (185 кД) посредством их синалирования и включения в плазматическую мембрану модифицируются соответственно в гликопротеины B1 (230 кД) и B3 (200 кД). В свою очередь B1 и B3 с временем полужизни 4—6 ч модифицируются соответственно в гликопротеины B2 (215 кД) и B4 (185 кД), а затем секретируются в форме соответственно иммунологически идентичных растворимых производных S2 и S4. Процессы модификации ускоряются при выбросе медиатора, а секреция является Ca^{2+} -зависимым процессом. Описанные поверхностные гликопротеины и процессы их превращения характерны не только для симпатических нейронов в куль-

туре. Все производные гликопротеина В1 оказались иммунологически идентичными большому поверхностному гликопротеину различных типов нейронов в ЦНС и ПНС, увеличение концентрации которого индуцируется фактором роста нервов [45, 46].

С помощью моноклональных антител был обнаружен гликопротеин NSP-4 (nervous system protein), который экспрессируется некоторыми субклассами нейронов и астроцитов в мозжечке мышей. У новорожденных мышей гликопротеин представлен двумя субединицами (140 и 220 кД), тогда как у взрослых—три (140, 160 и 175 кД) [2].

Моноклональные антитела позволили идентифицировать поверхностный маркер стволовых нейроэпителиальных клеток, которые способны дифференцироваться как в нейроны, так и по глиальному типу. Этот маркер Ng-2 (neuron-glia) является гликопротеином с M_r 300 кД, сохраняется во взрослом мозгу в субпопуляциях астроцитов [47].

Гликопротеины клеточной поверхности, ассоциированные с цитоскелетом

В цитоскелетной фракции мозга, содержащей актин, с помощью моноклональных антител обнаружены гликопротеины с M_r 90 и 130 кД. Гликопротеин с M_r 130 кД является нейроспецифическим и локализован на поверхности нейронов в культуре клеток из ЦНС и ПНС. Его количество на плазматической мембране пропорционально степени выраженности дифференцировки нейронов. В эмбриональном мозгу цыпленка этот гликопротеин выявляется только на 10-й день развития. На 13-й день его концентрация достигает 50% от максимальной величины во взрослом мозгу, где его количество по белку составляет 0,2—0,3% [48]. Возможно, что форма нервных клеток регулируется актиновыми микрофиламентами посредством их связывания с мембранным гликопротеином M_r 130 кД [49].

Поверхностные гликопротеины, участвующие в клеточной адгезии

Среди гликопротеинов поверхности клеток мозга в настоящее время обнаружено 5 молекулярных представителей, принимающих участие в Ca^{2+} -независимой межклеточной адгезии. Это гликопротеины D 2, N-CAM (nerve cell adhesion molecule), K4, BSP-2, Ng-CAM (neuron-glia-CAM), L1. Первые четыре являются гомологами и выполняют идентичные функции в нервной ткани различных видов организмов [50]. Они обеспечивают гомотипическую адгезию между нейронами. Характерной их чертой является модификация молекулярной структуры, сопровождающая созревание мозга в онтогенезе. Модификация затрагивает в основном углеводную часть гликопротеинов. В эмбриональный период во время интенсивной миграции нейронов и постнатально, в стадии активного синаптогенеза, нейрон-специфические молекулы клеточной адгезии представляют собой полисигналогликопротеины. Во взрослом состоянии—это олигосигнало- либо асигналогликопротеины, состоящие

из 2—3 полипептидных цепей [4, 51—53]. Адгезивные сialogликопротеины своим карбоксильным концом инкорпорированы в структуру липидного бислоя, тогда как N-концевой домен участвует, по-видимому, в формировании контактной (адгезивной) поверхности. Углеводный компонент связан с центральной частью полипептидной цепи, находящейся на поверхности мембраны. Предполагается, что модуляция адгезии осуществляется за счет изменения числа остатков сиаловых кислот в полисialogликопротеине [54, 55]. В отношении нервно-мышечной адгезии было показано, что адгезивный эффект опосредуется специфическим белком-лектином, связывающим остатки сиаловых кислот поверхностных гликопротеинов [56].

На поверхности нейронов ЦНС выявлен еще один гликопротеин — L1, иммунохимически отличающийся от N-CAM, BSP-2 или D₂, который также участвует в межклеточной адгезии [57, 58]. Имеются данные, указывающие на независимость участия L1 и других молекул в адгезии и на дополнительность эффекта адгезии за счет гликопротеинов N-CAM и L1, находящихся на поверхности клеток [57].

Гетеротипическая Ca^{2+} -независимая адгезия между нейронами и глияльными клетками опосредована специфическим гликопротеином, получившим обозначение Ng-CAM (M_r —135 кД). По сравнению с N-CAM, Ng-CAM содержит небольшое количество сиаловых кислот, при отщеплении которых M_r смещается в зону 127 кД [59]. Гликопротеин Ng-CAM локализован исключительно на поверхности плазматической мембраны нейронов и выявляется на более поздних этапах онтогенеза, по сравнению с N-CAM [60]. Оказалось, что Ng-CAM вовлечен и в адгезию между нейронами по механизму, отличному от нейрон-глияльной адгезии [61]. В настоящее время остается невыясненным вопрос, какой молекулярный представитель, локализованный на поверхности глияльных клеток, участвует в адгезии с нейронами посредством связывания с Ng-CAM.

Метаболизм специфических гликопротеинов

В последние годы в области изучения метаболизма гликопротеинов достигнуты значительные успехи. В частности, расшифрованы основные этапы и закономерности гликозилирования и дальнейшего процессинга гликопротеинов [62]. Биосинтез и процессинг нейроспецифических гликопротеинов в наибольшей степени изучены в отношении нейронального гликопротеина межклеточной адгезии D₂, основного гликопротеина миелина ПНС Р₀ и группы поверхностных гликопротеинов симпатических нейронов в культуре Р1, Р3: В1, В3; В2, В4 и S2, S4. Взаимопревращение в пределах последней группы гликопротеинов было рассмотрено выше.

При биосинтезе в бесклеточной системе на связанных с мембранами полисомах из мозга крысиных эмбрионов и крыс разного возраста антисыворотка к гликопротеину D₂ преципитирует три синтезированных полипептида с M_r 112, 134 и 187 кД. Каких-либо взаимопревращений

этих пептидов при увеличении времени инкубации не обнаружено, что указывает на независимость трансляции полипептидов [63]. В культуре нейронов фетального мозга крысы синтезируются 2 полипептида D2 с M_r 136 и 186 кД. Оказалось, что увеличение временного интервала приводит к возрастанию величин M_r полипептидов соответственно до 137—158 и 187—201 кД. В составе высокомолекулярных производных обнаруживались меченые [^{14}C] глюкозамин, [^3H] фукоза и [^{14}C] маннозамин. В присутствии туникамина синтезировались полипептиды с M_r 124 и 175 кД. Исходные синтезированные полипептиды (136 и 186 кД) были чувствительны к деградации эндо- β -N-ацетил-глюкозаминидазой H, которая специфически деградирует маннозный остов. Полипептиды, обнаруживаемые на более поздних стадиях биосинтеза, были устойчивы к действию фермента. По-видимому, две отдельные молекулы D2 первоначально синтезируются с 4 или 5 маннозными остатками, которые позднее конвертируются в N-связанные олигосахаридные комплексы, прикрепленные к остаткам аспарагина [64]. Показано также, что оба полипептида в результате процессинга синалируются, превращаясь в полисиналогликопротеины. Попадая в аппарат Гольджи, они сульфатируются и, наконец, уже будучи фиксированными в плазматической мембране, фосфорилируются. Внутриклеточный транспорт гликопротеина от места синтеза до попадания на поверхность плазматической мембраны длится около 35 мин [65].

В культуре эксплантатов переднего мозга крысы в отношении процессинга гликопротеина D2 наблюдались сходные изменения, однако первоначально синтезировалось большое число полипептидов. Три из них с M_r 115, 137 и 195 кД и группа высокомолекулярных полипептидов с M_r 250—350 кД [65]. Возможно, большая гетерогенность обусловлена большим числом клеточных типов в культуре эксплантатов переднего мозга.

Дальнейший генез гликопротеина D2 (после его фиксирования на поверхности плазматической мембраны) не изучался. Однако обнаружение растворимого деривата этого гликопротеина, высокая концентрация его растворимой формы в сыворотке крови [66], а также быстрая деградация мембранного гликопротеина *in vitro* и сопряженное появление растворимого производного при действии лизосомного катепсина D [67] позволяют предполагать участие лизосомной системы нейронов в катаболизме этого специфического гликопротеина.

Биосинтез шванновскими клетками главного гликопротеина PNS Ро изучался после повреждения седалищного нерва крысы. Синтезированный белок гликозилируется в эндоплазматической сети путем присоединения олигосахаридного остатка, содержащего большое количество маннозы. Перед включением гликопротеина в состав миелиновой оболочки дальнейший процессинг протекает в аппарате Гольджи [68]. Гликозилирование Ро чувствительно к туникамину. Включение фукозилированной молекулы Ро в плазматическую мембрану клетки подавляется Na-специфическим ионофором монаенином [69].

Специфические гликопротеины мозга при различных формах патологии нервной системы

Исследование нейроспецифических гликопротеинов в опухолях мозга, различающихся по гистогенезу, гистоструктуре и степени злокачественности, представляет интерес в плане диагностики нейроэктодермальных опухолей. В опухолях мозга определяются: α_2 -гликопротеин, гиалуронектин NSA-3, поверхностные мембранные гликопротеины Thy-f и D2 [70]. Thy-I-гликопротеин и гликопротеин D2 экспрессируются практически всеми типами нейроэпителиальных новообразований, включая меланомы, тогда как α_2 -гликопротеин и NSA-3 в основном только астоцитомы. В глиобластомах резко повышается содержание растворимой формы гликопротеина D2, а мембранная форма в ряде случаев представлена как полисигнализованная эмбриональная форма гликопротеина [71]. Таким образом, в опухолях мозга изменяются не только скорость экспрессии специфических гликопротеинов, но и физико-химические свойства синтезированных продуктов.

Установлено, что при некоторых аутоиммунных заболеваниях (периферическая полинейропатия), множественном склерозе и других заболеваниях, характеризующихся процессами демиелинизации, наблюдается IgM-параллелемия, происходит сенсибилизация лимфоцитов. При этом мишенью аутоиммунной атаки являются специфические гликопротеины [30, 31].

Нейроспецифические гликопротеины могут также служить эффективными маркерами определенных патологических состояний ЦНС. Так, количественное определение гликопротеина D2 в амниотический жидкости явилось важным дифференцировочным и дополнительным (к определению α -фетопротеина) тестом в пренатальной диагностике дефектов нервной трубки [72].

Таким образом, приведенные в обзоре данные указывают на перспективность исследований специфических гликопротеинов клеточных элементов нервной ткани не только в области теоретической нейрохимии, но и для практической неврологии и невропатологии.

NERVOUS TISSUE SPECIFIC GLYCOPROTEINS.

BEREZIN V. A., GAIDAR L. I.

Dnepropetrovsk State University

The paper deals with modern data on diversity, cellular and sub-cellular distribution, structure, properties, metabolism, modification in ontogenesis and biological role of neurospecific glycoproteins. The practical value of nervous tissue specific glycoproteins investigation in pathology is discussed.

1. Березин В. А. Нейрохимия, т. 3, № 1, с. 54—70, 1984.
2. Rougon G., Hirsch M. R., Hirn M., Guenot J. L., Goridis C. *Neuroscience*, v. 10, № 2, p. 511—520, 1983.
3. Березин В. А. Специфические белки нервной ткани в норме и при патологии. автореферат докт. дис., Ленинград, 1985.
4. Березин В. А., Бок Э. Укр. биохим. журн., т. 54, № 5, с. 502—506, 1982.
5. Fu S. C., Cruz T. F., Gurd J. W. *J. Neurochem.*, v. 36, № 4, p. 1333—1351, 1981.
6. Wood J. G., Byrd F. I., Gurd J. W. *J. Neurocytology*, v. 10, № 1, p. 149—159, 1981.
7. Hirn M., Pierres M., Deagostini-Bazin H., Hirsch M., Goridis C. *Brain Res.*, v. 214, № 2, p. 433—439, 1981.
8. Lotan R., Nicolson G. L. *Biochim. et biophys. acta*, v. 559, № 9, p. 329—376, 1979.
9. Мехтисов А. А., Грудень М. А., Полстасов А. Б. Биохимия, т. 49, № 12, с. 1959—1964, 1984.
10. Reeber A., Zanetta J. —P., Vincendon G. —In: Multidisciplinary approach to devel., p. 149—150, North-Holland, 1980.
11. Mintz G., Gottlieb D. I., Reitman M. L., Derby M., Claser L. *Brain Res.*, v. 206, № 1, p. 51—70, 1981.
12. Webb M., Gullo V., Schneider A., Balazs R. *Int. J. Devel. Neurosci.*, v. 3, № 2, p. 199—208, 1985.
13. Finne J. *J. Biol. Chem.*, v. 257, № 20, p. 11966—11970, 1982.
14. Margolis R. K., Margolis R. U. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, v. 116, № 3, p. 889—894, 1983.
15. Noguchi S., Ogata I., Iato M. *J. Biochem.*, v. 96, № 3, p. 881—886, 1984.
16. Berezin V., Rasmussen S., Bock E. —In: Protides Biol. Fluids Proc. 30-th Colloq., v. 30, p. 79—82, Brussels, 1983.
17. Березин В. А., Шевцова А. Н., Сетал Н. Б. Биохимия, т. 48, № 5, с. 742—748, 1984.
18. Warecka K. —In: *Neurochem.*, v. 14, № 7, p. 783—787, 1967.
19. Warecka K. —In: *Neurological mutations affecting myelination. INSERM Symp* № 4, North Holland Biochem., p. 321—326, 1980.
20. Ghandour M. S., Langley O. K., Gombos G., Vincendon G., Warecka K. *Neurosci.*, v. 7, № 1, p. 231—237, 1982.
21. Van Nieuw Amerongen A., Van den Eijnden D. H., Heijlman J., Roukema P. A. *J. Neurochem.*, v. 19, № 10, p. 2195—2205, 1972.
22. Van Nieuw Amerongen A., Roukema P. A. *J. Neurochem.*, v. 23, № 1, p. 85—89, 1974.
23. Shashoua V. E., Moore M. E. *Brain Res.*, v. 148, p. 441—449, 1978.
24. Schmidt R., Shashoua V. E. *J. Neurochem.*, v. 36, № 4, p. 1368—1377, 1981.
25. Schmidt R., Shashoua V. E. *J. Neurochem.*, v. 40, № 3, p. 652—660, 1983.
26. Мелишиса М. К., Ашико В. К., Журавлева В. А. V Всесоюз. биохимический съезд, т. 1, с. 156—157, М., Наука, 1985.
27. Гришин Е. В., Долганов Г. М., Киятхин Н. Н., Коваленко В. А., Пашков В. Н., Петренко А. Г., Ушикарс Ю. А., Цыганкова О. М., Шамотиско О. Г. V Всесоюз. биохимический съезд, т. 1, с. 167, М., Наука, 1985.
28. Wachneldt T. V., Lonington C. —In: *Neurological mutations affecting myelination INSERM Symp.* № 4, North Holland Biomed. Press., p. 389—412, 1980.
29. Quarles R. H., Barbarach G. R., Figlewicz D. A., McIntire L. J. *Biochim. et biophys. acta*, v. 757, № 1, p. 140—143, 1983.
30. Braun P. E., Frail D. E., Lutov N. J. *Neurochem.*, v. 32, № 5, p. 1261—1265, 1982.

31. Shuzo Sato, Eaba Ki., Tanaka M., Yanagisawa K., Miyatake T. *Bioproc. Res.*, v. 4, № 5, p. 489—494, 1983.
32. Roomi M. W., Ishuque A., Kahn N. R., Eyler E. N. *Biochim. et biophys. acta*, v. 536, № 1, p. 112—121, 1978.
33. Linnington Ch., Webb M., Woodhams P. L. *J. Neuroimmunol.*, v. 6, № 6, p. 387—396, 1984.
34. Shuman S., Herdy M., Pleasure D. *J. Neurochem.*, v. 41, № 5, p. 1277—1285, 1983.
35. Zunetta J. P., Reeber A., Vincendon G. *Biochim. et biophys. acta*, v. 670, № 3, p. 393—400, 1981.
36. Wiedenmann B., Franke W. W. *Cell*, v. 41, № 3, p. 1017—1028, 1985.
37. Buckley K., Kelly R. B. *J. Cell Biol.*, v. 100, № 4, p. 1284—1294, 1985.
38. Сранионян Р. М., Саакян С. А., Саакян Ф. М., Галоян А. А. *Нейрохимия*, т. 2, № 3, с. 263—271, 1983.
39. Галоян А. А. *Нейрохимия*, т. 3, № 1, с. 71—84, 1984.
40. Bjerrum O. J., Helle K. B., Bock E. *Biochem. J.*, v. 181, № 2, p. 231—237, 1979.
41. Налбандян Р. М. V Всесоюз. биохимический съезд, т. 1, с. 30—31, М., Наука, 1985.
42. Fischer-Colbrie R., Zangerle R., Frischenschlager I., Weber A., Winkler H. *J. Neurochem.*, v. 42, № 4, p. 1008—1016, 1984.
43. Gordon-Weeks P. R. *Biochem. Soc. Trans.*, v. 11, № 6, p. 693—694, 1983.
44. Kihders R. J., Johnson T. S. *Biochim. J.*, v. 206, № 3, p. 527—534, 1982.
45. Swadlow K. J. *J. Neurosci.*, v. 3, № 12, p. 2504—2517, 1983.
46. Pulterson P. N.—In: *Cell. Mol. Biol. Neuronal Developments*, p. 87—94, 1984.
47. Столкан У., Асвин Дж., Рашке У.—В кн.: *Моноклональные антитела к антигенам нервной ткани*, с. 48—57, М., Мир, 1984.
48. Ranscht B., Moss D. L. *J. Cell Biol.*, v. 99, № 5, p. 1803—1813, 1984.
49. Ranscht B., Moss D. L. *Submicrosc. Cytol.*, v. 16, № 1, p. 129—130, 1984.
50. Березин В. А. *Успехи соврем. биол.*, т. 101, № 1, с. 54—68, 1986.
51. Jørgensen O. S. *J. Neurol. Transmiss., suppl.* 18, p. 245—255, 1983.
52. Rasmussen S., Berezin V., Nørgaard-Pedersen B., Bock E.—In: *Protides Biol. Fluids. XXX-th Collog.* Brussels, Pergamon Press, Oxford, p. 83—85, 1983.
53. Bock E., Berezin V., Rasmussen S.—In: *Protides Biol. Fluids. XXX-th Collog.* Brussels, Pergamon Press, Oxford, p. 75—78, 1983.
54. Edelman G. M. *Science*, v. 219, № 4584, p. 450—457, 1983.
55. Edelman G. M. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci.*, v. 81, № 5, p. 1460—1464, 1984.
56. Eischhoff R. *J. Cell Biol.*, v. 99, № 4, Pt 2, p. 176, 1984.
57. Rathjen F. G., Rutishauser U. *Europ. Mol. Biol. Organizat. (EMBO) J.*, v. 3, № 2, p. 461—465, 1984.
58. Fuissner A., Kruse J., Goridis C., Bock E., Schuchner M. *EMBO J.*, v. 3, № 4, p. 733—737, 1984.
59. Grumet M., Hoffman S., Edelman G. M. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci.*, v. 81, № 1, p. 267—271, 1984.
60. Thierry J.—P., Delauec A., Grumet M., Edelman G. M. *J. Cell Biol.*, v. 100, № 2, p. 442—456, 1985.
61. Grumet M., Hoffman S., Chuong C.—M., Edelman G. M. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, p. 81, № 24, p. 7989—7993, 1984.
62. Хьюз Р. *Гликопротеины*, М., Мир, 1985.
63. Hansen O. C., Nybroe O., Bock E. *J. Neurochem.*, v. 44, № 3, p. 712—717, 1985.
64. Lyles J. M., Norrild B., Bock E. *J. Cell Biol.*, v. 98, № 6, p. 2077—2081, 1984.
65. Lyles J. M., Linnemann D., Bock E. *J. Cell Biol.*, v. 99, № 6, p. 2082—2091, 1984.
66. Ibsen S., Berezin V., Nørgaard-Pedersen B., Bock E. *J. Neurochem.*, v. 41, № 2, p. 356—362, 1983.

67. Березин В. А., Михеев А. А., Рова А. Д. Биохимия, т. 49, № 7, с. 1138—1146, 1984.
68. Poduslo J. F. J. Neurochem., 42, № 2, p. 493—503, 1984.
69. Rapoport R. N., Benjamins J. A., Skoff R. P. J. Neurochem., v. 39, № 4, p. 1101—1110, 1982.
70. Березин В. А., Жмарева Е. Н., Ромоданов С. А., Шевченко Г. М., Бродская И. А. Вopr. онкологии, т. 31, № 12, с. 7—17, 1985.
71. Березин В. А., Жмарева Е. Н., Бродская И. А., Шевченко Г. М., Зашко А. С., Пондильок Н. В., Кузнецов А. В., Кузнецова И. В., Кононова А. И. Бюл. экспе-рим. биол. и мед., т. 100, № 7, с. 68—70, 1985.
72. Ibsen S., Berezin V., Nørgaard-Pedersen B., Bock E. J. Neurochem., v. 41, № 2, p. 363—366, 1983.

Поступила 16. IX 1986

Нейрональные и молекулярные основы обучения.

Отчеты далемской школы. 38-й исследовательский отчет в области биологических наук. J. Wiley and Sons, 576 с., 1987. The Neural and Molecular Bases of Learning. Dahlem Workshop Reports. Life Sciences Research Report 38 (Ed. by J.-P. Changeux, M. Konishi) J. Wiley and Sons Ltd., Baffins Lane, England, 576 p., 1987.

В сборнике рассматриваются биофизические, молекулярные и генетические основы обучения на простых системах и подходы к клеточным и молекулярным закономерностям, общим для всех форм обучения. Среди статей настоящего тома привлекают внимание такие, как «Ацетилхолиновый рецептор и молекулярные модели быстрого и длительного обучения»; «Молекулярные механизмы регуляции транскрипции генов эукариотов»; «Нейрональные биохимические регуляторные механизмы»; «Зависящая от активности регуляция синаптической передачи и ее связь с обучением»; «Характеристики синаптической пластичности в новой коре мозжечка и больших полушарий»; «Зависящая от активности самоорганизация синаптических связей как субстрат обучения»; «Динамические неокортикальные процессы и природа высших функций мозга»; «Формирование эктоиннервальных нервно-мышечных контактов»; «Синаптический обмен в ЦНС»; «Синаптическая пластичность и основы организации мозга»; «Восприятие, переработка и хранение информации в мозге: анализ на уровне одиночного нейрона». Представляет интерес для широкого круга специалистов в области нейронаук.



ХРОНИКА

ВЫДАЮЩИЙСЯ БИОХИМИК И ОРГАНИЗАТОР НАУКИ

(к 80-летию со дня рождения Г. Х. Бунятына)

Исполнилось 80 лет со дня рождения академика АН АрмССР Грация Хачатуровича Бунятына, создателя армянской школы биохимиков и одного из основателей советской нейрохимии.

Г. Х. Бунятын родился в 1907 г. в Нор-Баязете (ныне Камо). В 1924 г. переехал в Ереван, где окончил среднюю школу и поступил на



медицинский факультет Ереванского государственного университета. После окончания университета в 1930 г. работал ассистентом, с 1932 по 1936 гг. был доцентом кафедры биохимии Ереванского государственного университета. В 1936 г. ему была присуждена ученая степень кандидата, а в 1937 г.—доктора биологических наук. В 1939 г. ему присвоено звание профессора, в 1940 г.—звание заслуженного деятеля науки АрмССР. С 1937 по 1960 гг. Г. Х. Бунятын заведовал кафедрой биохимии Ереванского государственного медицинского института, а с 1939 по 1941 гг. работал проректором по науке в том же институте, с 1942 по

1946 гг.—ректором Ереванского государственного университета. В 1943 г. Г. Х. Бунятын был избран действительным членом АН АрмССР. В 1943—1957 гг. заведовал сектором биохимии Института физиологии АН АрмССР, затем сектором биохимии АН АрмССР, а с 1961 по 1981 гг. являлся директором организованного им Института биохимии АН АрмССР. С 1947 по 1981 гг. избирался академиком-секретарем Отделения биологических наук, академиком-секретарем АН АрмССР, вице-президентом и членом Президиума АН АрмССР. С 1947 по 1959 гг. он возглавлял Общество физиологов, биохимиков и фармакологов, а с 1960 г. по 1981 г.—Общество биохимиков Армении.

Начав свою научно-педагогическую деятельность под руководством известного биохимика проф А. А. Иоаннисяна, Г. Х. Бунятян благодаря своим незаурядным способностям, таланту и выдающемуся дару организатора становится видным ученым, основателем биохимической школы Армении. Первые исследования, выполненные им совместно с А. Г. Иоаннисяном, касались выяснения антиоксидантного действия фосфатидов на окисление ненасыщенных жиров, витаминов А, С и каротиноидов и роли препаратов железа и меди в этом процессе. Это направление оказалось настолько перспективным, что и в настоящее время привлекает внимание многих исследователей. Результаты указанных работ получили высокую оценку со стороны крупнейшего советского биохимика академика А. Н. Баха.

Основным направлением деятельности Г. Х. Бунятяна в последующем становится биохимия нервной системы. Исследования в этом направлении были начаты на кафедре биохимии Ереванского медицинского института, затем сосредоточены в организованном им Институте биохимии АН АрмССР, выросшем в крупнейший научный центр по нейрохимии.

Г. Х. Бунятян был одним из основателей функциональной биохимии нервной системы в нашей стране. Первые исследования в этой области, посвященные изучению нейрогуморальной регуляции обменных процессов, способствовали определению биохимических основ процессов возбуждения и торможения в ЦНС.

Исследования Г. Х. Бунятяна и его учеников в дальнейшем проводились в Институте биохимии АН АрмССР в направлении изучения роли основных химических компонентов головного мозга—белков, пептидов, нейромедиаторов, липидов в регуляции сложных обменных процессов в ЦНС и других органах. Одним из важных выводов указанных исследований было определение роли ГАМК не только как медиатора торможения в ЦНС, но и как регулятора обменных процессов в головном мозгу и других органах. Г. Х. Бунятяном и его сотрудниками был обнаружен новый цикл образования аммиака из никотинамидных коферментов—основного метаболита азотистого обмена в организме человека и животных.

Долгие годы Г. Х. Бунятян занимался также биохимией сахарного диабета и установил ведущую роль ЦНС в механизме формирования этой патологии. Достигнутые успехи в различных областях биохимии головного мозга были обусловлены широким научным кругозором Г. Х. Бунятяна, его природным талантом в сочетании с громадной трудоспособностью.

Результаты исследований Г. Х. Бунятяна получили широкое признание у нас в стране и за рубежом и выдвинули его в ряд ведущих ученых-биохимиков в нашей стране и за ее пределами.

Подтверждением заслуг Г. Х. Бунятяна и его школы биохимиков явилось создание Всесоюзного журнала «Нейрохимия» на базе Инсти-

тута биохимии АН АрмССР, который в настоящее время является одним из признанных в нашей стране и издается за рубежом.

Г. Х. Бунятян вел большую педагогическую работу в медицинском институте. Он обладал большим ораторским талантом. Не одно поколение студентов и сотрудников с благодарностью вспоминает его блестящие, насыщенные сведениями о самых современных достижениях науки лекции.

За большие заслуги в развитии биохимической науки Г. Х. Бунятян в 1972 г. был избран членом немецкой Академии естествоиспытателей (Леопольдина), членом Совета международной ассоциации нейрохимиков, Международной организации по изучению мозга, Национального комитета Международного общества биохимиков, Президиума правления Всесоюзного общества биохимиков. Он являлся членом редакционных коллегий журналов «Биохимия», «Вопросы медицинской химии», редсовета, а затем издательского комитета международного журнала «J. of Neurochemistry», редактором ежегодного издания «Вопросы биохимии мозга» Института биохимии АН АрмССР, одним из авторов семитомного руководства по биохимии нервной системы, изданного в США.

Г. Х. Бунятян долгие годы достойно представлял отечественную биохимию на различных международных форумах. Он пользовался большим авторитетом среди биохимиков нашей страны и за ее пределами.

Г. Х. Бунятян в 1960 г. возглавлял делегацию советских биохимиков в США, являлся участником многочисленных международных форумов, проведенных в зарубежных странах. Он был приглашен в США, Японию, Индию, Иран на длительное время для чтения лекций по актуальным вопросам современной биохимии.

Г. Х. Бунятян был автором более 250 научных работ. Под его руководством защищено 17 докторских и 58 кандидатских диссертаций. Многие его ученики, видные ученые, работают в различных научно-исследовательских институтах и вузах республики.

Партия и правительство высоко оценили заслуги академика АН АрмССР Г. Х. Бунятяна. Он был награжден орденом Ленина, орденом Октябрьской Революции, двумя орденами Трудового Красного Знамени и медалями СССР.

Энциклопедические знания, широкая эрудиция, высокая культура, большое человеческое обаяние снискали Г. Х. Бунятяну глубокое уважение научной общественности. Имя Г. Х. Бунятяна навсегда будет вписано в историю биологической науки как одного из ее наиболее ярких представителей.

РЕДКОЛЛЕГИЯ

О ЗАСЕДАНИИ СЕКЦИИ НЕЙРОХИМИИ

(17—18 февраля 1987 г., Ленинград)

17—18 февраля 1987 г. в Ленинграде состоялось очередное заседание Секции нейрохимии Научного Совета АН СССР по проблемам биохимии животных и человека.

Открывая заседание, председатель секции академик АН АрмССР А. А. Галоян выразил благодарность академику Н. П. Бехтеревой за предоставление возможности Секции нейрохимии провести свое очередное заседание на базе Института экспериментальной медицины АМН СССР. От имени присутствующих он поздравил проф. В. И. Розенгарта с 75-летием, отметив его большие заслуги в развитии отечественной нейрохимии.

Проф. Н. Н. Демин от имени членов секции поздравил проф. А. А. Галояна с избранием в действительные члены Академии наук АрмССР и Нью-Йоркской Академии наук и пожелал ему дальнейших творческих успехов.

Ученый секретарь ИЭМ АМН СССР, проф. В. А. Илюхина от имени академика Н. П. Бехтеревой сердечно приветствовала членов Секции нейрохимии. Она рассказала о деятельности ИЭМ АМН СССР, отметив, что все направления, развиваемые в институте, тесно связаны с биохимией, нейрохимией, нейробиологией. При институте функционирует клиника неврологического и нейрохирургического профиля. Основной задачей клиники является внедрение в практику здравоохранения новых методов диагностики и лечения, разрабатываемых в отделах и лабораториях ИЭМ АМН СССР. С учетом клинических показаний проводится лечение больных методом стереотаксической нейрохирургии с введением долгосрочных внутримозговых электродов в глубокие структуры головного мозга. Изучение мозга больного в процессе его лечения предложено академиком Н. П. Бехтеревой. План лечения предполагает комплексное исследование мозга с диагностическими целями и последующие электрические стимуляции и лизисы участков мозговой ткани, ответственных за проявление болезни. Применяется при паркинсонизме, различных видах гиперкинезов, фантомно-болевым синдроме.

В своем выступлении А. А. Галоян отметил, что на данном заседании секции необходимо вести конкретный разговор о перспективных программах развития патологической нейрохимии, об установлении координации между научно-исследовательскими институтами АН и АМН СССР в области нейрохимических исследований и принять постановления, способствующие осуществлению этих программ.

По вопросу, посвященному современному состоянию и перспективам развития исследований по регуляторным пептидам, выступил академик АМН СССР Н. П. Ашмарин. Он сообщил, что в настоящее время, в АН и АМН СССР ведется большая работа по прогнозированию до 2000 г. исследований по регуляторным пептидам. 6 марта 1987 г. на научной сессии Отделения медико-биологических наук АМН

СССР будет принята программа по изучению регуляторных пептидов. Рекомендации, принятые Секцией нейрохимии на данном заседании, могут быть включены в эту программу. *И. П. Ашмарин* сделал ряд конкретных предложений, способствующих устранению трудностей, препятствующих развитию исследований в этой области.

В связи с выступлением *И. П. Ашмарина*, *А. А. Галоян* заметил, что в СССР около 10 нейрохимических лабораторий занимаются выделением и изучением свойств регуляторных пептидов. Имеются трудности в установлении первичной структуры обнаруженных регуляторных пептидов. Он согласился с предложением *И. П. Ашмарина* о необходимости создания Центра по химическому синтезу регуляторных пептидов и для широких структурных исследований белков, пептидов и других соединений мозга.

По вопросу об установлении координации в области нейрпатологических исследований между системами АН и АМН СССР выступил *Р. Н. Глебов*. Он отметил, что реальной формой координации работ между НИИ АН и АМН СССР является создание договоров о научном сотрудничестве в области изучения роли нейропептидов в генезе и предотвращении важнейших нейрпатологических синдромов, и в частности эпилепсии.

Проф. *Р. И. Круликов* высказал мнение, что в целях координации исследований в области патологии нервной системы между АН и АМН СССР прежде всего необходимо ознакомиться с планами научно-исследовательских работ учреждений АН и АМН СССР и организовать Объединенную сессию Отделения медико-биологических наук АМН СССР и Отделения физиологии АН СССР в 1988 г., на которой определяются принципиальные вопросы дальнейших исследований и проблемы, для решения которых необходима координация усилий АН и АМН СССР.

Проф. *А. Ф. Панченко* указал на необходимость определения ряда важнейших направлений нейрохимии экстремальных состояний, имеющих прикладное значение, в частности радиационной нейрохимии и нейрохимии алкоголизма и наркомании.

Член-корр. АН АрмССР *К. Г. Карагезян* рассказал о научных контактах Института экспериментальной биологии АН АрмССР с лабораторией нейрохимической фармакологии Института фармакологии АМН СССР, руководимой проф. *К. С. Раевским*. Совместные исследования проводятся по выявлению роли дофамин- β -монооксигеназы в формировании молекулярно-биологических нарушений при различных психоневрологических расстройствах (эпилепсия, шизофрения) в эксперименте и клинике.

С. А. Дамбинова сообщила о деятельности группы функциональной нейрохимии Отдела нейрофизиологии ИЭМ АМН СССР. Исследования этой группы ведутся по двум направлениям: молекулярная организация глутаматных рецепторов головного мозга человека и их клинико-диагностическое значение и изучение роли эндогенных нейропептидов

з патогенезе паркинсонизма и развития эмоциональных состояний при лечебных электрических стимуляциях. В крови и спинномозговой жидкости больных паркинсонизмом обнаружены пептидные факторы с M_r менее 1 кД. В группе выделены и очищены две пептидные фракции, стабильно сопровождающие положительный эффект при паркинсонизме. В заключение С. А. Дамбинова отметила, что разработка способов использования в качестве лечебных агентов эндогенных пептидов представляется наиболее оптимальным и биологически оправданным путем вмешательства в восстановление нарушенных функций ЦНС, так как они обладают избирательным действием и оказывают лечебный эффект в крайне низких дозах.

Член-корр. АМН СССР В. И. Медведев говорил о влиянии нейропептидов на поведенческие реакции здорового человека. На основании исследований, проведенных в этом направлении, а также изучения влияния вазопрессина на больных с тяжелыми формами депрессии был сделан вывод о том, что нейропептиды обладают способностью «переучивать» рецепторы нейронов.

В своем выступлении, подготовленном по поручению акад. АН АрмССР А. А. Галояна, проф. А. И. Корочкин информировал о состоянии дел в области нейробиологии развития и генетики поведения. Он отметил, что, несмотря на наличие ряда специалистов высшей квалификации, наблюдается отставание по сравнению с аналогичными исследованиями, проводимыми в этой области в развитых зарубежных странах, обусловленное недостаточной координацией исследований, разрозненностью специалистов и слабостью материально-технической базы. В связи с этим назрела необходимость координирования усилий специалистов разного профиля для решения кардинальных задач нейробиологии, генетики поведения, а также нейрохимии и нейрофизиологии. С этой целью в Секции генетики поведения Научного Совета АН СССР по генетике и селекции и в Секции нейробиологии развития была разработана научно-исследовательская программа «Направленный нейрогенез», призванная объединить специалистов разного профиля.

Проф. Н. К. Попова указала на перспективность координации деятельности исследователей, изучающих метаболизм классических медиаторов, с учеными, работающими с нейропептидами. Она сообщила, что предполагается сотрудничество Института цитологии и генетики СО АН СССР (в области эпилепсии и паркинсонизма) с ИЭМ АМН СССР, Институтом биохимии АН АрмССР, НИИ общей патологии и патологической физиологии АМН СССР и Институтом физиологии ГССР.

Н. П. Таранова рассказала о новом способе ранней прижизненной иммунодиагностики повреждений клеточных структур нервной ткани, разработанном в лаборатории функциональной нейрохимии Института физиологии им. И. П. Павлова АН СССР. Сущность метода заключается в выявлении у больных с заболеваниями, сопровождающимися деструктивными процессами (энцефалит, энцефаломиелит, тяжелые че-

репно-мозговые травмы), аутоантител к галактоцереброзидам. Этот метод полезен не только для диагностики повреждений нервной ткани, но и для изучения патогенеза, течения, оценки эффективности терапии различных повреждений ЦНС. Докладчик предложила в число перспективных программ изучения патологических состояний нервной системы включить следующую: «Разработка способов иммунодиагностики повреждений различных клеточных структур нервной ткани и их апробация в эксперименте и клинике». *Н. П. Таранова* заметила, что настало время подумать также об организации межотраслевого научно-технического комплекса (МНТК) для новых разработок и их внедрения в практику в области медико-биологических наук и высказала идею о создании Всесоюзного центра по нейрохимии, где смогут оказать и методическую помощь.

Н. Ф. Аврова в своем выступлении также остановилась на иммунодиагностике с помощью моноклональных антител. В лаборатории сравнительной биохимии нервной системы Института эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова АН СССР совместно с Институтом морфологии человека АМН СССР были получены моноклональные антитела против антигена, связанного с мелкоклеточной карциномой легких человека. *Н. Ф. Аврова* подчеркнула необходимость организации и развития подобного рода исследований в нашей стране, поскольку они открывают перспективы диагностики и, возможно, терапии ряда форм рака.

По вопросу о развитии исследований в области нейрохимии экстремальных состояний выступил *С. Х. Хайдарлиу*. Он отметил, что актуальность проблемы раскрытия нейрохимических механизмов стресса и адаптации определяется тем, что в основе 2/3 обращаемости к врачу и более 90% незаразных болезней сельскохозяйственных животных лежат стрессовые воздействия. Причем, если в поиске нейрохимических коррелятов стрессореактивности достигнуты определенные успехи, то нейрохимические корреляты стрессоустойчивости изучены крайне недостаточно. Он указал на ряд мер, которые необходимы для развития исследований в указанном направлении.

Подытоживая выступления членов Секции нейрохимии, *А. А. Галоян* выделил 4 основных направления, по которым в самое ближайшее время необходимо скоординировать работу ведущих специалистов АН и АМН СССР: проблемы эпилепсии и паркинсонизма (по этому направлению могут координировать свою деятельность ИЭМ АМН СССР, НИИ общей патологии и патологической физиологии АМН СССР, Институт цитологии и генетики СО АН СССР, Институт биохимии АН АрмССР); роль нейропептидов в патогенезе нервных болезней* (здесь центрами сотрудничества могут быть кафедра физиологии человека МГУ, Институт биохимии АН АрмССР, Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии АН СССР); нейроген (для решения этой проблемы могут скоординироваться Институт биологии развития АН СССР, Институт общей генетики АН СССР, университет Дружбы

народов. Институт молекулярной генетики АН СССР, Институт биохимии АН АрмССР и др.): нейрохимия экстремальных состояний (во главе этой проблемы могли бы стоять Институт физиологии им. И. П. Павлова АН СССР, Институт зоологии и физиологии АН МССР, кафедра биохимии Белорусского государственного университета).

В связи с вышесказанным, *А. А. Галоян* предложил от имени Секции нейрохимии обратиться с просьбой к председателю Научного Совета АН СССР по проблемам биохимии животных и человека академику АН СССР *С. Е. Северину* об оказании помощи в ускорении реализации этих программ.

По вопросу о подготовке к X Всесоюзной конференции по нейрохимии «Фундаментальные достижения нейрохимии в медицине» (15—17 сентября 1987 г., Горький) выступила ученый секретарь Научного Совета АН СССР по проблемам биохимии животных и человека *И. А. Балашова*. Она сообщила, что в программу конференции включены 6 симпозиальных заседаний, посвященных следующим вопросам: генетические аспекты обмена веществ в нервной ткани в норме и патологии; нейропептиды нервной ткани и их роль в патогенезе заболеваний; биохимия мембран нервной ткани; эндогенные и экзогенные факторы регуляции обмена веществ в мозгу; нейрохимия и экстремальное состояние организма; проблемы биотехнологии применительно к нервной ткани.

В заключение были заслушаны доклады сотрудников ИЭМ АМН СССР *В. И. Клементьева* «Роль эндогенных нейрохимических факторов в патогенезе центральных двигательных расстройств» и *А. Б. Пиотровского* «Поиск веществ, влияющих на глутаматергическую передачу».

Следующее заседание Секции нейрохимии намечено провести 18 сентября 1987 г. в Горьком.

БАРХУДАРЯН Н. А.



Рефераты статей, направленных на депонирование в ВИНТИ

УДК 577.15+577.3+591.39

НУКЛЕОТИДНЫЙ КОНТРОЛЬ АКТИВНОСТИ
NAD-ЗАВИСИМОЙ ИЗОЦИТРАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В
МИТОХОНДРИЯХ МОЗГА КУР

АРУТЮНЯН Л. А., СИМОНЯН Р. А., СИМОНЯН А. А.

Изучали особенности влияния нуклеотидов различной природы: пиридиновых (NADH, NADPH), пуриновых (AMP, cAMP, ATP, IMP, ITP, GDP, GTP) и пиримидиновых (UDP, UTP, CMP, CTP) на активность NAD-зависимой изоцитратдегидрогеназы (NAD-ИЦДГ) в митохондриях мозга кур.

Проведенные исследования показали, что восстановленные пиридиннуклеотиды вызывают значительное подавление активности NAD-ИЦДГ в митохондриях мозга кур. Ингибирующий эффект NADH и NADPH возрастает с повышением их концентрации, причем NADH оказывает более выраженное воздействие во всех использованных концентрациях (0,2 мМ NADH подавляет активность фермента на 56%, а NADPH—на 44%).

Изучение влияния моно-, ди- и трифосфатов различных нуклеозидов на активность NAD-ИЦДГ в митохондриях мозга кур показало, что в концентрации 0,5 мМ они не вызывают существенного снижения активности фермента (ингибирование не превышает 9—12%). Не обнаружено зависимости эффекта от вида основания, количества фосфатных остатков, наличия или отсутствия аминогруппы в молекуле нуклеотидов.

Сопоставление литературных данных по регуляции активности NAD-ИЦДГ в филогенетическом аспекте показывает, что в тканях млекопитающих NADH является более мощным ингибитором, чем ATP; активность фермента из растительных и бактериальных источников регулируется преимущественно ATP. Наши исследования свидетельствуют о том, что в нуклеотидном контроле активности NAD-ИЦДГ в митохондриях мозга кур, как и в тканях млекопитающих, ведущую роль играет изменение соотношения окисленных и восстановленных форм пиридиннуклеотидов.

Представляло интерес изучение возможности модулирования процесса ингибирования NAD-ИЦДГ восстановленными пиридиннуклеотидами в присутствии цитрата или Ca^{2+} , являющихся активаторами фер-

мента в тканях различных животных. Результаты опытов показали, что совместное добавление цитрата или CaCl_2 (2,5 мМ) с NADPH (0,1 мМ) снимает ингибирующее влияние последнего на активность NAD-ИЦДГ в митохондриях мозга кур. Повышение концентрации этих стимуляторов в среде приводит к возрастанию активности фермента выше контрольной величины. В случае совместного добавления с NADH цитрат или Ca^{2+} снижают ингибирование фермента (с 40 до 9%), но не восстанавливают контрольный уровень активности.

Как видно из экспериментального материала, цитрат или Ca^{2+} приводят к реверсии ингибирования NAD-ИЦДГ, вызванного NADPH, в митохондриях мозга кур, что для ткани мозга показано нами впервые. Модуляция ингибирования фермента под воздействием NADPH представляется особенно важной, если учесть, что NADPH составляет около 90% тотального NADP, присутствует в тканях преимущественно в свободном состоянии и потенцирует ингибирующий эффект NADH. По нашим данным, концентрации стимуляторов, вызывающие реверсию ингибирования NAD-ИЦДГ, ниже тех, которые необходимы для активирования фермента без ингибитора.

Из полученных данных можно заключить, что цитрат и Ca^{2+} способны выполнять протекторную роль в отношении ингибирования NAD-ИЦДГ, вызванного NADPH, в митохондриях мозга кур. Надо полагать, что регуляция окисления изоцитрата по NAD-зависимому пути может осуществляться за счет сдвигов в содержании положительных (цитрат, Ca^{2+}) и отрицательных (восстановленные пиридиннуклеотиды) эффекторов в митохондриях мозга кур.

7 с., рис. 2, библиогр. 15.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Поступила 28. VIII 1986

Рукопись депонирована в ВИНТИ

УДК 61.591.105:591.133.591.8.576.311.576.312.612.381

АДАПТИВНАЯ ПЕРЕСТРОЙКА РЕЗЕРВОВ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ В ТКАНИ ГОЛОВНОГО МОЗГА БЕЛЫХ КРЫС ПОСЛЕ ПАРЕНТЕРАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ОТДЕЛЬНЫХ АМИНОКИСЛОТ И СМЕСИ АЛЬВЕЗИН «НОВЫЙ»

ТУРЯНИЦА И. М., ПАЩЕНКО А. Е., ФЕДОРОВИЧ Т. М.,
ТУРЯНИЦА С. М., РОСТОКА Л. М.

Исследованы резервы свободных аминокислот в ткани головного мозга и сыворотке крови у белых крыс после парентерального введения отдельных аминокислот (глутаминовая кислота, β -аланин, метионин, лейцин) и смеси аминокислот альвезин «новый» методом одномерной нисходящей хроматографии на бумаге FN-1 (ГДР). Опыты проводили на

одногодичных беспородных белых крысах. Аминокислоты вводили подкожно: глутаминовую кислоту—500 мг на 100 г массы тела, лейцин—200 мг, β -аланин—500 мг, метионин—250 мг с исследованием через 24 ч: альвезин «новый» (по 5 мл на животное)—через 1 ч, 6 ч и 24 ч.

Установлено, что разовая нагрузка отдельными аминокислотами вызывает разбалансирование тканевых фондов свободных аминокислот, проявляющееся через 24 ч в виде разнонаправленных их сдвигов, причем при применении β -аланина, глутаминовой кислоты и лейцина с нарастанием аминокислотных резервов большинства из них в головном мозгу. При парентеральном же введении метионина и альвезина наблюдается уменьшение тканевого пула большинства свободных аминокислот, за исключением увеличения глутаминовой кислоты, метионина, фенилаланина и валина в первом случае, валина и лейцина с изолейцином—во втором, что, по-видимому, отражает особенности их влияния на интенсивность и избирательность мобилизации аминокислотных резервов в азотистом метаболизме головного мозга.

Нельзя исключить, что выявленное разбалансирование аминокислотных резервов в этой ткани связано частично с нарушением межтканевого их перераспределения через кровь, вызванном токсическим воздействием на организм указанных доз индивидуальных аминокислот, обуславливающих изменение проницаемости ГЭБ. Это представление подтверждается и тем, что в сыворотке крови также наблюдается разбалансирование аминокислотных резервов с преимущественным их накоплением при введении глутаминовой кислоты, лейцина, метионина и обеднением в случае применения β -аланина. С другой стороны, увеличение их концентрации в ткани мозга может быть следствием повышения активности протеолитических ферментов в этой и других тканях при нагрузке отдельными аминокислотами.

Полученные результаты позволяют предостеречь от передозировки отдельными аминокислотами, особенно без достаточного поступления полноценной белковой пищи и обосновать целесообразность использования аминокислотных смесей типа альвезин «новый» в случае необходимости уменьшения аминокислотных резервов организма.

10 с. ил., библиогр. 17

Ужгородский государственный университет

Поступила 10. III 1986.

Рукопись депонирована в ВИНТИ

11.06.87. № 4269—В87

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

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

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

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

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

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

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

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

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

Фамилии иностранных авторов даются в тексте на языке оригинала.

6. 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 единовременной нумерации страниц тома номер выпуска не указывать. При цитировании книги указывается также, под чьей редакцией она издана, название издательства и место издания.

СОДЕРЖАНИЕ

Жариков С. И., Жарикова А. Д., Юринская М. М. Транспорт $[^3H]$ дофамина через синаптическую мембрану: влияние β -фенилэтиламина	311
Мельник В. И., Крыжановский Г. Н., Шукалова Т. Ф., Титов С. Ю., Глебов Р. Н. Торможение конвульсантами активного транспорта протонов в мембранах синаптических пузырьков мозга: блокада анионного канала	317
Априкян Г. В., Гекчан К. Г., Варгян А. А. Ca^{2+} -зависимое высвобождение нейромедиаторных аминокислот из нервных окончаний головного мозга белых крыс при старении	325
Всрвскина И. В., Аснина В. В., Горкин В. Э., Машковский М. Д. Избирательное ингибирование пиразидолом моноаминоксидазы типа А в головном мозгу крысы и человека	332
Тизранян Р. А., Демин Н. Н., Ковалев В. Ю. Содержание полиаминов и специфических компонентов в различных отделах головного мозга крыс при стрессорных воздействиях. II. Вращение в барабане и эмоциональный стресс, коррекция стрессорных явлений феназепамом	340
Лилинская Е. Б., Куликова О. Г., Разумовская Н. И. Действие антифенинов на систему cAMP в мозгу крыс	350
Саитмуратова О. Х., Рустомова Ф. Н., Садыков А. А., Лесонтьев В. Б. Действие некоторых психо- и нейротропных препаратов на кинетику биосинтеза ядерных гликопротеинов нейронов	360
Панфилов А. Д., Гомазков О. А., Колессарова Н. В. Влияние ангиотензина II и антигипертензивных к нему на агрессивное поведение у крыс	368
Нечасова Г. А. Очистка связанной щелочной РНКазы цитозоля и ее специфического белкового ингибитора из растворимой фракции головного мозга крыс	376
Манукян Н. П., Азизджанян А. Х., Арутюнян А. В. Ферменты биосинтеза пролина и регуляция их активности в мозгу крыс	384
Иванов В. А. Синтез ДНК в неокортексе развивающихся крыс	390
Карпова О. Б., Аюрова Н. Ф., Цинзерлинг В. А. Изучение ганглиозидов головного мозга и сосудистых сплетений при менингоэнцефалитах различной этиологии	347
Ефимова М. Г., Остапко Н. А., Этингоф Р. Н. Особенности процесса перекисного окисления липидов в тканях сетчатки и мозга крыс с наследственной дегенерацией сетчатки	406
Резрик Т. И., Каламиков Г. Р., Островский М. А. Влияние перекисного окисления липидов на проводимость фоторецепторной мембраны диска	413
Краткие сообщения	
Абутидзе К. Д., Соломонян Р. О., Микеладзе Д. Г. Изучение опинатной рецепторной системы в обогащенных фракциях глии и нейронов	418
Менджеруцкий А. М., Маклецова М. Г., Корпухина И. Ю. Влияние дельта-сон индуцирующего пептида на содержание ГАМК, глутамата и активность глутаматдекарбоксилазы в отделах мозга крыс	422
Кривенко Н. Е., Маликов У. М., Панов А. Н. Белки и РНК в нейронах и глиоцитах дорзального ядра шва головного мозга крысы при сне и длительном его лишении в цилиндрическом тротбане	426

Скобелева Н. А., Захарян Р. А., Назарян К. Б., Казарян Б. А. Получение кло- нотек рекомбинантных ДНК (банка клонов), содержащих нуклеотидные последовательности мРНК, специфичные к белку NSE из мозга крысы	431
Гасанов Г. Г., Ибрагимов Р. Ш., Ковач Г., Сабо Дж., Телсиди Г. Эффект окси- тоцина, микроинъектированного в гиппокамп при формировании влечения к героину	435

Методы исследований

Лиходий С. Ст., Семенова Н. А., Дубинский В. З., Лиходий Ст. С., Сибельди- на Л. А. Об уровнях фосфорсодержащих метаболитов в мозгу крыс по данным ³¹ P-ЯМР	439
--	-----

Обзоры

Березин В. А., Гайдар Л. И. Специфические гликопротеины нервной ткани	442
---	-----

Хроника

Выдающийся биохимик и организатор науки (к 80-летию академика Г. Х. Бунятына)	456
Бархударян Н. А. О заседании Секции нейрохимии (17—18 февраля 1987 г., Ленинград)	458

Рефераты статей, направленных на депонирование в ВИНТИ

Арутюнян Л. А., Сихонян Р. А., Сихонян А. А. Нуклеотидный контроль ак- тивности NAD-зависимой изоцитратдегидрогеназы в митохондриях моз- га кур	464
Турияница И. М., Пащенко А. Е., Федорович Т. М., Турияница С. М., Росто- ка Л. М. Адаптивная перестройка резервов свободных аминокислот в тка- ни головного мозга белых крыс после парентерального введения отдельных аминокислот и смеси альбумина «новый»	465

CONTENTS

<i>Zharikov S. I., Zharikova A. D., Yurinskaya M. M.</i> Transport of ^3H -dopamine through the membranes of synaptosomes. Effect of β -phenylethylamine . . .	311
<i>Melnik V. I., Kryzhanovsky G. N., Shukalova T. F., Titov S. Yu., Glebov R. N.</i> Inhibitor of the active proton transport in brain synaptic vesicles membranes by convulsants: block of an anion channel	317
<i>Aprikian G. V., Gekchian K. G., Vartanian A. A.</i> Ca^{2+} dependent release of neurotransmitter amino acids from nerve endings of white rats brain at aging	325
<i>Veryovkina I. V., Asnina V. V., Gorkin V. Z., Mashkovsky M. D.</i> Selective inhibition of type A monoamine oxidase by pyrazidol in rat and human brain	332
<i>Tigranyan R. A., Doemlin N. N., Kovalev V. Yu.</i> The polyamine and specific component content in the various part of rat brain under stressor influences II. Rotation in a drum and emotional stress, correction of stress phenomena by phenazepam	340
<i>Lishnevskaya E. B., Kultkova O. G., Ruzumovskaya N. I.</i> Effect of antifebriles on the cAMP system in rat brain structures	350
<i>Saitmuralova O. H., Rustamova F. N., Sadykov A. A., Leontjev V. B.</i> Effect of some psycho and neurotropic preparations upon kinetics of nuclear glycopeptides biosynthesis within neuron	360
<i>Panfilov A. D., Gomazkov O. A., Komissarova N. V.</i> Effect of angiotensin-II and antiserum to it on the modulation of the aggressive behavior in muricidal rats	368
<i>Nechaeva G. A.</i> Isolation of latent alkaline cytosolic KNA α c and its specific protein inhibitor from rat brain soluble fraction	376
<i>Manukyan I. P., Agadjanyan A. Kh., Aroutyunyan A. V.</i> Enzymes of proline biosynthesis and regulation of their activity in rat brain	384
<i>Ivanov V. A.</i> DNA synthesis in neocortex of developing rats	390
<i>Karpova O. V., Avrova N. F., Tsinzerling V. A.</i> Study of brain and vascular plexes gangliosides in meningoencephalites of different etiology . . .	397
<i>Efimova M. G., Ostapenko I. A., Ettingof R. N.</i> Peculiarities of lipid peroxidation in retina and brain of rats with inherited retina degeneration . .	406
<i>Rebrik T. I., Kalumkarov G. R., Ostrovsky M. A.</i> Effect of lipid peroxidation on the photoreceptor disc membrane conduction	413
Short communications	
<i>Abutidze K. D., Solomonina R. O., Mikeladze D. G.</i> Study of opioid receptor system in enriched glial and neuronal fractions	418
<i>Mendjeritsky A. M., Mukletsova M. G., Karpukhina I. Yu.</i> Effect of delta sleep inducing peptide (DSIP) on the amount of GABA, glutamate and the activity of glutamate decarboxylase in various rat brain areas . . .	422
<i>Krivenko N. E., Malikov U. M., Panov A. N.</i> The protein and RNA content in neurons and gliocytes of the rat nucleus raphe dorsalis during the sleep and after prolonged sleep deprivation in a cylindrical treadmill . .	426
<i>Skobelova N. A., Zakharyan R. A., Nazaryan K. B., Kazaryan B. A.</i> Isolation of Recombinant DNAs library consistent of messenger RNAs nucleotide sequences specific to NSE protein from rat brain	431

<i>Gasarov G. G., Ibragimov R. Sh., Kovacs G., Sabo G., Telegdy G. Effect of oxytocin microinjected in hippocampus and formation of heroin addiction</i>	435
--	-----

Methods

<i>Likhody S. St., Semionova N. A., Dubinsky W. Z., Likhody St. S., Steldina E. A. Study of the phosphorous containing metabolite levels in the rat's brain by means of ^{31}P-NMR</i>	439
--	-----

Reviews

<i>Berezin V. A., Gaidar L. I. Nervous tissue specific glycoproteins</i>	442
--	-----

Chronicles

80th Anniversary of academician Buniatian H. Kh.	456
Barkhudaryan N. A. Meeting of the Section for Neurochemistry (Leningrad, February 17-18th, 1987)	458

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

<i>Aroutgungyan L. A., Simonian R. A., Simontan A. A. Nucleotides control the activity of NAD-dependent isocitrate dehydrogenase in hen brain mitochondria</i>	464
<i>Turyanitsa I. M., Pashenko A. E., Fedorovitch T. M., Turyanitsa C. M., Ros-toka L. M. Parenteral administration of free amino acids and mixture al-vozin "new" induces adaptive shifts in the stores of free amino acids in rat brain</i>	465