

том 6, № 4, 1987

ISSN 0203-493X

НЕЙРОХИМИЯ

ՆԵՅՐՈՔԻՄԻԱ



АКАДЕМИЯ НАУК СССР
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

НЕЙРОХИМИЯ ՆԵՅՐՈՔԻՄԻԱ

ТОМ 6, ВЫП. 4
ОКТЯБРЬ—ДЕКАБРЬ

Журнал основан в 1982 году
Выходит 4 раза в год

ИЗДАТЕЛЬСТВО АН АРМЯНСКОЙ ССР
ԵՐԵՎԱՆ 1987

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, Л. 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, Л. С. ЧЕРКАСОВА, Р. Н. ЭТИНГОФ



СОВЕТСКАЯ НЕЙРОХИМИЯ—К 70-ЛЕТИЮ ВЕЛИКОЙ ОКТЯБРЬСКОЙ СОЦИАЛИСТИЧЕСКОЙ РЕВОЛЮЦИИ

Советский народ и все прогрессивное человечество широко отмечают 70-летие Великой Октябрьской социалистической революции, освободившей угнетенные народы царской России от векового порабощения. Победа революции сыграла важнейшую роль в судьбе как народов СССР, так и всего человечества. Огромное развитие за 70 лет советской власти претерпели все области общественной жизни, в том числе и сфера науки. СССР по ряду направлений современной науки занимает ныне ведущее положение в мире.

В системе биологических наук особое место принадлежит нейробиологии и нейрохимии, развитие которых в нашей стране во многом обуславливалось выдающимися открытиями корифеев отечественной науки—И. М. Сеченова, И. П. Павлова, А. А. Ухтомского, Н. Е. Введенского, А. А. Орбели, С. П. Боткина, А. Ф. Самойлова, В. М. Бехтерева и др., создавших учение о нервизме, высшей нервной деятельности и объективных методах ее изучения. У истоков советской нейрохимии стоят имена основателя функциональной нейрохимии А. В. Палладина и его сотрудников, впервые начавших плодотворные исследования по белкам и протеолитическим ферментам мозга, Е. М. Крепса, Г. Х. Бунятяна, Г. Е. Владимирова, П. А. Кометнани и др., успешно развивавших различные аспекты биохимии нейропептидов, нейромедиаторов, аминокислотного и энергетического обмена в нервной системе и т. д.

Вместе с тем, за последние 20 лет произошли коренные изменения в проблематике нейрохимических исследований. Советскими учеными создан ряд приоритетных, лидирующих направлений в нейрохимии. К их числу можно отнести фундаментальные исследования по химии и биологии регуляторных пептидов, нейроспецифических белков гипоталамуса—регуляторов различных метаболических процессов, протекающих в мозгу и висцеральных органах и т. д. Исследуется также взаимодействие нейропептидов с «классическими» нейромедиаторными системами. За последние годы начаты серьезные работы в области нейрохимии по экспрессии генов и генной инженерии. Большое внимание уделяется изучению молекулярных основ генетических дефектов нервной системы. Классические методы генетики находят все более широкое применение в нейробиологических исследованиях.

Все большее развитие получают исследования биохимических основ нейрофизиологических процессов. Успешно проводится исследование функциональной организации потенциалзависимых кальциевых каналов в возбудимых мембранах. Применение метода внутриклеточной перфузии позволило установить связь между метаболизмом 3',5'-сАМР и функционированием кальциевых каналов. Весьма перспективным направлением является изучение свойств ионных каналов, формируемых в искусственных нейрональных мембранах различными биологическими активными соединениями, в частности нейротоксинами.

Серьезные достижения имеются в области изучения нейрохимических аспектов действия циклических нуклеотидов, например, в исследовании механизмов сопряжения аденилатциклазной системы с различными внутриклеточными медиаторами. Отечественными нейрохимиками обнаружен ряд белков—эндогенных регуляторов метаболизма циклических нуклеотидов. Из сетчатки, в частности, изолирован специфический белок—ингибитор фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов, выработаны к нему моноклональные антитела и исследована его первичная структура.

По-прежнему значительное место в нейрохимических исследованиях, проводимых в нашей стране, занимает всестороннее изучение биохимических основ синаптической передачи. Изучаются региональное распределение и молекулярная организация рецепторов нейромедиаторных систем, принципы их функционирования в нервных клетках в норме и патологии, а также нейрохимические основы действия на рецепторы природных регуляторов и различных психофармакологических веществ.

На сегодняшний день в СССР существует более 50 лабораторий нейрохимического профиля. Из них 36 занимаются изучением экстремальных состояний: нейрохимией алкоголизма, наркомании, токсикомании, зимней спячки и глубокой гипотермии, а также различных стрессорных воздействий на организм. Намечается определенный прогресс в исследованиях по радиационной нейрохимии. Ряд нейрохимических лабораторий страны занимается изучением метаболизма белков, ферментов и нуклеиновых кислот нервной ткани. Заметны успехи отечественной нейрохимии в изучении молекулярных основ нейрохимических патологий: метаболизма нервной ткани при черепно-мозговой травме, сосудистых и опухолевых поражениях мозга, роли некоторых эндогенных нейропептидов в патогенезе паркинсонизма и динамике развития и самоустранения эпилептической активности мозга.

В последние годы в нашей стране начаты исследования в области иммунодиагностики повреждений олигодендроглиальных и миелиновых структур у больных с энцефалитом, энцефаломиелитом, менингитом и поражениями спинного мозга. Исследуются также ферменты распада глицеро- и фосфолипидов в качестве диагностического теста при ряде наследственных заболеваний нервной системы (болезнь Тея-Сакса, Нимана-Пилла, Сандхоффа и др.).

Создание в СССР журнала «Нейрохимия» (орган АН СССР и АН АрмССР) сыграло историческую роль в развитии отечественной нейро-

химии, в пропаганде ее достижений в нашей стране и за рубежом. Журнал играет также большую роль в организации нейрохимических исследований в СССР, ареал которых в последнее время заметно расширился. Наряду с признанными нейрохимическими центрами в СССР (Москва, Ленинград, Киев, Ереван, Тбилиси) успешно работают нейрохимические лаборатории в Минске, Горьком, Ростове-на-Дону, Кишиневе, Новосибирске, Харькове, Тарту, Днепропетровске, Махачкале, Нальчике и других городах нашей страны.

В наши дни ленинская Коммунистическая партия проводит огромную работу по перестройке общества развитого социализма. XXVII съезд КПСС и Пленумы ЦК КПСС в апреле 1985 г. и июне 1986 г. поставили перед советскими учеными исключительно важную задачу—занять лидирующее положение в мировой науке. По словам президента АН СССР, академика Г. И. Марчука. «...без глубокой реорганизации, широкой и всесторонней демократизации научной жизни невозможно полностью раскрыть интеллектуальный, научный потенциал социалистического общества и достичь мирового уровня по всем основным направлениям исследований».

Реальная форма такой реорганизации в отечественной нейрохимической науке представляется в усилении координации фундаментальных исследований, имеющих практическое значение для медицины, в различных научных центрах страны, разработке совместных научных программ между учреждениями АН СССР и АМН СССР по таким направлениям, как биохимия нейропептидов, рецепторов, мембран нервной ткани и молекулярные основы различных нейропатологий. Реализации указанных программ способствовала бы организация в нашей стране Всесоюзных координационных научно-методических центров по химическому синтезу регуляторных пептидов и для широких структурно-функциональных исследований белков, пептидов, нейромедиаторов и других соединений мозга.

Советская нейрохимия, базируясь на богатейших традициях отечественной нейробиологической школы, имеет все предпосылки для того, чтобы занять одно из ведущих мест в мире.

РЕДКОЛЛЕГИЯ



УДК 577.352+3.612.821.

ИЗМЕНЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ СВЯЗЫВАНИЯ [^3H] ДИАЗЕПАМА С СИНАПТИЧЕСКИМИ МЕМБРАНАМИ КОРЫ БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЙ МОЗГА КРЫС ПРИ ОБУЧЕНИИ

КОРОТКОВ К. О., АКСЕНТЬЕВА М. С., ЖУЛИН В. В.

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии АН СССР, Москва

В экспериментах *in vitro* с помощью анализа по Скотчарду изучали влияние обучения на параметры связывания [^3H] диазепама к синаптическим мембранам неопортекса крыс. Графики Скотчарда для крыс, обученных условному рефлексу двухстороннего избегания, крыс, стрессированных несочетанными электрическими раздражителями, и интактных животных имели нелинейный характер. Мы предлагаем возможные объяснения этого факта. Используя модель двух независимых участков связывания, определяли K_d и V_{max} (максимальное число участков связывания) для мембран обученных и стрессированных крыс. Плотность рецепторов стрессированных крыс была намного выше, чем у обученных, в основном, за счет увеличения низкоаффинной популяции, при этом аффинности обеих популяций были практически одинаковы. Различия между кривыми в графиках Скотчарда, соответствующими обученным и интактным животным, были незначительны. Исходя из этого, мы предполагаем, что изменения на уровне бензодиазепиновых рецепторов соответствуют уровню эмоционального возбуждения во время обучения.

Принято считать, что фармакологические эффекты бензодиазепинов опосредуются через высокоаффинные участки связывания в мозгу—бензодиазепиновые рецепторы [1, 2]. Большое количество косвенных данных, свидетельствующих об их гетерогенности, частично объясняет чрезвычайно широкий спектр физиологической активности бензодиазепинов [3, 4]. Один из важнейших эффектов этой группы лекарств—анксиолитический—тесно связан с процессами высшей нервной деятельности. Распределение бензодиазепиновых рецепторов в мозгу [5, 6] подтверждает предположение, что они определенным образом включены в высшие интегративные процессы. Так, показано, что бензодиазепины могут влиять на способность к обучению у человека [7—9]. Известно также, что некоторые формы экспериментального стресса изменяют параметры высокоаффинного связывания бензодиазепинов у крыс [10].

Ранее было установлено, что синаптические мембраны коры больших полушарий мозга крыс, подвергшихся воздействию несочетанных раздражителей—света и электрокожных раздражений (ЭКР)—связы-

вают больше диазепам, чем синаптические мембраны крыс, обученных избеганию. В свою очередь, последние обладали статистически достоверно большим уровнем связывания, чем мембраны интактных животных [11].

В настоящей работе представлены данные, показывающие, что значительное увеличение связывания [^3H] диазепам при указанных воздействиях обусловлено возрастанием плотности рецепторов синаптических мембран без изменения их аффинности.

Материалы и методы

Условный рефлекс двустороннего избегания (УРДИ) вырабатывался у самцов белых крыс по общепринятой методике. Обучение продолжали до достижения критерия 5 избеганий подряд. Животных, получавших несочетанные раздражители, соответствующие по количеству раздражителям, примененным для выработки условного рефлекса, использовали как активный контроль (АК), а животных, не подвергавшихся каким-либо воздействиям—как пассивный контроль (ПК). В каждой группе было по 8 крыс.

Через несколько мин после обучения животных декапитировали, отделяли серое вещество больших полушарий, выделенный материал помещали в жидкий азот. После оттаивания материал тщательно гомогенизировали в стеклянном сосуде Поттера в 25 объемах среды выделения (0,32 М сахароза, «Sigma», США; 1 мМ ЭДТА и 50 мМ трис- HCl , «Serva», ФРГ, pH 7.4) при температуре 4°, которую поддерживали на всех стадиях выделения. Гомогенат центрифугировали 10 мин при 1500g. Осадок отбрасывали, а супернатант центрифугировали 20 мин при 20000g. Осадок (фракция P_2) суспендировали в 25 объемах по отношению к исходной ткани 50 мМ трис- HCl , pH 7.4 в стеклянном гомогенизаторе и хранили несколько дней при температуре -20°.

Связывание проводили при температуре 0.5—1°. К 0.4 мл оттаявших и повторно гомогенизированных мембран добавляли 50 мкл [^3H] диазепам (87 Ки/ммоль, «Amersham», Англия). Конечные концентрации [^3H] диазепам варьировали от 0.3 до 30 нМ. Реакцию останавливали через 60 мин фильтрованием образцов через фильтры GF/B под вакуумом. Фильтры дважды промывали 5 мл ледяного буфера (общее время фильтрования составляло 10—15 с). Радиоактивность фильтров определяли в сцинтилляторе Брея с использованием счетчика «Beckman LS-9000», США. Для определения неспецифического связывания использовали немеченый диазепам в концентрации $5 \cdot 10^{-6}$ М [12]. Белок определяли по Lowry и соавт. [13]. Концентрация белка в опыте составляла 0.2—0.4 мг.

Таким образом, в сумме исследованы 24 препарата синаптических мембран, выделенных от 24 животных. Данные по связыванию представлены в виде графиков Скэтчарда. Каждая точка на графике соответствует среднему арифметическому всех опытов. При этом по формуле

$\sqrt{\frac{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}}{n-1}}$ вычисляли и откладывали на графике стандарт-

ное отклонение σ_{n-1} . Уровень приближения к линейной регрессии оценивали по критерию f^2 . Разложение экспериментальных точек в соответствии с моделью двух независимых участков связывания (для групп обучения и АК) проводили по Feldman [14] с использованием метода наименьших квадратов. В рамках этого метода определены отклонения для величин K_d и B_{max} . Интерполяционная кривая для группы ПК аппроксимирована моделью, предполагающей комбинацию двух популяций рецепторов, одна из которых связывается с лигандом по мономолекулярному механизму, а другая может равно отвечать как варианту положительной кооперативности, так и варианту самоконвертирующихся конформационных форм рецептора.

Обсуждение результатов

Результаты связывания [3H] диазепама синаптическими мембранами представлены на рис. 1 и 2. В противоположность широко распространенным данным, график Скэтчарда для мембран крыс ПК не является прямой линией, он лучше описывается кривой, имеющей максимум и точку перегиба. Если же провести прямую методом линейной

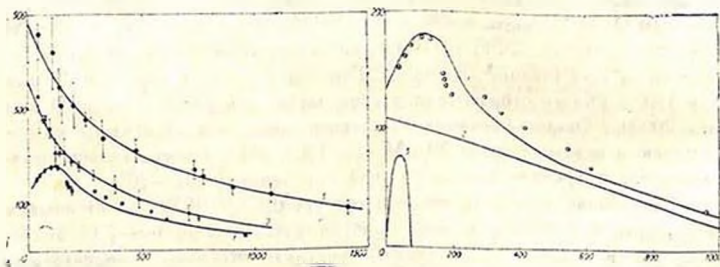


Рис. 1. Графики Скэтчарда для связывания [3H] диазепама с синаптическими мембранами коры больших полушарий мозга крыс. По оси абсцисс—специфическое связывание (фмоль/мг белка), по оси ординат—отношение специфического связывания к концентрации несвязавшейся метки (фмоль/фмоль · мг белка · 10^{-3}). 1—группа intactных крыс, 2—обучение УРДИ, 3—активный контроль. Для каждой точки взято среднее значение из 8 опытов

Рис. 2. Разложение экспериментальной кривой Скэтчарда для связывания [3H] диазепама с синаптическими мембранами коры больших полушарий мозга intactных крыс. 1—экспериментальная кривая, 2—прямая, соответствующая простой бимолекулярной реакции лиганд-рецепторного взаимодействия, 3—парабола, соответствующая модели положительной кооперативности или конформационных переходов рецепторов. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1

регрессии через точки с $R \geq 300$ фмоль/мг белка, то полученные K_d и B_{max} (соответственно 3.74 нМ и 1.2 пмоль/мг белка) близки к данным, известным из литературы [15, 16]: R —количество специфически связанного рецептора. Проверка такого приближения по методу i^2 (включая точки с $R < 300$ фмоль/мг белка) дает $i^2 = 210$ ($n=2$), при этом достоверная вероятность приближения для всех экспериментальных точек оказалась меньше 0,01. Тем не менее, нелинейный характер графика, соответствующего группе ПК, и достоверное наличие максимума в области малых концентраций (0,1—1,0 нМ) [3H] диазепам потребовали дополнительной экспериментальной проверки. Было показано, что изменение условий первого центрифугирования при выделении синаптических мембран, скорости фильтрации и некоторых других экспериментальных процедур влияет на параметры связывания [3H] диазепам, но не является критическим для выявления максимума на графике Скэтчарда. Кроме того, для идентификации модели была проведена вспомогательная серия опытов по связыванию, где начальная концентрация белка R_0 варьировала от 0,2 до 2,0 мг/мл. Оказалось, что форма максимума не зависит от величины R_0 . На основании результатов этого эксперимента отдали предпочтение модели, которая предполагает наличие двух популяций рецепторных молекул, одна из которых (R_1) описывается прямой линией на графике Скэтчарда ($K_{d1} = 24,4$ нМ и $B_{max1} = 2,44$ пмоль/мг белка), а вторая (R_2) имеет плотность $B_{max2} = 0,1$ пмоль/мг белка и соответствующий ей график может быть описан моделью предельной положительной кооперативности с двумя местами связывания ($n=2$) или моделью конформационного перехода между двумя формами рецептора. Полученное значение B_{max2} для кривой ПК хорошо согласуется с величинами плотности рецепторов со сверхвысоким сродством, выявленным Ehlert и соавт. [17], в эксперименте по связыванию бензодиазепиновых рецепторов с этиловым эфиром β -карболин-3-карбоновой кислоты.

И для стрессированных (АК), и для обученных крыс форма кривой Скэтчарда соответствует механизму связывания для двух или более независимых подтипов рецептора (максимум на кривой отсутствует). Ранее похожие формы графиков Скэтчарда были продемонстрированы для взаимодействия [3H] диазепам с бензодиазепиновыми рецепторами неокортекса необученных кроликов [18], а также для связывания [3H] флуниотразепам с синаптическими мембранами, выделенными из различных отделов мозга крыс, в присутствии этилового эфира β -карболин-3-карбоновой кислоты [19]. При расчете термодинамических параметров связывания [3H] флуниотразепам и [3H] клоназепам показано, что изменение аффинности связывания по мере изменения температуры не совпадает с термодинамической константой равновесия, характерной для бимолекулярной реакции, поэтому возможность существования двух независимых подтипов бензодиазепинового рецептора разрешает это противоречие [20].

Пока невозможно точно оценить какому типу бензодиазепиновых рецепторов отвечает появление перегиба на графике Скэтчарда. Обнаруженные с помощью $[^3\text{H}]$ 4'-хлордiazепама (R. 05—4864) так называемые рецепторы «периферического» типа локализованы не только в «периферических» органах, но и в ткани мозга [21]. Однако плотность таких рецепторов в неокортексе крыс существенно ниже, чем рецепторов «центрального» типа [22]. «Периферические» рецепторы не связаны с ГАМК-регулируемыми ионными каналами, опосредующими эффект анксиолитиков и антиконвульсантов бензодиазепиновой природы, которые взаимодействуют с рецепторами «центрального» типа [23]. Согласно последним исследованиям, по субклеточному фракционированию гомогенатов мозга крыс рецепторы «периферического» типа преимущественно локализованы на внешней мембране митохондрий, а их функции, по-видимому, тесно связаны с процессами окислительного фосфорилирования [23, 24]. Разумеется, в нашем эксперименте $[^3\text{H}]$ diaзепам связывался с рецепторами обоих типов, присутствующих во фракции P_2 . Тем не менее, принимая во внимание вышесказанное, участие рецепторов «периферического» типа в процессах высшей нервной деятельности представляется маловероятным. Скорее перегиб на графике Скэтчарда отвечает двум неоднородным популяциям рецепторов «центрального» типа.

Таблица

Разложение экспериментальных кривых связывания $[^3\text{H}]$ diaзепам с синаптическими мембранами коры мозга крыс в соответствии с моделью двух неоднородных участков связывания

Условия опытов	Высокоаффинные участки		Низкоаффинные участки	
	K_d , нМ	B_{max} , фмоль/мг белка	K_d , нМ	B_{max} , фмоль/мг белка
1. Обучение	$1 \pm 0,5$	150 ± 50	10 ± 2	800 ± 100
2. Активный контроль	$0,85 \pm 0,4$	200 ± 50	10 ± 2	$1500 \pm 200^*$

Примечание. $^*p_{2-1} < 0,05$.

Приняв модель двух независимых участков связывания, мы можем разложить экспериментальные кривые на два линейных компонента и определить для них величины K_d и B_{max} (таблица). Альтернативная интерпретация этих кривых заключается в том, что использованные воздействия не изменяют механизм связывания, но сдвигают параболический конформационный компонент ближе к нулю на оси абсцисс в графике Скэтчарда, вследствие чего график переходит в форму, более соответствующую модели с двумя участками.

Однако независимо от интерпретации кривых, рецепторы обученных и стрессированных крыс проявляют качественно близкий способ связывания. График Скэтчарда у стрессированных животных проходит гораздо выше, чем у обученных, что может быть объяснено увеличением, в основном, за счет низкоаффинной популяции доступных рецеп-

торов, тогда как аффинность обеих популяций остается практически на одном и том же уровне. В то же время плотности участков связывания и аффинности мембран мозга обученных и необученных животных достаточно близки.

В процессе выработки УРДИ степень эмоционального возбуждения крыс постепенно снижается, в связи с чем, вероятно, наступает относительное понижение плотности участков связывания.

Изменения характеристик связывания с бензодиазепиновыми рецепторами, таким образом, в определенной мере соответствуют физиологическим закономерностям обучения. Сходство же в левой части графиков Скэтчарда для обучения и АК, в свою очередь, может быть вызвано менее выраженным проявлением эмоционального стресса у обученных крыс.

LEARNING ALTERS [^3H]-DIAZEPAM BINDING TO THE SYNAPTOSOMAL MEMBRANES OF RAT NEOCORTEX

KOROTKOV K. O., AKSENTIEVA M. S., ZHULIN V. V.

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

The effect of learning on the parameters of [^3H] diazepam binding to rat brain synaptosomal membranes has been studied in vitro experiments by Scatchard analysis. Scatchard plots for the rats which were trained to conditional reflex of double-sided avoidance, those stressed by unmatched irritations and intact rats did not represent a straight line. We propose a possible interpretation of this fact. Using the model of two independent binding sites, determination of dissociation constants (K_d) and maximum binding sites (B_{max}) for trained and stressed rats membranes has been made. The receptor density in stressed rats was much higher than in learned ones—mainly due to increase in low-affinity population while affinities were similar in both cases. Furthermore, the differences between the curves of trained and intact rats were not significant. On this ground we suggest that changes in the level of the benzodiazepine receptors are in accordance with the extent of emotional excitation during the training.

ЛИТЕРАТУРА

1. Muller W. E. *Pharmacology*, v. 22, p. 153–161, 1981.
2. Mennini T., Garattini S. *Life Sci.*, v. 31, p. 2025–2037, 1982.
3. Martin I. L., Chloé L. B., Doble A. *Life Sci.*, v. 32, p. 1925–1935, 1983.
4. Montaldo S., Serra M., Concas A., Corda M. G., Meleand S., Biggio G. *Neurosci. Lett.*, v. 52, p. 263–268, 1984.
5. Young W. S., Kuhar M. J. *Nature*, v. 280, p. 393–395, 1979.
6. Young W. S., Nichoff D. L., Kuhar M. J., Beer B., Lippa A. S. *J. Pharmacol. and Exp. Ther.*, v. 216, p. 425–430, 1981.

7. Liljequist R., Mattila M. J. Brit. J. Clin. Pharm., v. 8, suppl. 1, p. 55—56, 1979.
8. Lister R. G. Neurosci. Biobehav. Rev., v. 9, p. 87—95, 1985.
9. Petersen R. S., Ghonem M. M. Progress in Neuro-Pharmacol., v. 4, p. 81—90, 1980.
10. Lipka A. S., Klepner C. A., Yungler R. L., Sano M. S., Smith W. V., Beer B. Pharmacol. Biochem. Behav., v. 9, p. 853—856, 1978.
11. Коротков К. О., Жулин В. В., Круликов Р. И. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 12, с. 695—696, 1981.
12. Baghurst P. A., Nichol L. W. J. Theor. Biol., v. 74, p. 523—535, 1978.
13. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
14. Feldman H. A., Anal. Biochem., v. 48, p. 317—338, 1972.
15. Braestrup C., Squires R. F. Nature, v. 266, p. 732—734, 1977.
16. Mohler H., Ocada T. Life Sci., v. 20, p. 210—222, 1977.
17. Ehlerl F. J., Roeske W. R., Yamamura H. I. Life Sci., v. 22, p. 235—248, 1981.
18. Yokoi I., Rose S. E., Yanagihara T. Life Sci., v. 28, p. 1591—1595, 1981.
19. Mielson M., Braestrup C. Nature, v. 286, p. 606—607, 1980.
20. Quast U., Muhlmann H., Vollmer K.-O. Mol. Pharmacol., v. 22, p. 20—25, 1982.
21. Shoemaker H., Bales R. J., Horst W. D., Yamamura H. I. J. Pharmacol. and Exp. Ther., v. 225, p. 61—67, 1983.
22. Richards J. G., Mohler H. Neuropharmacology, v. 23, № 2B, p. 233—242, 1981.
23. Maranges P. J., Patel J., Boulenger J.-P., Clark-Rosenberg R. Mol. Pharmacol., v. 22, p. 26—32, 1982.
24. Basile A. S., Scolnick P. Neurochem., v. 46, p. 305—309, 1986.
25. Anholt R. R. H., Pedersen P. L., De Souza E. B., Snyder S. H. J. Biol. Chem., v. 261, p. 576—583, 1986.

Поступила 20. X 1986



УДК 612.84+547.466.64

ПОСТНАТАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ РЕЦЕПТОРОВ ГЛУТАМАТА, БЕНЗОДИАЗЕПИНА И ГАМК В ЗРИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ КРЫСЫ (СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

ШАИБС Р., РОТЕ Т.

Институт исследований мозга им. Пауля Флексига
Университета им. Карла Маркса, Лейпциг, ГДР

С использованием метода связывания лигандов было исследовано постнатальное развитие глутаматных, бензодиазепиновых и ГАМК-рецепторов в сетчатке, ядре наружного колленчатого тела (ЯНКТ), верхнем холмике четверохолмия (ВХЧ) и зрительной коре головного мозга крыс. Установлено, что в центральных зрительных областях онтогенез мест связывания глутамата опережает развитие рецепторов ГАМК и бензодиазепина. Максимальное связывание глутамата было выявлено уже на 14-м дне постнатального развития. Временная картина развития бензодиазепиновых рецепторов в зрительной коре и сетчатке в этих областях отставала от развития рецепторов ГАМК, тогда как связывание бензодиазепина в ЯНКТ и в ВХЧ опережало связывание ГАМК. Различия по времени отчетливого проявления глутаматных, бензодиазепиновых и ГАМК-рецепторов в зрительных областях указывает, что глутамат- и ГАМК-ергические проводящие пути неодинаково включаются в функциональное созревание зрительной системы крыс. Развитие глутаматных рецепторов в центральных зрительных областях, видимо, тесно связано с механизмами избирательной стабилизации синаптических контактов, тогда как онтогенез рецепторов ГАМК и бензодиазепина контролируется более сложным образом.

В зрительной системе крыс происходят постнатальные функциональные и структурные изменения. Можно полагать, что они увязаны с развитием функциональных свойств системы опознавания. Адекватный зрительный поток, видимо, взаимодействует с этим развитием и влияет на конечную настройку функциональных и/или структурных нейронных связей в зрительном пути [1].

Наши сведения о созревании зрительной системы были получены по большей части на основе результатов электрофизиологических и морфологических исследований [2]; меньше данных имеется о развитии нейрохимических параметров зрительной системы крыс. Так как главные нейромедиаторы, участвующие в первичной передаче зрительной информации, все еще неизвестны, мы сосредоточили внимание на постнатальном онтогенезе глутамат- и ГАМК-ергической передач, которые в головном мозгу рассматривают соответственно как основные возбуж-

дающие и тормозящие системы [3—5]. Нейромедиаторные рецепторы являются одними из решающих звеньев в цепи синаптической обработки информации. Благодаря их способности к адаптации в ответ на изменяющиеся количества нейромедиаторов в зависимости от сдвигов активности нейронов [6], они особенно важны для функционально-адаптивных процессов, которые протекают во время созревания зрительной системы. Поэтому мы изучали развитие глутаматных, бензодиазепиновых и ГАМК-рецепторов в зрительных отделах (зрительной области коры больших полушарий, ЯНКТ, ВХЧ и сетчатке) крысы для того, чтобы выяснить, существует ли корреляция между онтогенезом этих рецепторов и созреванием процессов обработки информации в этой хорошо изученной сенсорной системе. Кроме того, мы были заинтересованы в определении величин временных различий в созревании основных возбуждающей и ГАМК-ергической передач, выявляемых при онтогенезе рецепторов в зрительной системе крыс.

Материалы и методы

Крысы линии BD III любого пола находились в условиях 12-часового затемнения в сутки и обычного виварного содержания. Их декапитировали в различном (10—90-дневном) возрасте и под стереомикроскопом, как было описано ранее [7], выделяли зрительную область коры, ЯНКТ, ВХЧ и сетчатку. Пробы ткани гомогенизировали в инкубационном буфере и сохраняли при -20° . Для количественного определения рецепторов исследуемых агентов использовали метод радиолигандного связывания. После инкубации радиолиганда с мембранной фракцией, полученной из ткани соответствующей области, образованный лиганд-рецепторный комплекс отделяли либо фильтрованием (при определении бензодиазепиновых рецепторов), либо центрифугированием (в случае рецепторов глутамата и ГАМК). Радиоактивность материала, задержанного на фильтрах или перешедшего в осадок при центрифугировании, измеряли при помощи счета в жидком сцинтилляторе. Для определения различных видов рецепторов применяли следующие радиолиганды: $[^3\text{H}]$ глутамат—для глутаматных рецепторов [8], $[^3\text{H}]$ флунизепам—для бензодиазепиновых [9] и $[^3\text{H}]$ мусцимол—для рецепторов ГАМК [10]. Величину специфического связывания вычисляли как разницу между общим связыванием и связыванием, определяемым в присутствии немеченого рецепторного ингибитора (неспецифическое связывание). В этих опытах использовали радиолиганды и ингибиторы в следующих концентрациях: 3 нМ $[^3\text{H}]$ глутамата и 1 нМ немеченого L-глутамата; 1,5 нМ $[^3\text{H}]$ флунизепам и 10 мкМ хлордiazепоксид; 2 нМ $[^3\text{H}]$ мусцимола и 1 нМ ГАМК. Полученные величины специфического связывания выражали как отношение связанного радиолиганда к содержанию белка в пробе, которое определяли по методу Lowry и соавт. [11].

Результаты и обсуждение

Для сравнения изменявшихся во времени состояний онтогенеза рецепторов глутамата, бензодиазепина и ГАМК в изучаемых зрительных областях временные сдвиги в специфическом связывании выражали в процентах от величины максимального связывания, достигавшейся в течение исследуемого периода развития.

В зрительной коре (рисунк, а) связывание глутамата с 10-го по 14-й день постнатального развития поднималось $\approx$ на 31% и достигало максимального уровня, установленного при онтогенезе. К 25-му дню связывание глутамата падало ($\approx$ в 10 раз) и уже в этом возрасте

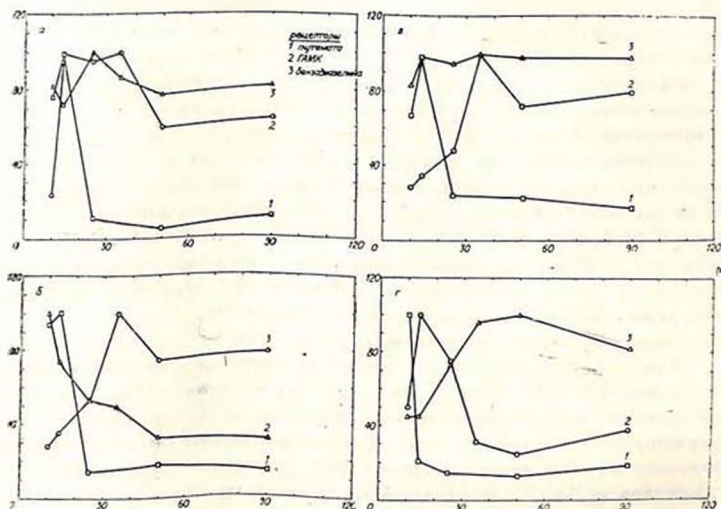


Рис. Постнатальное развитие рецепторов глутамата, ГАМК и бензодиазепина в зрительной области коры больших полушарий (а), ядре наружного колленчатого тела (б), верхнем холмике четверохолмия (в) и сетчатке глаза (г). Величины связывания выражены в % от максимального, принятого за 100%, достигнутого при исследуемом периоде онтогенеза соответствующим видом рецепторов. Абсолютные величины составляли при этом (нмоль/г белка):

- а) 5020 ± 194 (1), 163 ± 26 (2) и 356 ± 22 (3);
 б) 14891 ± 1964 (1), 142 ± 17 (2) и 277 ± 12 (3);
 в) 5234 ± 344 (1), 155 ± 10 (2) и 399 ± 28 (3);
 г) 4064 ± 131 (1), 81 ± 5 (2) и 141 ± 3 (3).

По оси абсцисс — возраст в днях, по оси ординат — связывание.

достигало величины, свойственной взрослым крысам. Связывание ГАМК с 10-го по 14-й день значительно увеличивалось (приблизительно в 4 раза), поддерживалось на высоком уровне до 35-го дня и уменьшалось на 43% к 50-му дню, достигая величины, наблюдаемой у взрослых

животных. Бензодиазепиновое связывание медленно повышалось с 10-го по 25-й день на 22%, достигая максимальной величины, затем оно постепенно снижалось до 50-го дня, когда становилось характерным для взрослых крыс.

В подкорковых областях ЯНКТ и ВХЧ (рисунок, б, в) онтогенетический профиль глутаматных рецепторов был близким к описанному в случае зрительной коры. После подъема связывания глутамата с 10-го по 14-й день, когда достигалось максимальное связывание, оно стремительно падало, достигая к 25-му дню уровня у взрослых животных. Связывание ГАМК в ЯНКТ и ВХЧ постепенно увеличивалось от 10-го до 35-го дня, достигая максимальной величины с последующим существенным снижением до 50-го дня, когда были отмечены величины, характерные для взрослых крыс. Бензодиазепиновое связывание в ВХЧ медленно нарастало с 10-го по 14-й день (на 16%) и оставалось на этом уровне до взрослого состояния (рисунок, в), тогда как в ЯНКТ связывание бензодиаземина с 10-го дня постоянно снижалось до величины, свойственной взрослым крысам (рисунок, б).

В сетчатке (рисунок, г) максимальное связывание глутамата было обнаружено уже у 10-дневных крыс, а затем оно резко снижалось до 25-го дня, достигая к этому сроку уровня у взрослых животных. Связывание ГАМК с 10-го по 14-й день повышалось на 50%, затем снижалось до 35-го дня, достигая наблюдаемого в случае взрослых крыс. Бензодиазепиновое же связывание с 10-го по 37-й день существенно повышалось, находилось на достигнутом уровне до 50-го дня, а потом понемногу опускалось до величины у взрослых.

Сравнение постнатального онтогенеза рецепторов глутамата, бензодиаземина и ГАМК в зрительных областях головного мозга крыс выявило, таким образом, значительные различия в картине развития этих рецепторов. В каждой из исследованных зрительных областей развитие глутаматных рецепторов предшествовало созреванию рецепторов бензодиаземина и ГАМК. В центральных зрительных областях самое высокое связывание глутамата было установлено на 14-е сутки постнатального развития. В сетчатке максимальная величина связывания оказалась в самый первый срок исследования—10-й день.

Глутамат может служить кортикальным нейромедиатором, как на это указывает его Ca^{2+} -зависимый выход из эндогенных запасов и специфическое поглощение пирамидными клетками слоя VI зрительной коры [12, 13]. В настоящее время имеются веские доказательства, что нервные волокна, идущие из зрительной коры в ЯНКТ и ВХЧ, используют в качестве нейромедиатора глутамат [14].

Развитие высокоаффинного связывания глутамата, которое можно рассматривать как маркер глутаматергических нервных окончаний, видимо, протекает параллельно с морфологическим созреванием зрительных кортикофугальных и кортико-кортикальных проекций [15]. Период максимального связывания глутамата тесно совпадает с тем, когда созревание глутаматергических нервных окончаний достигает взрослого

состояния. Резкое постнатальное падение глутаматного связывания в центральных зрительных областях с 14-го по 25-й день, таким образом, можно рассматривать как деградацию тех мест связывания глутамата, которые оказались неэффективно вовлеченными в протекающее образование глутаматергических синаптических контактов. Интересно, что у крыс возраст, при котором достигается самое высокое в течение всего постнатального развития связывание глутамата, совпадает с временем прозревания. Следовательно, «включение» зрения, видимо, побуждает окончательное морфофункциональное созревание глутаматергической передачи в центральных зрительных областях. Подобное же резкое снижение числа мест связывания глутамата в сетчатке, возможно, зависит от тех же механизмов.

Временная динамика развития бензодиазепиновых рецепторов в зрительной коре и сетчатке отстает от развития рецепторов ГАМК в этих областях, тогда как в ЯНКТ и ВХЧ связывание бензодиазепаина опережает связывание ГАМК. В некоторых частях головного мозга бензодиазепиновые рецепторы, возможно, ассоциированы с рецепторами ГАМК и белками хлорных каналов, образуя некий супрамолекулярный комплекс [16]. Различный ход онтогенеза мест связывания бензодиазепаина и ГАМК в изученных нами зрительных областях может указывать на неодинаковое развитие в них обоих рецепторов или на зависящие от возраста изменения в функциональных свойствах ГАМК—бензодиазепиновый рецептор—хлоридонофорного комплекса.

В зрительной системе крыс наблюдали также региональные отличия в типах развития высокоаффинного связывания ГАМК и глутаматдекарбоксилазной активности, которые считаются маркерами ГАМК-ергических пресинаптических нервных окончаний. В ЯНКТ активность глутаматдекарбоксилазы достигает уровня, характерного для взрослых животных, на 15-й день постнатального развития, тогда как в зрительной коре и в ВХЧ и после 30-го дня эта ферментативная активность оказывается еще не полностью выраженной [15]. Высокоаффинное связывание ГАМК во всех трех изучаемых областях проявляло выраженный пик на 15-й день онтогенеза, несовпадавший с развитием глутаматдекарбоксилазной активности [15]. Таким образом, различные компоненты ГАМК-ергической передачи развиваются по разной схеме.

В ВХЧ и зрительной коре развитие рецепторов ГАМК, видимо, опережает становление активности глутаматдекарбоксилазы. Наоборот, онтогенез мест связывания ГАМК в ЯНКТ отстает от развития этой ферментативной активности в данной области. Сравнение таких факторов указывает, что образование рецепторов ГАМК не требует индукции со стороны образования функциональных синапсов, что похоже на результаты онтогенетических исследований и других нейромедиаторных систем [17, 18].

Различное по времени появление рецепторов глутамата, бензодиазепаина и ГАМК в зрительных областях позволяет допустить, что глутамат- и ГАМК-ергические передачи по-разному вовлекаются в функцио-

нальное созревание зрительной системы крыс. Характер развития глутаматных рецепторов в зрительной системе указывает на избирательную стабилизацию синаптических контактов путем устранения избытка рецепторных мест связывания, как это предполагали Changeux и Danchin [19]. Совпадение сокращения связывания глутамата с моментом прозревания подчеркивает важность характера опознавания для установления функционально работоспособной нейронной сети.

На основе данных о типах развития рецепторов ГАМК и бензодиаземина нельзя прийти к подобного рода заключениям. Более того, ГАМК-ергическая передача не ограничена лишь одним видом нейронов. Поэтому наблюдаемая картина онтогенеза отражает усредненное влияние различных механизмов развития и может быть к тому же перекрыта эффектами, возникающими под влиянием среды.

Такой же вывод можно сделать и по поводу неодинаковой картины развития рецепторов ГАМК и бензодиаземина. Поэтому явные различия в случае этих двух видов рецепторов в сетчатке и в ЯНКТ на основе современных сведений трудно объяснить.

DEVELOPMENT OF GLUTAMATE, BENZODIAZEPINE, AND GABA BINDING SITES IN RAT VISUAL SYSTEM. A COMPARATIVE STUDY

SCHLIEBS R., ROTHE T.

Paul Flechsig Institute for Brain Research, Department of Neurochemistry,
Karl Marx University, Leipzig, G. D. R.

The postnatal development of glutamate, benzodiazepine and GABA receptors has been studied in the retina, lateral geniculate nucleus, superior colliculus and visual cortex of the rat using radioligand binding techniques.

In the central visual regions the ontogeny of glutamate binding sites precedes that of GABA and benzodiazepine receptors. Highest glutamate binding was already detectable on postnatal day 14. The temporal pattern of the development of benzodiazepine receptors in the visual cortex and in the retina lags behind that of GABA receptors in these regions, whereas in the lateral geniculate nucleus and the superior colliculus benzodiazepine binding precedes that of GABA binding.

The temporal distinct appearance of glutamate, benzodiazepine and GABA receptors in the visual regions suggests that the glutamatergic and GABAergic transmission systems are differently involved in the functional maturation of rat visual system. The development of the glutamate receptors in the central visual regions seems to follow closely the mechanisms of selective stabilization of synaptic contacts, whereas the ontogeny of GABA and benzodiazepine receptors is controlled in a more complex fashion.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Singer W.*—In: *Synergetics of the Brain* (eds. E. Basar, H. Flohr, H. Haken, A. J. Mandell), p. 89—101, Springer, Berlin—West, 1983.
2. *Schiller P. H.* *Vision Res.*, v. 26, p. 1351—1386, 1986.
3. *Fonnum F. J.* *Neurochem.*, v. 42, p. 1—11, 1984.
4. *Roberts P. J., Storm-Mathisen J., Johnston G. A. R.* *Glutamate transmitter in the central nervous system*, John Wiley & Sons, Chichester, 1981.
5. *Parnavelas J. G., McDonald J. K.*—In: *Chemical neuroanatomy* (ed. P. C. Emson), p. 505—549, Raven Press, New York, 1983.
6. *Schwartz J. C., Cortes C. L., Rose C., Quach T. T., Pollard H.* *Progr. Brain Res.*, v. 48, p. 117—129, 1983.
7. *Bigl V., Biesold D., Wetsch K. J.* *Neurochem.*, v. 22, p. 505—509, 1974.
8. *Schliebs R., Kunert E., Bigl V. J.* *Neurochem.*, v. 43, p. 1490—1493, 1984.
9. *Schliebs R., Rothe T., Bigl V.* *Dev. Brain Res.*, v. 24, p. 179—185, 1986.
10. *Schliebs R., Rothe T.* *Gen. Physiol. Biophys.* (submitted), 1987.
11. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265—275, 1951.
12. *Baughman R. W., Gilbert C. D.* *Nature*, v. 287, p. 848—850, 1980.
13. *Baughman R. W., Gilbert C. D.* *J. Neurosci.*, v. 1, p. 427—439, 1981.
14. *Kvale I., Fonnum F.* *Dev. Brain Res.*, v. 11, p. 261—266, 1983.
15. *Kvale I., Fosse V. M., Fonnum F.* *Dev. Brain Res.*, v. 7, p. 137—145, 1983.
16. *Tallman J. F., Gallager D. W.* *Ann. Rev. Neurosci.*, v. 8, p. 21—44, 1985.
17. *Bylund D. B.* *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 16, p. 133—162, 1979.
18. *Coyle J. T., Yamamura H. I.* *Brain Res.*, v. 118, p. 429—440, 1976.
19. *Changeux J. P., Danchin A.* *Nature*, v. 264, p. 705—712, 1976.

Поступила 14. V 1987

Нейропептиды и поведение. т. I. Действие АКТГ, МСГ и опионидных пептидов на ЦНС. Pergamon Press, 480 с., 1985.

Neuropeptides and Behaviour—v. I. CNS effects of ACTG, MSH and opioid peptides (ed. by D. De Wied, W. H. Gispen and T. J. B. Van Vimersma Greidanus). Pergamon Press, Oxford, England, 480 p., 1985.

Этой книгой открывается серия изданий, посвященных нейропептидам и поведению. В настоящем томе описаны нейропептиды, связанные с АКТГ, МСГ, эндорфинами и энкефалинами, а также локализация, распространение и процессинг проопиомеланокортина в мозгу и вилочковой железе. Следующие главы рассматривают их функции в качестве нейротрансмиттеров, нейромодуляторов и нейрогормонов, которые выявлены с помощью электрофизиологических, нейрохимических и нейробиологических исследований. Предметом рассмотрения являются также поведенческие эффекты этих соединений. Книга предназначена для фармакологов, нейрохимиков, нейробиологов и электрофизиологов.



УДК 616.894.02:615.711.1

ЗАВИСИМОСТЬ АКТИВНОСТИ АУТОАДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ
ОТ ИНТЕНСИВНОСТИ СЕКРЕЦИИ НОРАДРЕНАЛИНА

БАЗЯН А. С., КРУГЛИКОВ Р. И.

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии АН СССР, Москва

Исследовали зависимость показателя зоны стабильной секреции, заключенной между α - и β -пресинаптическими аутоадренорецепторами, от интенсивности секреции [^3H] норадреналина (НА) в тангенциальных срезах темной коры мозга крыс. Срезы деполяризовали повышением концентрации KCl с 4,8 до 20, 30, 60 мМ в присутствии 1,3 и 2,6 мМ CaCl_2 в инкубационной среде. У 7–8-месячных животных увеличение концентрации KCl с 20 до 60 мМ при 1,3 мМ CaCl_2 усиливает интенсивность секреции [^3H] НА в 2,87 раза. При этом активность аутоадренорецепторов меняется так, что концентрация НА, соответствующая зоне стабильной секреции, увеличивается в 1000 раз. У 3–4-месячных животных деполяризацию проводили 20 мМ KCl + 1,3 мМ CaCl_2 , 20 мМ KCl + 2,6 мМ CaCl_2 и 30 мМ KCl + 2,6 мМ CaCl_2 . Интенсивность секреции [^3H] НА усиливалась в 1,44, 2,21 и 3,18 раза, а концентрация НА, соответствующая зоне стабильной секреции, увеличивалась соответственно в 10, 25 и 250 раз. Таким образом, обнаружена пропорциональная зависимость между интенсивностью секреции и зоной стабильной секреции. Обсуждаются возможные механизмы данной зависимости.

В предыдущих работах [1–5] было показано, что α - и β -аутоадренорецепторы, активируемые НА, изменяют количество секретируемого медиатора на последующую деполяризацию. Величина и направленность изменений зависит от концентраций НА, активирующих эти рецепторы. Низкие концентрации НА усиливают секрецию, активируя β -аутоадренорецептор. Причем эффект усиления дозозависимо возрастает до определенного предела при увеличении концентрации НА. Дальнейшее увеличение концентрации НА приводит к тому, что усиливающий секрецию медиатора эффект β -аутоадренорецептора, постепенно уменьшаясь, полностью исчезает. При еще большем увеличении концентрации НА наблюдается дозозависимое торможение секреции медиатора вследствие активации α -ауторецепторов. Та концентрация НА, при которой полностью исчезает эффект β -ауторецепторов и еще не проявляется эффект α -ауторецепторов, названа нами зоной стабильной секреции. Зона стабильной секреции—это тот уровень концентрации НА, при котором стабилизируется концентрация секретируемого на каждый импульс ме-

диатора, стабилизируя амплитуду ВПСР после синаптической депрессии или синаптического облегчения в серии пресинаптической импульсации заданной частоты [1, 2].

Теоретический модельный анализ [3] показал, что в адренергических терминалях усиление секреции медиатора при увеличении частоты импульсации связано с изменением активности α - и β -ауторецепторов и сдвигом зоны стабильной секреции в сторону высоких концентраций НА. Таким образом, модельный анализ предсказывает наличие взаимосвязи между интенсивностью секреции медиатора и концентрации НА, при которой образуется зона стабильной секреции. Чем выше зона стабильной секреции, тем выше интенсивность секреции и наоборот.

Целью данной работы является проверка предсказания модельного анализа путем исследования взаимосвязи между интенсивностью секреции НА, вызванной разной степенью деполяризации и зоны стабильной секреции.

Материалы и методы

Опыты проводили на 7—8-месячных самцах белых беспородных крыс, массой 300—350 г и 3—4-месячных, массой 180—230 г.

4 или 8 тангенциальных срезов теменной коры толщиной 0,3 мм инкубировали в 4 или 8 мл двухбуферной (1 мМ Na^+ -фосфатной и 15 мМ бикарбонатной, рН 7,25 при насыщении карбогеном) среды Кребса-Рингера в течение 15 мин, 37°. Затем в данные объемы инкубационной среды добавляли 10 или 20 мкКи соответственно DL-[^3H] НА («Amersham», Англия) с удельной радиоактивностью 10 или 20 Ки/ммоль (конечная концентрация $2,5 \cdot 10^{-11}$ моль/мл НА) и инкубировали еще 10 мин. Срезы в отдельности, но одновременно промывали в течение 30 мин посредством параллельного переноса через каждые 2 мин в чистые инкубационные среды. После промывки определяли спонтанную и вызванную секрецию [^3H] НА из каждого среза. Спонтанную секрецию определяли измерением радиоактивности, накопленной в 1 мл нормальной среды Кребса-Рингера, после 2-минутной инкубации в ней среза. Вызванную секрецию определяли после 2-минутной инкубации среза в 1 мл среды, содержащей 20, 60 мМ KCl, 1,3 мМ CaCl_2 (7—8-месячные животные), или 20 мМ KCl, 1,3 мМ CaCl_2 , 20, 30 мМ KCl, 2,6 мМ CaCl_2 (3—4-месячные животные). Интенсивность секреции S_1 определяли соотношением вызванной секреции к спонтанной. После деполяризации срезы промывали нормальной средой Кребса-Рингера 30 мин и повторно определяли интенсивность секреции S_2 . У каждого среза интенсивность секреции определяли 3 или 5 раз (S_1 — S_3 или S_1 — S_5). У части срезов за 15 мин до повторных исследований интенсивности секреции (S_2 — S_5) в инкубационную среду добавляли 10^{-11} — 10^{-7} М L-НА («Serva», ФРГ). Спонтанную и вызванную секреции в этих срезах определяли в присутствии данной концентрации экзогенного НА. Из отношения интенсивности секреции в присутствии экзогенного НА к интенсивности секре-

ции в его отсутствие определяли влияние данной концентрации НА на интенсивность секреции $[^3\text{H}]$ НА—коэффициент регуляции секреции S [4]. На основании полученных величин S строили дозозависимую кривую активности аутоадренорецепторов. Точку пересечения этой кривой с осью абсцисс определяли как зону стабильной секреции [5]. Для статистической обработки полученных результатов использовали критерии Стьюдента— P_1 , Вилкоксона, для сопряженных пар— P_2 и Вилкоксона-Мана-Уитни— P_{11} .

Результаты исследований

Результаты исследований изменения интенсивности секреции при разной степени деполяризации при двух концентрациях Ca^{2+} представлены в таблице. Увеличение концентрации KCl с 20 до 60 мМ усиливает интенсивность секреции $[^3\text{H}]$ НА у 7—8-месячных животных в 2,87 раза. Увеличение концентрации CaCl_2 с 1,3 до 2,6 мМ при концентрации KCl 20 мМ повышает интенсивность секреции у 3—4-месячных животных в 1,44 раза. Увеличение концентрации KCl до 30 мМ, при CaCl_2 2, 6 мМ усиливает интенсивность секреции в этой группе животных в 3,18 раза по отношению к 20 мМ KCl , 1,3 мМ CaCl_2 и в 2,21 раза по отношению к 20 мМ KCl , 2,6 мМ CaCl_2 .

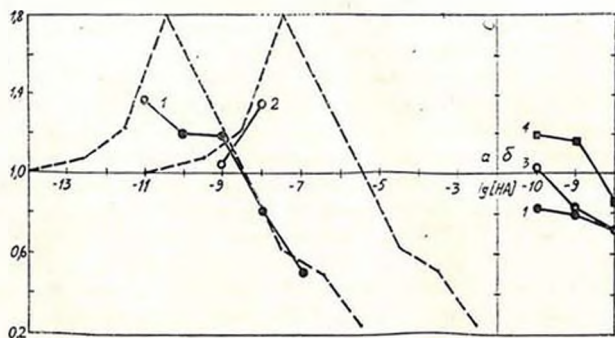


Рис. Зависимость активности аутоадренорецепторов у 7—8-месячных (а) и 3—4-месячных (б) животных от концентрации экзогенного норадреналина при деполяризации срезов коры мозга крыс 20 мМ KCl , 1,3 мМ CaCl_2 (1); 60 мМ KCl , 1,3 мМ CaCl_2 (2); 20 мМ KCl , 2,6 мМ CaCl_2 (3); 30 мМ KCl , 2,6 мМ CaCl_2 (4). Пунктирная линия—теоретическая кривая зависимости активности аутоадренорецепторов от концентрации норадреналина [1—3]. По оси абсцисс—логарифм концентрации норадреналина, по оси ординат—коэффициент регуляции секреции S

У всех пяти групп животных была исследована активность аутоадренорецепторов. Результаты исследований, проведенных на 7—8-месячных животных, представлены на рис., а. График зависимости активности аутоадренорецепторов от концентрации экзогенного НА у этих жи-

вотных при 20 мМ KCl, 1,3 мМ CaCl₂ подробно описан в предыдущих работах [4, 5]. При данных условиях эксперимента зона стабильной секреции равна $5,5 \cdot 10^{-9}$ М НА. При увеличении концентрации KCl до 60 мМ, усиливающей интенсивность секреции [³H] НА в 2,87 раза, характер зависимости активности ауторецепторов от концентрации экзогенного НА резко меняется. При концентрации 10^{-9} М НА наблюдается незначительное повышение интенсивности секреции [³H] НА ($C = 1,05 \pm 0,13$) вместо выраженного усиления секреции при 20 мМ KCl. Концентрация экзогенного НА (10^{-8} М) при 60 мМ KCl достоверно усиливает интенсивность секреции ($C = 1,37 \pm 0,11$; $P_n < 0,05$) вместо достоверного уменьшения интенсивности секреции при 20 мМ KCl. Разница между величинами C в данной точке при 20 и 60 мМ KCl также достоверна ($P_n < 0,01$).

Как видно из рис., а, при 20 мМ KCl зона стабильной секреции образуется на основании обратной зависимости величины C от концентраций экзогенного НА 10^{-9} , 10^{-8} М. При 60 мМ KCl эти концентрации НА приводят к дозозависимому возрастанию величины C, которое свойственно β-аутоадренорецептору. Таким образом, зависимость активности аутоадренорецепторов от концентрации НА сдвигается настолько, что концентрации 10^{-9} , 10^{-8} М НА активируют уже β-аутоадренорецептор. Для наглядности на рис., а пунктирными линиями представили теоретически полученный график [2, 3] так, чтобы он практически совпадал с экспериментальными кривыми (в одном случае — с кривой 1, а в другом — с кривой 2). Из рис., а видно, что при увеличении концентрации KCl с 20 до 60 мМ, усиливающей интенсивность секреции [³H] НА в 2,87 раза, кривые активности аутоадренорецепторов сдвигаются в сторону высоких концентраций НА, а зона стабильной секреции увеличивается в 1000 раз.

Результаты исследований, проведенных на 3—4-месячных животных, представлены на рис., б. График зависимости активности аутоадренорецепторов от концентрации экзогенного НА у этих групп животных при 20 мМ KCl, 1,3 и 2,6 мМ CaCl₂ подробно описаны в предыдущей работе [5]. В присутствии 1,3 мМ CaCl₂ зона стабильной секреции с использованием теоретического графика приравняется к $2,4 \cdot 10^{-11}$ М НА, а в присутствии 2,6 мМ CaCl₂ — $2,4 \cdot 10^{-10}$ М НА. При деполяризации срезов 30 мМ KCl, 2,6 мМ CaCl₂ концентрация экзогенного НА 10^{-10} М усиливает интенсивность секреции [³H] НА ($C = 1,18 \pm 0,06$; $P_z = 0,01$), достоверно отличаясь от того же показателя при 20 мМ KCl, 1,3 мМ CaCl₂ ($P_t < 0,05$). Концентрация НА 10^{-9} М также усиливает интенсивность секреции ($C = 1,16 \pm 0,06$; $P_z < 0,05$), достоверно отличаясь от того же показателя при 20 мМ KCl, 1,3 и 2,6 мМ CaCl₂ ($P_t < 0,01$). При 10^{-8} М НА интенсивность секреции уменьшается ($C = 0,86 \pm 0,04$; $P_z < 0,01$), но незначительно отличается от данного показателя при 20 мМ KCl. Как видно из рис., б, зона стабильной секреции при 30 мМ KCl и 2,6 мМ CaCl₂ соответствует $6 \cdot 10^{-9}$ М НА. Таким образом, проведенные исследования показали пропорциональную зависимость между изменениями интенсивности секреции НА и зоной

стабильной секреции. Чем больше интенсивность секреции, тем выше зона стабильной секреции.

Анализ величин интенсивности секреции [^3H] НА показал, что зона стабильной секреции, в отличие от интенсивности секреции, является индивидуальным для каждого животного показателем, обладающим достаточно большой вариабельностью. Например, в группе 7—8-месячных животных при 20 мМ КСl и 1,3 мМ СаСl₂ коэффициент вариации S равен 14,2%, а коэффициент вариации зоны стабильной секреции равен 135,7%. Вследствии этого изменения зоны стабильной секреции могут выявляться при достаточном изменении степени деполяризации, или, что одно и то же, при достаточном изменении интенсивности секреции. Групповой характер зоны стабильной секреции проявляется в сравнении результатов, полученных при исследовании 7—8- и 3—4-месячных животных. Средние величины интенсивности секреции [^3H] НА в этих группах при 20 мМ КСl и 1,3 мМ СаСl₂ не отличаются (таблица), а величины С у 7—8-месячных животных достоверно выше, чем у 3—4-месячных при 10^{-10} и 10^{-9} М НА ($P < 0,01$, рис., а и б). Зона стабильной секреции у 7—8-месячных крыс в 230 раз выше, чем у 3—4-месячных при коэффициенте вариации зоны стабильной секреции у 3—4-месячных животных—106,4%. Такой сдвиг зоны стабильной секреции связан, по-видимому, с возрастными изменениями у животных. Так как зона стабильной секреции определяется как концентрация секретируемого НА, а интенсивность секреции, то есть количество секретируемого НА в этих группах не отличается, то причиной увеличения концентрации, которая создается секретируемым НА, может быть уменьшение свободного межклеточного пространства мозга, вызванное возрастными морфологическими изменениями, например, ростом и делением ганглийных клеток или другими морфологическими изменениями.

Обсуждение результатов

Таким образом, проведенные теоретические [3] и экспериментальные исследования показали прямую зависимость между интенсивностью секреции НА и уровнем зоны стабильной секреции: чем выше интенсивность секреции, тем выше уровень зоны стабильной секреции. Следовательно, увеличение степени деполяризации, повышение внеклеточной концентрации Са²⁺ и увеличение частоты стимуляции, усиливающие секрецию НА, повышают уровень зоны стабильной секреции, сдвигая чувствительность аутоадренорецепторов в сторону высоких концентраций НА. Было показано [6], что активность α -аутоадренорецептора уменьшается при увеличении частоты стимуляции или повышении концентрации Са²⁺. Исследования в основном проводили при одной концентрации лиганда. Полученные нами результаты показывают, что уменьшение активности α -аутоадренорецепторов, наблюдаемое в этих работах, в основном, связано со сдвигом всей кривой активности рецептора в сторону высоких концентраций НА (рис., б). В литературе имеется указание [7]

на то, что при увеличении интенсивности стимуляции активность β -ауто-рецептора уменьшается. Эти результаты также получены при одной концентрации агониста. Если бы при исследовании 7—8-месячных животных мы использовали бы только концентрацию 10^{-9} М НА, то на основании полученных результатов при данной концентрации сделали бы точно такой вывод, как и авторы цитируемой работы.

Таблица

Интенсивность секреции [3 H] норадреналина из срезов коры мозга крыс

Группы животных	Условия деполяризации	Сер	Количество животных	P _i
7—8-месячные животные	20 мМ KCl, 1,3 мМ CaCl ₂	2,15±0,09	13	<0,001
	60 мМ KCl, 1,3 мМ CaCl ₂	6,28±0,37	5	
3—4-месячные животные	20 мМ KCl, 1,3 мМ CaCl ₂	2,18±0,11	8	<0,01
	20 мМ KCl, 2,6 мМ CaCl ₂	3,14±0,26	8	
	30 мМ KCl, 2,6 мМ CaCl ₂	6,93±0,48	11	

На основании полученных данных можно объяснить результаты работ, указывающих на отсутствие активности α -аутоадренорецепторов при чрезмерной интенсивности стимуляции [6] и ее появление при уменьшении концентрации Ca^{2+} в инкубационной среде. Чрезмерная интенсивность стимуляции настолько сдвигает чувствительность аутоадренорецепторов, что исследуемые концентрации лигандов оказываются ниже чувствительности рецепторов. Уменьшение внеклеточной концентрации Ca^{2+} снижает уровень зоны стабильной секреции, то есть чувствительность ауторецепторов увеличивается, сдвигаясь вниз по концентрации НА, вследствие чего и исследуемая концентрация лиганда опять попадает в зону чувствительности ауторецептора.

Теоретический анализ предсказал [3], что изменение частоты импульсации, в первую очередь, влияет на активность аутоадренорецепторов, следствием чего является изменение интенсивности секреции медиатора. Такая последовательность событий определяется как прямая реакция, так как основным способом перекодировки информации в мозгу является частота импульсной активности. Для экспериментального увеличения интенсивности секреции были использованы или высокие концентрации Ca^{2+} при одинаковой степени деполяризации, или более интенсивная деполяризация. Данный способ увеличения интенсивности секреции был применен для определения зависимости изменения активности аутоадренорецепторов от изменения интенсивности секреции (обратная связь).

Возможные механизмы сдвига кривых активности аутоадренорецепторов и уровня зоны стабильной секреции при изменении частоты импульсации подробно обсуждены ранее [3]. Пресинаптические адренорецепторы осуществляют регуляцию секреции НА через ряд ферментативных реакций: аутоадренорецептор—аденилатциклаза (АЦ)—сАМР— Ca^{2+} -канал [6].

Увеличение степени деполяризации или концентрации Ca^{2+} в инкубационной среде приводит, в первую очередь, к повышению Ca^{2+} -тока внутрь терминалей, что влияет на регуляцию Ca^{2+} -зависимых процес-

сов (активности протеникиназой и АЦ-реакции) [8]. Так как количество открываемых Ca^{2+} -каналов определяется содержанием сАМР, осуществляющей протеникиназную реакцию в присутствии Ca^{2+} , то логично предположить, что количество открываемых Ca^{2+} -каналов и активность АЦ находятся в состоянии динамического равновесия. Следовательно, увеличение Ca^{2+} -тока влияет на активность АЦ. Последняя, в свою очередь, аллостерическим механизмом [8] изменяет активность аутоадренорецепторов, что в конечном счете приводит к сдвигу кривых активности аутоадренорецепторов так, как это проявляется в наших исследованиях. Возможно, что обратная реакция (повышение Ca^{2+} -тока, увеличение интенсивности секреции—повышение зоны стабильной секреции) осуществляется описанным выше способом.

DEPENDENCE OF AUTOADRENORECEPTORS ACTIVITY FROM THE INTENSIVITY OF NORADRENALINE SECRETION

BAZYAN A. S., KRYGLIKOV R. I.

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

Dependence of the index of the zone of stabile secretion (between α and β presynaptic adrenoreceptors) from the intensivity of ^3H -NA secretion in tangential slices of rat parietal lobe has been studied. The slices have been depolarized by increasing KCl concentration from 4,8 to 20, 30 and 60 mM in the presence of 1,3 and 2,6 mM CaCl_2 in the media. In 7—8 months old animals increase of KCl from 20 to 60 mM (CaCl_2 —1,3 mM) enhances ^3H -NA secretion 2,8-fold and leads to a 1000-fold increase in NA concentration in a stabile secretion zone. In 3—4 months-old animals depolarization was carried out with 20 mM KCl/1,3 mM CaCl_2 , 20 mM KCl/2,6 mM CaCl_2 , 30 mM KCl/2,6 mM CaCl_2 . Intensivity of ^3H -NA secretion enhanced 1,44, 2,21 and 3,18-fold, and NA concentration, corresponding to the zone of stabile secretion, increased 10, 25 and 250-fold, respectively. Thus, a correlation between the intensivity and the zone of secretion has been established. The possible mechanisms of this phenomenon are discussed.

ЛИТЕРАТУРА

1. Базян А. С., Бродский Б. А. Биофизика, т. 28, № 5, с. 858—862, 1983.
2. Базян А. С. Биофизика, т. 29, № 3, с. 470—472, 1984.
3. Базян А. С., Беркинблит М. Б., Бродский Б. А. Биофизика, т. 29, № 5, с. 895—898, 1984.
4. Базян А. С., Кругликов Р. И. Нейрохимия, т. 5, № 2, с. 172—179, 1986.
5. Базян А. С., Кругликов Р. И. Нейрохимия, т. 5, № 3, с. 231—240, 1986.
6. Базян А. С. Успехи соврем. биол., т. 92, № 4, с. 115—126, 1981.
7. Celuch S. M., Dubocovich M. L., Langer S. Z. Brit. J. Pharmacol., v. 63, № 1, p. 97—109, 1978.
8. Гислов Р. Н., Крыжановский Г. Н. Функциональная биохимия синапсов, М., Медицина, 1987.

Поступила 25. VI 1987



УДК 577.113.3:576.354.46

ДЕЙСТВИЕ NAD^+ НА ВЫСВОБОЖДЕНИЕ ДОФАМИНА И СЕРОТОНИНА ИЗ СИНАПСОМ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

ХАЛМУРАДОВ А. Г., КУЧМЕРОВСКАЯ Т. М., ПАРХОМЕЦ П. К.

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

Изучали действие NAD^+ на высвобождение $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ дофамина и $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ серотонина из предварительно обогащенных ими синапсом головного мозга крыс. Показано, что NAD^+ в конечной концентрации $1,1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ стимулирует высвобождение $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ дофамина и $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ серотонина из синапсом наиболее выражено через 10 мин инкубации на 38 и 61% соответственно по сравнению со спонтанным процессом. По характеру модулирующего действия на синаптическую мембрану NAD^+ в обоих случаях напоминает эффект высоких концентраций KCl (90 мМ)—известного деполяризующего агента. При совместном внесении в среду инкубации стимулирующие эффекты NAD^+ и KCl на высвобождение $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ дофамина и $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ серотонина из синапсом не суммируются. Эффект NAD^+ на высвобождение $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ дофамина носит дозозависимый характер и наиболее выражен при концентрации, равной $1,1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$.

Модулирующее синаптическую мембрану действие NAD^+ опосредовано наличием Ca^{2+} в среде. В бескальциевой среде, как и в присутствии верапамила, стимулирующий эффект NAD^+ на высвобождение $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ дофамина и $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ серотонина из синапсом не реализуется.

По-видимому, нейромодуляторное действие NAD^+ осуществляется путем деполяризации мембраны и опосредованной Ca^{2+} стимуляции высвобождения дофамина и серотонина из первичных терминалей.

На синаптических мембранах коры головного мозга крыс ранее нами была выявлена высокоспецифическая система взаимодействия NAD^+ с двумя участками связывания, характеризующимися высоким ($K_{d1} = 3,3 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) и низким ($K_{d2} = 14,4 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) сродством к рецептору [1]. Были приведены доказательства, что синаптический мембранный рецептор NAD^+ является сложным липопротеидным комплексом с углеводным микроокружением, локализованным на наружной стороне мембраны, и для его взаимодействия с лигандом существенное значение имеют SH-группы аминокислотных остатков белкового компонента [2].

Эти данные проливают свет на механизм выявленного в нашей лаборатории концентрационнозависимого сдвига электрических свойств гладкомышечных клеток *taenia coli* и мочевого пузыря морской свинки при аппликации никотинамидных нуклеотидов [3, 4]. Не исключена

также вероятность, что в основе благоприятного терапевтического эффекта NAD^+ и его предшественников—никотинамида и никотиновой кислоты при лечении шизофрении, эпилепсии и психозов различной этиологии [5—7] лежит взаимодействие перечисленных соединений со специфическими структурами синаптических мембран головного мозга, приводящее к реализации еще окончательно не распознанной последовательности функциональных ответов возбудимых клеток.

С целью выяснения возможного физиологического значения взаимодействия NAD^+ с синаптическими мембранами в настоящей работе мы изучили действие NAD^+ на высвобождение дофамина и серотонина из предварительно обогащенных этими нейромедиаторами синапсом головного мозга крыс.

Материалы и методы

Фракцию синапсом получали из клеток коры больших полушарий, продолговатого и промежуточного отделов головного мозга крыс-самцов линии *Wistar* массой 120—180 г по методу Abila и соавт. [8]. Чистоту и морфологическую нативность выделенных синапсом контролировали электронно-микроскопическим путем [1].

Синапсомы обогащали $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ дофамином или $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ серотином («Amersham», Англия) в среде ранее описанного состава [1], содержащей $1 \cdot 10^{-5}$ М ипрониазида—ингибитора MAO. При этом в инкубационную среду (6 мл) вначале вносили белок синапсом (6 мг) и пробу преникубировали 5 мин при 37° на водяной бане при постоянном перемешивании. Затем в пробы добавляли 0,26 мкМ $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ дофамина или 1,48 мкМ $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ серотонина и продолжали инкубировать в течение 10 мин при 37° , постоянно перемешивая. По завершении инкубации пробы центрифугировали при 105000 g на препаративной ультрацентрифуге VAC 601 (ГДР) в течение 5 мин при 4° . Осадок синапсом дважды промывали 0,32 М сахарозой. Аликвоту (0,2 мл) надосадочной фракции вносили в сцинтилляционную жидкость ЖС-103 (5 мл) и измеряли не поглощенную синапсомами радиоактивность на счетчике «Intertechnique SL-30» (Франция).

При изучении характера высвобождения $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ дофамина и $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ серотонина под действием различных агентов обогащенные пробы синапсом (6 мг белка) вносили в инкубационную среду (6 мл) и тщательно перемешивали при 37° на водяной бане. После этого в пробы в зависимости от специфики эксперимента вносили NAD^+ ($1,1 \cdot 10^{-3}$ М), KCl (90 мМ), ЭГТА (3—4 мМ), верапамил ($1,7 \cdot 10^{-4}$ М) как в отдельности, так и в сочетании, проводя инкубацию в течение различных интервалов времени при 37° . После инкубации пробы центрифугировали при 105000 g в течение 5 мин при 4° . В аликвотах (0,2 мл) надосадочной жидкости измеряли высвободившуюся из синапсом радиоактивность. Высвобождение $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ дофамина или $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ серотонина из синапсом в описанных выше условиях выражали в % и в имп/мин/мг белка. Содержание белка определяли по Lowry и соавт. [9].

Полученные результаты обрабатывали статистически [10].

Результаты и обсуждение

Типичная динамика спонтанного высвобождения $[2-^{14}\text{C}]$ дофамина из предварительно нагруженных им синапсом головного мозга крыс отображена на рис. 1. Как видно из направленности кривой, начальная скорость спонтанного высвобождения указанного нейромедиатора достаточно высока. В результате этого за 5 и 10 мин инкубации

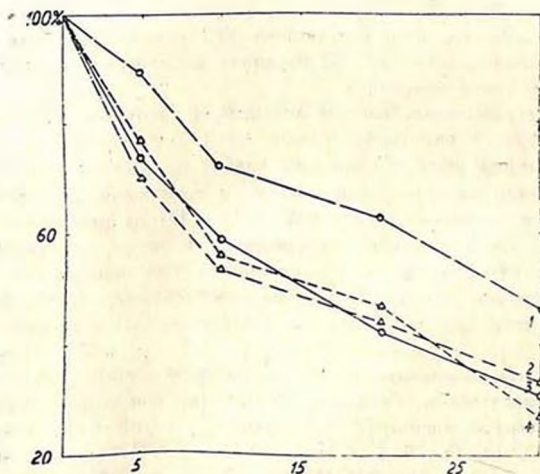


Рис. 1. Действие Na^+ на высвобождение $[2-^{14}\text{C}]$ дофамина из синапсом головного мозга крыс (каждая точка соответствует средним данным из 7 опытов). По оси абсцисс — время инкубации (мин), по оси ординат — уровень накопления (%). 1 — спонтанное высвобождение; 2 — 90 мМ Na^+ ; 3 — 1,1 мМ Na^+ ; 4 — 1,1 мМ Na^+ + 90 мМ KCl .

синапсом высвобождают соответственно 12 и 28% заключенного в них $[2-^{14}\text{C}]$ дофамина. По мере дальнейшего удлинения времени инкубации скорость процесса спонтанного высвобождения нейромедиатора из синапсом несколько замедляется, что сказывается на уровне высвобождения, который через 15, 20 и 30 мин составляет соответственно 32, 37 и 52%.

Известно, что высвобождение нейромедиаторов из синапсом индуцирует ряд факторов, вызывающих деполяризацию мембраны. К ним относят электрическую стимуляцию, повышение внеклеточной концентрации калия, воздействие вератридином или ядом скорпиона, торможение функционирования натриевого насоса оубаином или путем уменьшения внеклеточной концентрации Na^+ . Однако вызванная высокой концентрацией K^+ деполяризация признается более специфичной при изучении скорости высвобождения нейромедиаторов, чем другие факторы, включая электростимуляцию [11].

Поэтому, исходя из вышесказанного, в своих исследованиях в качестве агента, деполяризующего мембрану синапсом, мы избрали высокие концентрации KCl. Из рис. 1, 2, видно, как добавление в инкубационную среду, содержащую обогащенные $[2-^{14}\text{C}]$ дофамином синапсомы, KCl в концентрации 90 мМ вызывает резкое увеличение скорости высвобождения нейромедиатора. В результате этого через 5, 10, 15, 20 и 30 мин инкубации высвобождение составляло соответственно 25, 43, 51, 56 и 68%. Причем характерно, что, как и в случае спонтанного высвобождения, под действием KCl наиболее высокая скорость процесса высвобождения $[2-^{14}\text{C}]$ дофамина из синапсомы отмечается в в начальные сроки инкубации.

Мы уже упоминали, что при аппликации никотинамидных нуклеотидов на полоски гладкомышечной ткани *taenia coli* морской свинки в нашей лаборатории были установлены сдвиги их электрической активности [12]. Было сделано предположение о возможном деполяризующем эффекте определенных концентраций NAD^+ [13] на мембраны возбудимых клеток, опосредованном высвобождением некоторых нейромедиаторов в синаптическую щель. Правомочность подобного предположения проверяли, изучая действие NAD^+ на высвобождение $[2-^{14}\text{C}]$ дофамина из предварительно обогащенных им синапсом клеток головного мозга крыс.

Когда в инкубационную среду, содержащую обогащенные $[2-^{14}\text{C}]$ дофамином синапсомы, вносили NAD^+ в конечной концентрации $1,1 \cdot 10^{-3}$ М высвобождение $[2-^{14}\text{C}]$ дофамина из синапсомы явно усиливалось. За 5, 10, 15, 20 и 30 мин действия NAD^+ на высвобождение $[2-^{14}\text{C}]$ дофамина составляло 27, 41, 50, 57 и 70% соответственно (рис. 1, 3). Если скорость высвобождения $[2-^{14}\text{C}]$ дофамина из синапсомы при действии NAD^+ сравнить с таковой, имеющей место при действии KCl, то можно убедиться в существовании параллелизма в действии этих деполяризующих факторов (рис. 1, 2, 3). Иными словами, каждый из них, вызывая деполяризацию мембраны, стимулирует практически одинаковую скорость высвобождения $[2-^{14}\text{C}]$ дофамина из синапсомы. Даже при условии сочетанного их действия эффекты двух этих факторов не суммируются (рис. 1, 4).

Представленные данные служат достаточным основанием для отнесения NAD^+ к числу агентов, деполяризующих мембрану синапсомы и таким путем регулирующих скорость высвобождения нейромедиаторов в синаптическую щель. Разумеется, подобный эффект NAD^+ должен носить дозозависимый характер, как на это указывают результаты электрофизиологических исследований, проведенных в нашей лаборатории [3, 4].

Сказанное подтверждается данными, приведенными на рис. 2: индуцируемое действием NAD^+ высвобождение $[2-^{14}\text{C}]$ дофамина из синапсомы наиболее выражено при концентрации никотинамидного динуклеотида, равной $1,1 \cdot 10^{-3}$ М, а при концентрации, равной $1 \cdot 10^{-10}$, $6 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-5}$ М, стимулирующий высвобождение эффект отсутствует.

Вероятно, при этих концентрациях NAD^+ вместо деполяризации мембраны происходит ее гиперполяризация, в результате чего высвобождение нейромедиатора в синаптическую щель подавляется. Подобное явление имело место при аппликации высоких концентраций NAD^+ ($1.1 \cdot 10^{-5}$ — $1 \cdot 10^{-3}$ М) на гладкомышечные клетки *taenia coli* и мочевого пузыря морских свинок, когда наблюдаемая при концентрациях NAD^+ , равных $1 \cdot 10^{-10}$ — $1 \cdot 10^{-6}$ М, гиперполяризация мембраны сменялась существенной ее деполяризацией [3].

Полученные в настоящей работе данные наводят на мысль о том, что регулирующее высвобождение нейромедиаторов действие никотинамидного динуклеотида в клетках головного мозга крыс распространяется на дофамин и, вероятно, на другие медиаторы.

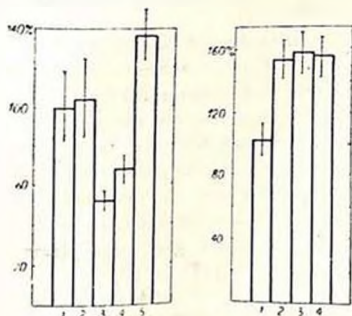


Рис. 2. Зависимость высвобождения $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ дофамина из синапсом головного мозга крыс в % от концентрации NAD^+ в среде (каждая точка соответствует средним данным из 7 опытов). 1—спонтанное высвобождение; 2— 10^{-10} М NAD^+ ; 3— $6 \cdot 10^{-6}$ М NAD^+ ; 4— $5 \cdot 10^{-5}$ М NAD^+ ; 5— $1.1 \cdot 10^{-3}$ М NAD^+ .

Рис. 3. Действие NAD^+ на высвобождение $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ серотонина из синапсом головного мозга крыс (в %). 1—спонтанное высвобождение; 2—90 мМ KCl; 3—1.1 мМ NAD^+ ; 4—1.1 мМ NAD^+ + 90 мМ KCl.

В связи с этим, учитывая биогенетическую общность NAD^+ и серотонина в тканях животных, в частности в головном мозгу, нами было изучено действие NAD^+ на эффективность высвобождения $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ серотонина из синапсом головного мозга крыс при соблюдении точно тех же условий опыта, что и при изучении высвобождения $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ дофамина. Принимая во внимание, что наиболее высокая скорость высвобождения $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ дофамина из синапсом под влиянием NAD^+ отмечалась через 10 мин после начала инкубации, опыты с $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ серотонином были проведены при таком же отрезке времени.

Из данных, представленных на рис. 3, видно, что если при деполяризации мембраны синапсом посредством KCl (90 мМ) высвобождение $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ серотонина увеличивается почти на 60% по сравнению со спонтанным процессом, то точно такой же эффективностью действия на высвобождение $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ серотонина из синапсом обладает и NAD^+ (в конечной концентрации $1.1 \cdot 10^{-3}$ М). Когда же в инкубационную среду вносили одновременно KCl (90 мМ) и NAD^+ ($1.1 \cdot 10^{-3}$ М), высвобождение $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ серотонина из синапсом оставалось на том же уровне (57%), что и при раздельном добавлении указанных деполяризующих агентов.

Иными словами, по характеру действия на высвобождение $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ дофамина и $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ серотонина NAD^+ напоминает KCl—широко используемый деполяризующий агент. Отсюда следует, что установленное на-

ми высокоспецифическое взаимодействие NAD^+ с синаптической мембраной [1] в одинаковой мере стимулирует секрецию дофамина и серотонина, вероятно, подобно KCl вызывая деполяризацию мембраны.

Судя по тому, как действие NAD^+ на высвобождение указанных нейромедиаторов противоположно направлено эффектам ATP , ADP , AMP , аденозина и аденина, являющихся отрицательными модуляторами высвобождения АХ, катехоламинов и дофамина из пресинаптических окончаний [13—15], можно утверждать действительное наличие на синаптической мембране специфического рецептора NAD^+ [2], отличного по топографии и свойствам от известных пуриновых и аденозиновых рецепторов. Вероятно, это объясняется наличием в структуре NAD^+ , помимо аденозинового, еще и никотинамиднонуклеотидного фрагмента [16].

Известно, что в высвобождении нейромедиаторов важная роль принадлежит ионам кальция. Зависимость от Ca^{2+} — универсальная характеристика активного секреторного процесса как нейромедиаторов, так и гормонов. Фактором сопряжения деполяризации и высвобождения медиаторов является увеличение пассивного поступления Ca^{2+} внутрь нервного окончания. В опытах на гигантском аксоне кальмара с использованием внутриклеточно введенного флуоресцентного белка-маркера (экворина), реагирующего со свободным Ca^{2+} , показана хорошая корреляция между уровнем деполяризации, высвобождением медиатора и концентрацией накопленного в нервном окончании Ca^{2+} [17].

Таблица

Высвобождение $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ дофамина и $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ серотонина
(имп/мин/мг белка, 10 мин) из синапсом головного мозга
крыс под действием некоторых факторов ($n=8$)

Условия опыта	Высвобождение	
	$[2\text{-}^{14}\text{C}]$ дофамина	$[2\text{-}^{14}\text{C}]$ серотонина
Спонтанное	719±61	995±99
NAD^+ (1,1 мМ)	1051±68*	1609±123*
KCl (90 мМ)	1006±63*	1589±154*
NAD^+ (1,1 мМ) + KCl (90 мМ)	1011±49*	1563±136*
NAD^+ (1,1 мМ) + ЭГТА (3—4 мМ)	140±12*	348±33*
KCl (90 мМ) + ЭГТА (3—4 мМ)	114±10*	236±21*
NAD^+ (1,1 мМ) + верапамил ($1,7 \cdot 10^{-4}$ М)	264±23*	409±36*
KCl (90 мМ) + верапамил ($1,7 \cdot 10^{-4}$ М)	644±57*	1080±64*
NAD^+ (1,1 мМ) + KCl (90 мМ) + верапамил ($1,7 \cdot 10^{-4}$ М)	337±29*	562±43*

Примечание. * различия во всех случаях по отношению к соответствующему воздействию достоверны, $0,01 > p > 0,001$.

С целью выяснения вопроса о том, насколько вызванные NAD^+ деполяризация мембраны и стимуляция высвобождения $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ дофамина и $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ серотонина из синапсом имеют отношение к Ca^{2+} , мы провели серию опытов с использованием агентов, хелатирующих Ca^{2+} (ЭГТА) и препятствующих его транспорту внутрь синапсом (верапамил).

Результаты этих экспериментов суммированы в таблице, из которой видно, что в среде, свободной от Ca^{2+} , то есть, когда весь Ca^{2+} был связан внесенным в среду ЭГТА (3—4 мМ), индуцированное КСI высвобождение $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ дофамина и $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ серотонина уменьшалось соответственно на 91 и 86% по сравнению с контролем (действием КСI в среде без ЭГТА). Примерно то же самое происходило и при действии NAD^+ в бескальциевой среде, когда уменьшение высвобождения $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ дофамина и $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ серотонина составляло соответственно 87 и 79% по сравнению с имеющим место при действии NAD^+ в среде без ЭГТА.

Уменьшение высвобождения обоих нейромедиаторов из синапсом было обнаружено нами и при использовании верапамила—известного антагониста Ca^{2+} . Так, при внесении в среду инкубации верапамила в концентрации $1,7 \cdot 10^{-4}$ М, высвобождение $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ дофамина и $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ серотонина тормозилось на 76 и 75% соответственно в случае деполяризации мембран КСI и на 75 и 62% соответственно при внесении в среду NAD^+ в качестве деполяризующего агента. Когда же в среду одновременно вносили КСI, NAD^+ и верапамил, высвобождение $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ дофамина и $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ серотонина из синапсом составило 33 и 35% по сравнению с опытами, в которых среда содержала КСI и NAD^+ одновременно.

Таким образом, при любой постановке эксперимента модулирующее мембрану синапсом действие NAD^+ , так же как и в случае КСI, опосредовалось ионами кальция.

Совокупность представленных в настоящей работе данных позволяет заключить, что NAD^+ вызывает деполяризацию мембран синапсом, индуцируя усиление высвобождения дофамина и серотонина из нервных окончаний, и этот процесс опосредован наличием Ca^{2+} . Следовательно, физиологическое значение взаимодействия NAD^+ с синаптической мембраной заключается в его нейромодуляторных эффектах, посредством которых регулируются процессы высвобождения дофамина и серотонина из нервных окончаний.

Установленные различными авторами благоприятные терапевтические эффекты никотинамида, никотиновой кислоты и их биологически активной формы— NAD^+ при излечивании шизофрении, эпилепсии и психозов различной этиологии [5—7], вероятно, реализуются посредством изложенных в настоящем исследовании механизмов контроля за секрецией нейромедиаторов.

EFFECT OF NAD ON DOPAMINE AND 5-HYDROXYTRIPTAMINE RELEASE FROM RAT BRAIN SYNAPTOSOMES

KHALMURADOV A. G., KUCHMEROVSKAYA T. M., PARKHOMETS P. K.

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

The effect of NAD^+ on the release of $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ dopamine and $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ serotonin from preliminarily enriched by these neurotransmitters rat

brain synaptosomes has been studied. It is demonstrated that NAD^+ (10 min incubation, 1,1 mM) stimulates release from synaptosomes of $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ dopamine (for 38%) and $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ serotonin (for 61%) compared to the spontaneous release. The ability of NAD^+ to stimulate release of these neurotransmitters from synaptosomes is similar to the action of high concentration of KCl but simultaneous addition of NAD^+ and KCl in the incubation mixture does not lead to the further increase in $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ dopamine and $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ serotonin release.

Effect of NAD^+ on the release of $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ dopamine depends on the dose of NAD^+ and is much more pronounced when 1,1 mM NAD^+ is used. Modulating effect of NAD^+ on the synaptic membranes is realized only in the presence of Ca^{2+} : in calcium-free media, as well as in the presence of verapamil, the stimulating effect of NAD^+ on the release of dopamine and serotonin from synaptosomes is not observed.

The conclusion is made that neuromodulatory action of NAD^+ on Ca^{2+} -dependent dopamine and serotonin release is realized by means of synaptic membrane depolarization.

ЛИТЕРАТУРА

1. Халмурадов А. Г., Пархомец П. К., Кучморовская Т. М., Чичковская Г. В. Биохимия, т. 48, вып. 8, с. 1287—1292, 1983.
2. Кучморовская Т. М., Пархомец П. К., Чичковская Г. В., Халмурадов А. Г., Романская О. П. Нейрохимия, т. 4, № 4, с. 374—379, 1985.
3. Романенко А. В. Укр. биохим. журн., т. 52, № 5, с. 624—627, 1980.
4. Халмурадов А. Г., Романенко А. В., Шуба М. Ф. Укр. биохим. журн., т. 53, № 1, с. 79—82, 1981.
5. Зыков Б. В.—В кн.: Неврология и психиатрия, с. 167—170, Киев, Наукова думка, 1971.
6. Крыжановский Г. Н., Шамдра А. А., Макулькин Р. Ф., Лобасюк Б. А., Годлевский Л. С. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 90, № 7, с. 37—41, 1980.
7. Пантюхова О. Н. Журн. невропатол. и психиатрии, т. 56, № 4, с. 323—324, 1956.
8. Abita J. P., Chicheportiche R., Schweitz H., Lasdunski M. Biochemistry, v. 16, № 9, p. 1838—1864, 1971.
9. Lowry O. H., Rosebrough J. N., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., v. 193, № 1, p. 265—275, 1951.
10. Ойвин Н. А. Журн. патол. физиол. эксперим. терап., т. 4, с. 76—85, 1960.
11. Segawa T., Murakami H., Inoue A., Tanaka Y. J. Neurochem., v. 30, № 1, p. 175—180, 1978.
12. Романенко А. В. Автореферат канд. дисс., с. 21, Киев, 1981.
13. Hedvist P., Fredholm B. B. Arch. Pharm., v. 293, p. 217—223, 1976.
14. Verhaeghe R. H., Vanhoutte P. M., Shepard J. T. Circulat. Res., v. 40, p. 203—215, 1977.
15. Michuells Mary L., Michaelis E. K., Miers S. L. Life Sci., v. 24, № 22, p. 2083—2092, 1979.
16. Халмурадов А. Г., Кучморовская Т. М., Пархомец П. К., Клименко А. П., Арутюнян А. В., Моисеян Н. О. Нейрохимия, т. 6, № 1, с. 133—138, 1987.
17. Douglas W. W., Rubin R. P. J. Physiol., v. 159, p. 40—57, 1961.

Поступила 28. VIII 1986



УДК 612.884:615.212

О РОЛИ ГАМК В ИЗМЕНЕНИИ БОЛЕВОЙ
ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ
НОЦИЦЕПТИВНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ

ИГНАТОВ Ю. Д., АНДРЕЕВ Б. В.

I Медицинский институт им. И. П. Павлова, Ленинград

Изучена взаимосвязь между изменением обмена ГАМК и болевой чувствительностью при хроническом ноцицептивном воздействии. Установлено, что при повреждении седалищного нерва сначала происходит активация синтеза и катаболизма ГАМК в коре больших полушарий, переднем мозгу и стволе, а затем угнетение инактивации ГАМК и повышение ее уровня в структурах промежуточного мозга. Усиление ГАМК-ергических процессов сопровождалось снижением болевой чувствительности в тесте отдергивания хвоста, но не в тесте вокализации. Билигуалин и пикротоксин полностью устраняли проявления гипоальгезии, возникающей через 1 месяц после повреждения седалищного нерва. В эти же сроки достоверно возрастал болеутоляющий эффект депакина и ТНП*, а действие баклофена не изменялось. Через 2 месяца ГАМК-негативные препараты не оказывали влияния на проявления гипоальгезии, тогда как эффект депакина и ТНП существенно снижался. В то же время анальгезия, вызываемая баклофеном, усиливалась. Предполагается, что снижение болевой чувствительности при длительном ноцицептивном воздействии обусловлено вовлечением ГАМК-ергических механизмов, причем в зависимости от длительности ноцицептивной стимуляции реализация этого процесса осуществляется через различные типы ГАМК-рецепторов.

В последние годы установлено, что при ноцицептивном воздействии происходит активация процессов ГАМК-ергической передачи, которая рассматривается как одна из адаптивных реакций организма, направленных на поддержание нейрохимического и энергетического гомеостаза в ЦНС [1, 2]. ГАМК-ергические механизмы, по-видимому, имеют определенное значение и в модуляции активности антиноцицептивных систем, поскольку ГАМК-негативные препараты уменьшают выраженность анальгезии, возникающей при стимуляции центрального серого вещества среднего мозга и при стрессе [3]. Однако все эти данные получены в условиях кратковременного ноцицептивного раздражения. При длительной ноцицептивной стимуляции характер и направленность нейроме-

ТНП—4, 5, 6, 7-тетрагидроизоксазол /4,5 с/ пиридин-3-ол

диаторной перестройки, а также нейрохимическое обеспечение антиноцицептивных систем имеют определенные различия [4]. Подобная закономерность установлена, в частности, для опиоидергических процессов [5, 6]. Поэтому целью настоящей работы явилось изучение обмена ГАМК при хроническом ноцицептивном воздействии и выявление возможной взаимосвязи между изменением активности процессов ГАМК-ергической передачи и показателями болевой чувствительности.

Материалы и методы

Опыты были выполнены на белых крысах-самцах массой 180—230 г, содержащихся в режиме свободного доступа к пище и воде. Ноцицептивное воздействие вызывали путем повреждения седалищного нерва [7]. У крыс под нембуталовым наркозом (45 мг/кг) в средней части бедра выделяли седалищный нерв, на который накладывали полихлорвиниловую трубку с диаметром, меньшим диаметра нерва на 1 мм. С помощью нихромовой проволоки нерв ущемляли на протяжении 5 мм и подшивали к мышцам бедра. У всех животных за день до операции и затем еженедельно на протяжении двух месяцев определяли болевую чувствительность с помощью тестов отдергивания хвоста (tail-flick) и вокализации [8, 9]. Часть животных (по 15 крыс в каждой подгруппе) через 1 и 2 месяца после повреждения седалищного нерва декапитировали и выделяли кору больших полушарий, передний, межзатылочный и продолговатый мозг. Уровень ГАМК, активность глутаматдекарбоксилазы (ГДК) и ГАМК-трансаминазы (ГАМК-Т) оценивали с помощью общепринятых биохимических методов [10, 11]. В другой группе животных ($n=60$) в эти же сроки исследовали влияние ГАМК-негативных (биккукуллин, пикротоксин) и ГАМК-позитивных (баклофен, депакин, ТНIP) препаратов на болевую чувствительность. Все вещества вводили внутривентрикулярно: биккукуллин («Sigma», США)—1,5 мг/кг за 7 мин, пикротоксин («Sigma», США)—1,75 мг/кг за 20 мин, депакин («Labaz», Франция)—400 мг/кг за 30 мин, ТНIP (любезно предоставлен проф. Р. Krogsgaard-Larsen, Дания)—10 мг/кг и баклофен («Ciba-Geigy», Швейцария)—7,5 мг/кг за 60 мин до опыта.

Все исследуемые показатели оценивали в одно и то же время суток: с 10 до 11 ч. Контролем служили ложно оперированные животные. Статистическую обработку осуществляли с помощью методов параметрической и непараметрической статистики.

Результаты исследований

Через 1 месяц после повреждения седалищного нерва наблюдали отчетливое повышение активности ГДК и ГАМК-Т в коре больших полушарий, переднем мозгу и стволовых структурах в среднем до 44% и 44,5% (рис. 1). Содержание ГАМК в этих структурах практически не изменялось. При увеличении продолжительности опыта до 2-х меся-

цез изменения активности ГДК и ГАМК-Т в большинстве образований мозга были менее отчетливыми (рис. 1). В то же время в межзачечном мозгу отмечено достоверное снижение активности ГАМК-Т и повышение уровня ГАМК, тогда как активность ГДК существенно не изменялась.

Длительное ноцицептивное воздействие приводило к достоверному увеличению латентного периода болевой реакции в тесте tail-flick в среднем на 50% через 1 месяц и на 64% через 2 месяца после операции, тогда как в тесте вокализации показатели болевой чувствительности существенно не изменялись на всем протяжении опыта (рис. 2). Бикукуллин и пикротоксин восстанавливали латентный период отдергивания хвоста до исходных величин. Однако при увеличении длительно-

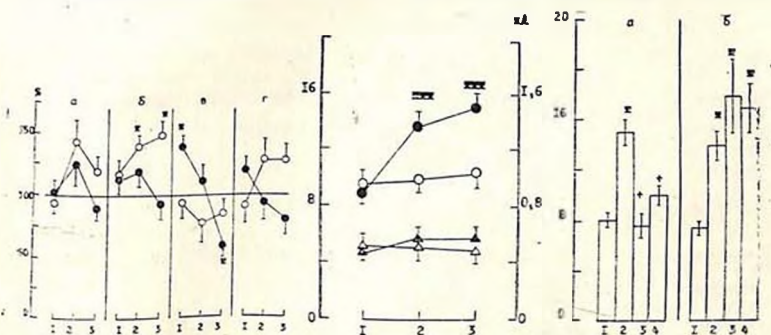


Рис. 1. Изменение обмена ГАМК в коре больших полушарий (а), переднем мозгу (б), межзачечном мозгу (в) и стволе (г) при хроническом ноцицептивном воздействии. По оси ординат: изменение содержания ГАМК, активности ГДК и ГАМК-Т в % от контрольного уровня. 1—ГАМК, 2—ГДК, 3—ГАМК-Т через 1 месяц после повреждения седалищного нерва (○); показатели обмена ГАМК через 2 месяца после операции (●). * $p < 0,05$

Рис. 2. Изменение показателей болевой чувствительности при хроническом ноцицептивном воздействии. По левой оси ординат—латентный период болевой реакции (с) в тесте отдергивания хвоста; по правой оси ординат—пороги возникновения вокализации при электростимуляции корня хвоста в мА. ○—контроль, ●—опыт (латентный период отдергивания хвоста), ▲—контроль, ▲—опыт (пороги возникновения вокализации). По оси абсцисс: 1—исходные показатели болевой чувствительности, 2, 3—их изменение через 1 и 2 месяца после повреждения седалищного нерва соответственно. *** $p < 0,001$

Рис. 3. Влияние бикукуллина и пикротоксина на проявления гипоальгезии через 1 месяц (а) и 2 месяца (б) после повреждения седалищного нерва. По оси ординат: латентный период отдергивания хвоста (с). 1—исходные показатели болевой чувствительности, 2—показатели болевой чувствительности через 1 и 2 месяца после повреждения седалищного нерва, 3—бикукуллин (1,5 мг/кг), 4—пикротоксин (1,75 мг/кг). * $p < 0,001$ (по сравнению с исходным уровнем), + $p < 0,001$ (по сравнению с опытной группой).

сти эксперимента до 2-х месяцев эти препараты не обладали таким действием и даже несколько увеличивали время болевой реакции в тесте tail-flick (рис. 3).

Болеутоляющее действие баклофена через 1 месяц после повреждения седалищного нерва было сопоставимо с его эффектом в контрольной группе, а анальгезия, вызываемая в эти же сроки депаксином и ТНПР, достоверно увеличивалась (таблица). Однако это наблюдалось

Таблица

Влияние ГАМК-позитивных препаратов на болевую чувствительность в различные сроки после повреждения седалищного нерва

Условия эксперимента	Латентный период отдергивания хвоста (с)			Порог локализации (мА)		
	исходный	после препарата	%	исходный	после препарата	%
Баклофен—7,5 мг/кг						
Контроль	14,2±0,7	19,6±2,5	138*	0,38±0,09	0,58±0,06	153***
Через 1 месяц после операции	15,0±0,8	19,8±0,8	132*	0,54±0,03	0,82±0,02	152***
Через 2 месяца после операции	15,7±1,1	29,7±0,3	189*** ++	0,50±0,06	1,05±0,05	210*** ++
Депаксин—400 мг/кг						
Контроль	13,9±1,1	23,6±2,4	170**	0,50±0,03	0,74±0,05	148***
Через 1 месяц после операции	16,3±0,6	27,0±1,4	166**	0,53±0,06	0,01±0,11	190***
Через 2 месяца после операции	15,7±1,3	16,8±1,6	107** ++	0,54±0,02	1,65±0,04	120*** ++
ТНПР—10 мг/кг						
Контроль	14,0±1,0	25,2±2,3	180**	0,43±0,03	0,70±0,05	163**
Через 1 месяц после операции	14,3±0,5	29,6±0,3	207***	0,47±0,03	1,00±0,08	213** +
Через 2 месяца после операции	13,4±0,9	16,3±1,3	122* ++	0,45±0,05	0,67±0,07	149***

Примечание. Интенсивность термического воздействия у контрольных животных снижали таким образом, чтобы латентный период отдергивания хвоста в опытной и контрольной группах существенно не отличался. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (по сравнению с исходным уровнем); + $p < 0,05$; ++ $p < 0,01$; +++ $p < 0,001$ (по сравнению с контрольной группой; критерий t-Стьюдента).

только в тесте вокализации, но не в тесте tail-flick. Введение баклофена через 2 месяца после начала опыта приводило к усилению его болеутоляющего эффекта. Причем в тесте tail-flick латентный период болевой реакции возрастал у большинства животных до 30 с, то есть до максимальной величины. В то же время болеутоляющее действие депаксина и ТНПР у крыс с повреждением седалищного нерва было достоверно ниже, чем у контрольных животных (таблица).

Обсуждение результатов

Предполагается, что повреждение периферических нервных стволов у животных приводит к возникновению болевого синдрома, идентичного хроническому болевому синдрому у человека [12, 13]. Однако подобная точка зрения разделяется не всеми авторами [14]. Сопоставление результатов этих экспериментов с данными, полученными ранее [1, 3], свидетельствует, что ущемление седалищного нерва, как и другие виды болевого раздражения (электрическое, механическое, химическое), вызывает изменение обмена ГАМК и болевой чувствительности. Более того, как при кратковременной болевой стимуляции, так и при повреждении седалищного нерва происходят принципиально однотипные сдвиги метаболизма ГАМК, проявляющиеся сначала активацией ее синтеза и катаболизма, а затем—угнетением ферментативной инактивации и повышением уровня ГАМК, что, как известно, сопровождается увеличением активности процессов ГАМК-ергической передачи [15, 16].

Поскольку одним из факторов, способствующих возникновению хронического болевого синдрома, является недостаточность тормозных механизмов [17, 18], то усиление тормозных ГАМК-ергических процессов как на начальных, так и на последующих этапах болевого воздействия может иметь существенное значение в угнетении ноцицептивной импульсации [17]. По-видимому, этот эффект ГАМК обусловлен воздействием процессов ГАМК-ергической передачи в деятельность антиноцицептивных систем, следствием чего и является возникновение гипоальгезии. Правомочность такого предположения подтверждается нашими экспериментами, а также данными других авторов [5] о способности ГАМК-негативных препаратов ослаблять, а ГАМК-позитивных веществ—усиливать гипоальгезию. В пользу этого свидетельствует и то обстоятельство, что дополнительная активация процессов ГАМК-ергической передачи при введении баклофена, депакина и THIP способствовала усилению эндогенных антиноцицептивных влияний, ориентированных на подавление не только перцептивных (тест tail-flick), но и аффективных (тест вокализации) проявлений боли, которые, как известно, не изменяются или даже усиливаются при хроническом ноцицептивном воздействии [19, 20].

Как следует из представленных данных, способность ГАМК-ергических веществ модулировать болевую чувствительность на фоне хронической ноцицептивной стимуляции существенно зависела от длительности воздействия, а также от их влияния на ГАМК_A или ГАМК_B-рецепторы. Эти факты, по нашему мнению, могут свидетельствовать о том, что на различных этапах адаптационной перестройки к хроническому болевому воздействию участие отдельных подтипов ГАМК-рецепторов в подавлении боли, а следовательно, и в деятельности антиноцицептивных систем неоднозначно. Действительно, бикикуллин и пикротоксин, антагонисты исключительно ГАМК_A-рецепторов [21, 22], устраняли гипоальгезию только через 1 месяц после повреж-

дения седалищного нерва. В эти же сроки депакин и THIP: болеутоляющий эффект которых, как предполагается, реализуется через ГАМК_A (депакин) или через оба типа (THIP) ГАМК₁ рецепторов [3, 23], вызывали более сильную анальгезию. В то же время усиление действия селективного агониста ГАМК_B-рецепторов баклофена [22] возникало только через 2 месяца после начала болевого воздействия. Весьма вероятно, что одним из факторов, способствующих изменению эффекта ГАМК-ергических препаратов, является возникновение разно-модальных сдвигов функциональной активности ГАМК-рецепторов. Правомочность такого заключения подтверждается данными, свидетельствующими о принципиальной возможности разнонаправленного изменения плотности ГАМК_A- и ГАМК_B-рецепторов при длительной ноцицептивной стимуляции [24]. Установлено также, что колебания уровня глюкокортикоидов, возникающие в различные периоды хронического болевого синдрома [19], могут приводить как к увеличению, так и к снижению аффинности ГАМК_A-рецепторов [25].

GABA PARTICIPATION IN MODULATION OF PAIN SENSITIVITY UNDER THE CONDITIONS OF PROLONGED NOCICEPTIVE INFLUENCES

IGNATOV Yu. D., ANDREEV B. V.

I. P. Pavlov First Leningrad Medical Institute

Correlation between GABA-synthesis, GABA-catabolism and sensitivity to pain was studied under the conditions of prolonged nociceptive influences. Activation of GABA synthesis and GABA catabolism in the cortex, forebrain and brain stem was the first step of GABA-system reaction on *N. ishiadicus* alteration and the second step is inhibition of GABA inactivation (increase of GABA level) in mesencephalon. Increase in GABA-ergic processes correlates with decrease in pain sensitivity in tail-flick test, but not in vocalisation test. Bicuculline and picrotoxine abolished hypoalgesia produced by alteration of *N. ishiadicus* (1 month after operation). At the same time analgesic effect of depakin and THIP was increased. GABA-negative drugs have no effects on hypoalgesia 2 months after operation, but depakin and THIP effects significantly decreased. Analgesia produced by baklophen was increased. It was considered, that inhibition of pain sensitivity under the conditions of prolonged nociceptive influences is produced by positive GABA-ergic mechanisms. Multiple GABA-ergic receptors are involved in different steps of prolonged nociceptive stimulation.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мессерон Ф. Э. Адаптация, стресс и профилактика, М., Наука, 1981.
2. Игнатов Ю. Д., Андреев Б. В.—В кн.: Нейрофармакологические аспекты боли (под ред. Ю. Д. Игнатова), с. 61—81, Л., 1 АМН, 1982.

3. Игнатов Ю. Д., Андреев Б. В., Сытинский И. А. Успехи соврем. биол., т. 99, с. 22—37, 1985.
4. Abbott F. M., Melzack R., Samuel Ch. Exper. Neurology, v. 75, p. 654—651, 1982.
5. Lewis J. W., Cannon J. T., Liebeskind J. C. Science, v. 208, p. 623—625, 1980.
6. Lewis J. M., Sherman J. E., Liebeskind J. C. J. Neurosci., v. 1, p. 358—363, 1981.
7. Кривцов В. В. Автореф. канд. дис., Благовещенск, 1961.
8. Örgen S. O., Holm A. C. J. Neural Transmission, v. 47, p. 253—271, 1980.
9. Андреев Б. В., Васильев Ю. Н., Косинский В. П., Марусов Н. Б.—В кн.: Нейрофармакологические аспекты эмоционального стресса и лекарственной зависимости (под ред. А. В. Вальдмана), с. 38—48, Л., 1 АМН, 1978.
10. Sutton I., Simmonds M. A. Biochem. Pharmacol., v. 23, p. 1801—1808, 1974.
11. Lowe J. P., Robins E., Eyerman G. S. j. Neurochem., v. 3, p. 8—18, 1958.
12. Levitt M., Heubach J. P. Pain, v. 10, p. 67—73, 1983.
13. Wiesenfeld Z., Hallin R. G. Pain, v. 16, p. 145—153, 1983.
14. Rodin B. E., Kruger L. Brain Res., v. 7, p. 213—218, 1984.
15. Tapia R. Front. Hormone Res., v. 6, p. 86—103, 1980.
16. Krogsgaard-Larsen P. J. Med. Chemistry, v. 24, p. 1377—1383, 1981.
17. Крыжановский Г. Н. Вестн. АМН СССР, № 9, с. 33—37, 1980.
18. Смолин Л. Н. Автореф. докт. дис., М., 1981.
19. Гуляев Г. В. Вестн. АМН СССР, № 9, с. 67—69, 1980.
20. Лебедева М. Н. Тезисы докл. Всесоюзн. конф. «Фармакологические аспекты обезболивания», с. 133, Л., 1983.
21. Olsen R. W. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., v. 22, p. 247—277, 1982.
22. Bowery N. G., Price G. W., Hudson A. L., Hill D. R., Wilkin G. P., Turnbull M. J. Neuropharmacology, v. 23, p. 219—231, 1984.
23. Hill R. C., Maurer R., Buescher H. H., Roemer D. Eur. J. Pharmacol., v. 69, p. 221—224, 1981.
24. Макарова Е. П., Андреев Б. В.—В кн.: Нейрофармакологическая регуляция болевой чувствительности (под ред. Ю. Д. Игнатова), с. 80—89, Л., 1 АМН, 1984.
25. Majewska M. D., Bisslerbe J. C., Eskay R. L. Brain Res., v. 33 9, p. 178—182, 1985.

Поступила 14. III 1987



ВЛИЯНИЕ ОСТРОГО СТРЕССОРНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ
НА ПОВЕДЕНИЕ И НЕКОТОРЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ
ПОКАЗАТЕЛИ У МЫШЕЙ ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ
C57BL/6 и DBA/2 С РАЗЛИЧНЫМ ПОТРЕБЛЕНИЕМ
АЛКОГОЛЯ В УСЛОВИЯХ СВОБОДНОГО ВЫБОРА

ГАМАЛЕЯ Н. Б., ВЕКШИНА Н. А., ШУМАЙЛОВ Н. Н.

ВНИИ общей и судебной психиатрии им. В. П. Сербского, Москва

У мышей линии C57BL/6 и DBA/2 с различным генетически закрепленным отношением к алкоголю выявлена неодинаковая реакция на 60-минутное электроболовое раздражение лап электрическим током частотой 50 Гц, напряжением 10 В, превышающим каждую мин. Мыши линии DBA/2 (отвергающие этанол) хорошо адаптировались к стрессорному воздействию, что проявлялось лучшей выживаемостью, меньшим количеством прыжков и менее выраженной реакцией писка, чем у мышей линии C57BL/6, предпочитающих этанол. Мыши линии DBA/2 характеризовались в обычных условиях существенно более высоким уровнем адреналина в надпочечниках и серотонина в крови, чем мыши линии C57BL/6. При электроболовом раздражении у мышей линии DBA/2 отмечено выраженное повышение уровня дофамина в мозгу и крови, снижение уровня серотонина в крови и адреналина в надпочечниках. Свойства серотониновых рецепторов в мозгу животных изучаемых линий существенно не отличались в норме и не менялись под влиянием стрессорного воздействия. Аналогичные результаты получены при изучении уровня эндогенного этанола. Сделано заключение об относительно большей устойчивости мышей линии DBA/2 по сравнению с мышами линии C57BL/6 к кратковременному стрессорному воздействию, в основе которой может лежать ряд выявленных особенностей обмена биогенных аминов в мозгу и на периферии характеризующих эти линии мышей.

К настоящему времени накоплено много данных в пользу существования генетической предрасположенности к развитию алкоголизма. Одним из доказательств является существование стабильных линий лабораторных животных (мышей и крыс), предпочитающих в условиях свободного выбора раствор этанола или воду. Примером таких животных являются, в частности, мыши линий C57BL/6 и DBA/2, предпочитающие или отвергающие алкоголь соответственно [1], а также крысы линий AA (предпочитающие алкоголь) и ANA (отвергающие алкоголь), селекционированные по алкогольному предпочтению из родоначальной линии *Long Evans* [2]. Изучение биологических особенностей животных, предпочитающих алкоголь, в сравнении с животными, отвергаю-

шими этанол, является одним из путей решения проблемы предрасположенности к развитию алкоголизма, что имеет важное значение для разработки комплексных мер профилактики. В связи с наличием убедительных данных о значительной роли стресса в развитии алкоголизма у людей [3] представляет интерес определение чувствительности к воздействию стрессорных факторов лабораторных животных с генетически закрепленными различиями в характере алкогольной мотивации и выявление возможных биологических коррелятов. Целью настоящей работы явилось изучение влияния острого стрессорного воздействия на поведение и некоторые биохимические показатели у мышей инбредных линий C57BL/6 и DBA/2.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на мышах-самцах линий C57BL/6 и DBA/2 массой 18—20 г. Моделью острого стрессорного воздействия явилось электроболевое раздражение лап в камере с полом из металлических прутьев, на которые подавали переменный ток с частотой 50 Гц и напряжением 10 В. Каждую секунду ток прерывали с помощью прерывателя. Продолжительность стрессорного воздействия составляла 60 мин.

У мышей определяли уровни дофамина (ДА), норадреналина (НА) и серотонина (5-ОТ) в целом мозгу, уровни адреналина (А), НА и ДА в надпочечниках и уровни ДА и 5-ОТ в цельной крови. Биогенные амины определяли спектрофлуорометрическим методом [4]. В целом мозгу определяли также состояние серотониновых рецепторов методом радиорецепторного связывания [5] с использованием [^3H]-5-ОТ (У. А. 14,4 Ки/ммоль) в концентрациях от 0,5 до 1 пмоль и немеченого 5-ОТ в концентрации 10 мкмоль. в крови мышей—уровень эндогенного этанола методом газовой хроматографии [6].

Статистическую обработку проводили по t -критерию Стьюдента, о корреляционной связи судили по коэффициенту корреляции r .

Результаты исследования

Для определения уровня потребления алкоголя мышей помещали на 14 дней в индивидуальные клетки со свободным доступом к сухому корму и градуированным поилкам с водой и 10%-ным раствором этанола. Показатели первых трех дней не учитывали. У мышей линии C57BL/6 среднесуточное потребление 10% этанола составляло 110 ± 4 мл/кг (54—65% от всего объема выпитой жидкости), а у мышей линии DBA/2— $20,0 \pm 2,0$ мл/кг (7,1—9,5% от всего объема выпитой жидкости), что соответствует литературным данным [7].

Изучение поведения мышей при нанесении электроболевого раздражения выявило следующие особенности. Мыши линии DBA/2 лучше адаптировались к электроболевому раздражению лап, их поведение было более спокойным, они меньше прыгали и пищали. Подсчет числа прыжков в первые 5 мин электрического раздражения выявил значи-

мые различия: у мышей линии DBA/2 количество прыжков составило $6,8 \pm 3,3$, а у мышей линии C57BL/6— $56,8 \pm 6,9$ (различие достоверно, $p < 0,001$). В процессе стрессорного воздействия некоторые мыши C57BL/6 погибали. Сравнение общей двигательной активности мышей этих линий до воздействия стресса не выявило различий. Пороги электрошолевой чувствительности, о которых судили по появлению писка и прыжков, у мышей указанных линий были сходными.

Таблица 1

Биохимические особенности линий мышей, предпочитающих или отвергающих алкоголь в условиях свободного выбора (фоновые показатели)

Линия Ткань (ед. измерения)	C 57 BL 6 (n=12)			DBA 2 (n=14)		
Мозг (нг/г)	ДА 235 ± 25	НА 292 ± 42	5-ОТ 674 ± 31	ДА 181 ± 20	НА 275 ± 12	5-ОТ 634 ± 31
Надпочечники (нг/мг)	А 454 ± 54	НА 247 ± 34	5-ОТ $5,60 \pm 2,20$	А 601 ± 47 ($p < 0,05$)	НА 231 ± 29	ДА $6,80 \pm 2,50$
Кровь (нг/мл)	ДА 213 ± 17	5-ОТ 2062 ± 171 ($p < 0,01$)	ДА 5-ОТ $0,11 \pm 0,02$	ДА 235 ± 26	5-ОТ 1361 ± 122	ДА 5-ОТ $0,20 \pm 0,03$ ($p < 0,05$)

Примечание: Здесь и в табл. 2 статистическую обработку проводили по t-критерию Стьюдента (двусторонняя критическая область). Сравнение показателей (p) проведено между группами исследованных линий мышей. А—адреналин, ДА—дофамин, НА—норадреналин, 5-ОТ—серотонин.

Таблица 2

Биохимические особенности линий мышей, предпочитающих или отвергающих алкоголь в условиях свободного выбора, после стрессорного воздействия.

Линия Ткань (ед. измерения)	C 57 BL 6 (n=18)			DBA/2 (n=20)		
Мозг (нг/г)	ДА 317 ± 36	НА 278 ± 17	5-ОТ 681 ± 33	ДА 252 ± 16	НА 238 ± 36	5-ОТ 686 ± 24
Надпочечники (нг/мг)	А 439 ± 21	НА 234 ± 16	5-ОТ $13,6 \pm 3,0$	А 391 ± 43	НА 180 ± 21	ДА $10,1 \pm 3,3$
Кровь (нг/мл)	ДА 202 ± 25	5-ОТ 1519 ± 236	ДА 5-ОТ $0,17 \pm 0,04$	ДА 442 ± 89 ($p < 0,05$)	5-ОТ 982 ± 115	ДА 5-ОТ $0,37 \pm 0,06$ ($p < 0,05$)

Базальное значение исследованных нейробиохимических параметров у мышей представлены в табл. 1, а соответствующие показатели после стрессорного воздействия в табл. 2. Как видно из таблиц, отличительной особенностью мышей линии C57BL/6, предпочитающих этанол в условиях свободного выбора, является более низкий уровень А в надпочечниках и более высокий уровень 5-ОТ в крови, чем у мышей DBA/2, отвергающих этанол. В ответ на электрошолевое раздражение лап у мышей обеих линий отмечены однонаправленные изменения уровней биогенных аминов в целом мозгу, при этом у мышей линии DBA/2 повышение уровня ДА достигало статистической значимости ($p < 0,01$), а стрессорное воздействие вызывало выраженное (на 37%) снижение уровня А в надпочечниках ($p < 0,01$) до уровня, близкого к таковому

у мышей линии C57BL/6, и более значительное, хотя и не достигающее статистической достоверности, снижение уровня НА в надпочечниках. В крови у мышей линии DBA/2 стресс вызывал достоверное повышение уровня ДА ($p < 0,05$) и снижение уровня 5-ОТ ($p < 0,05$), что определяло и существенное повышение показателя ДА/5-ОТ ($p < 0,05$), характеризующего баланс между ДА- и 5-ОТ-ергической системами.

При исследовании свойств серотониновых рецепторов в целом мозгу мышей были выявлены некоторые различия в сродстве рецепторов к 5-ОТ и в уровне общего специфического связывания, не достигавшие, однако, уровня статистической значимости. У мышей C57BL/6 базальные значения K_d составили $3,5 \pm 0,7$ пмоль, тогда как у мышей DBA/2— $2,5 \pm 0,5$ пмоль. После стрессорного воздействия эти значения составили $4,3 \pm 0,5$ и $5,0 \pm 0,6$ пмоль соответственно. B_{max} (в фмоль/мг белка) у мышей C57BL/6 составляла $222,0 \pm 51,0$ до стресса и $198,2 \pm 46,5$ после стресса, а у мышей DBA/2 $152,55 \pm 20,0$ и $218,0 \pm 25,6$ соответственно.

Определение уровня эндогенного этанола у одних и тех же животных до и после стрессорного воздействия не позволило выявить статистически значимых различий. Средний уровень эндогенного этанола у мышей линии C57BL/6 составил $31,9 \cdot 10^{-4} \pm 1,6 \cdot 10^{-4} \%$ до стресса, а у мышей линии DBA/2— $32,8 \cdot 10^{-4} \pm 2,5 \cdot 10^{-4} \%$. После стресса соответствующие значения были равны $34,8 \cdot 10^{-4} \pm 4,0 \cdot 10^{-4} \%$ и $31,7 \cdot 10^{-4} \pm 2,3 \cdot 10^{-4} \%$.

Обсуждение результатов

Из данных литературы известно, что инбредные линии мышей C57BL/6 и DBA/2 характеризуются рядом биологических особенностей. Одним из отличительных признаков является характер алкогольной мотивации, которому соответствует различная скорость метаболизма этанола и ацетальдегида. Мыши линии C57BL/6 предпочитают этанол в условиях свободного выбора и характеризуются высокой активностью альдегид- и алкогольдегидрогеназ по сравнению с мышами линии DBA/2 [1]. В работе Но и соавт. [8] выявлена еще одна отличительная особенность мышей линии C57BL/6: существенно более высокий уровень АХ в целом мозгу и более низкая активность АХЭ по сравнению с мышами линии DBA/2. Авторам не удалось обнаружить существенных различий у мышей обеих линий по таким нейрохимическим показателям, как уровень ДА, НА и 5-ОТ в целом мозгу, а также интенсивность захвата [3H]НА и [3H]ДА гомогенатами целого мозга.

В проведенном исследовании мы также не выявили значимых различий в уровнях биогенных аминов при исследовании целого мозга мышей тех же линий. Однако Ходорова и соавт. [9] установили значимые различия в уровнях 5-ОТ и НА в отдельных областях мозга мышей линии C57BL/6 и CBA (с низкой алкогольной мотивацией). Полученные нами результаты о высоком уровне А в надпочечниках у мышей линии DBA/2 совпали с данными Ciranello и соавт. [10], ко-

торые отмечали высокую концентрацию А и НА в надпочечниках у мышей этой линии.

Примененная в работе модель острого стрессорного воздействия позволила выявить некоторые различия в поведении мышей линии C57BL/6 и DBA/2. Кратковременное воздействие электрического тока вызывало более выраженные биохимические изменения у мышей линии DBA/2, физиологическое состояние которых в процессе воздействия стресса нарушалось в меньшей степени. У мышей обеих линий был отмечен подъем уровня ДА в целом мозгу, достигший у мышей линии DBA/2 уровня статистической значимости ($p < 0.01$). В литературе мы также находим сведения о том, что кратковременное стрессорное воздействие (иммобилизационный стресс в течение 35 мин) способствовало ускорению синтеза ДА в мезолимбических дофаминовых нейронах у крыс [11], тогда как более длительное и сильное воздействие (иммобилизационный стресс в сочетании с раздражением электрическим током в течение 3 ч) вызывало снижение уровня ДА и НА в среднем мозгу и гипоталамусе крыс [12].

У мышей линии DBA/2 с низкой алкогольной мотивацией стрессорное воздействие вызывало выраженное снижение уровня А (в 1,57 раза, $p < 0.01$) в надпочечниках и существенное повышение (в 1,85 раза, $p < 0.05$) показателя ДА/5-ОТ в крови, связанное как со снижением уровня 5-ОТ, так и с повышением уровня ДА и свидетельствующее о преобладании в крови катехоламинергической активности. У мышей линии C57BL/6 стресс не вызывал существенного изменения исследованных биохимических параметров.

Интересно отметить, что между степенью предпочтения этанола и уровнем ДА в крови мышей после стресса была выявлена существенная отрицательная корреляция ($r = -0.44$, $p < 0.05$), а между степенью предпочтения этанола и концентрацией 5-ОТ в крови после стресса — положительная корреляция ($r = 0.392$), приближающаяся к уровню статистической достоверности.

В связи с существующей гипотезой, согласно которой важным фактором формирования алкогольной мотивации является низкий уровень эндогенного этанола и повышенная скорость элиминации этанола [13], у мышей линии C57BL/6 и DBA/2 было проведено определение эндогенного этанола. Нам, однако, не удалось выявить значимых различий в этом показателе между изучаемыми линиями мышей, хотя Ходорова и соавт. [9] отметили повышение у мышей линии C57BL/6 скорости элиминации тест-дозы этанола из кровяного русла, тогда как у мышей линии DBA/2 (с низкой алкогольной мотивацией) скорость элиминации этанола из крови была снижена. В нашем исследовании уровень эндогенного этанола в крови мышей после воздействия электрошолевого раздражения практически не изменился, так что этот показатель является менее чувствительным, чем уровень биогенных аминов.

Полученные нами данные об относительно большей устойчивости мышей линии DBA/2, отвергающих алкоголь в условиях свободного

выбора, к кратковременному стрессорному воздействию (электроболевое раздражение лап) и соответственно большей чувствительности мышечной линии C57BL/6 можно сопоставить с данными, представленными в работе Бурова [14] о высокой конкурентоспособности в борьбе за биологически значимые цели у крыс, потребляющих малые количества алкоголя, а также с данными об увеличении у крыс с исходно высокой алкогольной мотивацией периферического и центрального пула β -эндорфина как показателя стрессорной готовности этой группы животных [15].

На основании проведенных нами исследований можно прийти к выводу, что мыши линий DBA/2 и C57BL/6 наряду с выраженными отличиями в потреблении алкоголя в условиях свободного выбора по-разному реагируют на электроболевое раздражение лап, что может быть связано с рядом биологических особенностей, в том числе с базальным уровнем А в надпочечниках и его изменением под влиянием стресса, а также с характером изменения в результате воздействия электроболевого раздражения уровней ДА и 5-ОТ в крови. Нельзя исключить, конечно, и роли других факторов, не исследованных в данной работе, в частности, состояния эндогенной опиатной системы и др. Проведенные нами исследования подтверждают значение генетически детерминированных биологических особенностей лабораторных животных в обеспечении их устойчивости к стрессорным воздействиям. На возможность генетического контроля реакции катехоламинов плазмы (А, НА) в ответ на воздействие иммобилизационного стресса, а также влияния этанола на характер этой реакции у крыс указали Vogel и Deturck [16]. Для более определенных выводов о причинно-следственных связях между потреблением алкоголя в условиях свободного выбора и характером реакции на стрессорное воздействие, а также рядом нейрохимических особенностей необходимо проведение сравнения линии мышей C57BL/6 также с другими линиями мышей, отвергающих этанол (например, CBA).

THE INFLUENCE OF ACUTE STRESS ON BEHAVIOR AND SOME BIOCHEMICAL PARAMETERS IN INBRED LINES OF MICE C57 BL/6 AND DBA/2 WITH DIFFERENT FREE CHOICE ALCOHOL CONSUMPTION

GAMALEYA N. B., VEKSHINA N. L., SHUMAYLOV I. N.

All-Union Institute of General and Forensic Psychiatry, Moscow

Different reaction to acute stress (electric footshock produced by alternating current, 50 Hz, 10 v, interrupted every second, lasting for 60 minutes) was observed in two inbred lines of mice C57 BL/6 and DBA/2 with different genetically determined attitude to alcohol. The DBA/2 mice (rejecting alcohol) adapted well to stress, which was manifested by better survival, fewer jumps and weaker peeping reaction,

than in C57 BL/6 mice (preferring alcohol). The DBA/2 mice were characterized by higher basal levels of epinephrine in adrenals as well as higher levels of serotonin in blood in comparison with the C57 BL/6 mice. In the DBA/2 mice the electric footshock produced a pronounced increase in dopamine levels in the whole brain and blood, a decrease in serotonin levels in blood and epinephrine levels in adrenals. The properties of serotonergic receptors, in brains of mice of the mentioned lines did not differ significantly before stress nor changed under the influence of stress. The analogous results were obtained when the levels of endogenous ethanol were studied. It's concluded that the mice of the DBA/2 line are more resistant to acute stress than the mice of the C57 BL/6 line which can be based on some biochemical properties of their biogenic amines metabolism in brain and periphery.

ЛИТЕРАТУРА

1. Festing M. F. W. Inbred strains in biomedical research. Medical Research Council Laboratory Animals Centre Carshalton, Surrey, U. K., 1979.
2. Eriksson K. Ann. Med. exp. Fenn., v. 49, p. 67-72, 1971.
3. Linsky A. S., Murray A. S., Colby J. P. J. Stud. Alcohol, v. 46, p. 72-80, 1985.
4. Котан Б. М., Нечасов Н. В. Лаб. дело, № 5, с. 301-304, 1979.
5. Diggory G. L., Buckett W. R. Neuropharmacology, v. 24, p. 275, 1985.
6. Кудрявцев Р. В., Ушакова М. М. Судебно-медицинская экспертиза, № 3, М., Медгиз, 1980.
7. Майский А. И., Шошина С. В.—В сб.: Фармакология экспериментального алкоголизма, с. 28-42. М., 1982.
8. Ho A. K. S., Tsal C. S., Kissin B. Pharmac. Biochem. and Behav., v. 3, p. 1073-1076, 1975.
9. Ходорова Н. А., Власова Н. В., Майский А. И. Бюл. эксперим. биол. и мед., № 9, с. 284-285, 1984.
10. Ciranello R. D., Barchas S., Kessler S., Barchas J. D. Life Sci., v. 11, p. 565, 1972.
11. Watanabe H. Neuropharmacology, v. 23, p. 1335-1338, 1984.
12. Станишевская А. В., Мезенцева Л. Н. Фармакология и токсикология, № 1, с. 9-12, 1977.
13. Буров Ю. В., Ведерникова Н. Н. Нейрохимия и фармакология алкоголизма, с. 63. М., Медицина, 1985.
14. Буров Ю. В.—В сб.: Биологические основы алкоголизма, с. 149-155, М., 1984.
15. Буров Ю. В., Ведерникова Н. Н. Нейрохимия и фармакология алкоголизма с. 124, М., Медицина, 1985.
16. Vogel W. H., Deturek K. H.—In: Stress and alcohol use (ed. Pohorecky L. A., Brick J.), p. 429-438, Elsevier Biomed. Press, New York, 1983.

Поступила 15. III 1987



УДК 612.822.1.015

H^+ -АТРаза МЕМБРАН СИНАПТИЧЕСКИХ ПУЗЫРЬКОВ МОЗГА: ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ХАРАКТЕРНЫЕ СВОЙСТВА СИСТЕМЫ ТРАНСПОРТА H^+

МЕЛЬНИК В. И., ГЛЕБОВ Р. Н.

НИИ общей патологии и патологической физиологии АМН СССР, Москва

Исследовано участие АТРаза мембран синаптических пузырьков мозга крыс в активном транспорте H^+ , который измеряли с помощью флуоресцентного амина акридиноранжа. АТР-зависимый транспорт H^+ устранялся N-этилмалесимидом (NEM), а АТРазная активность разделялась на два компонента, отличающихся по чувствительности к ингибитору.

Основной компонент (74%) чувствителен к NEM и идентифицирован как H^+ -АТРаза на основании следующих критериев: а) совместная с H^+ -насосом очистка во время выделения мембран; б) идентичная с ним чувствительность к NEM; в) избирательная стимуляция активности в присутствии Cl^- или разобщителей; г) близость характеристик к таковым H^+ -насоса— K_m для Mg-АТР (0,64 мМ) и рН-оптимум (6,0). Найдено, что максимальные градиенты рН генерируются при рН 7,5—8,0, где активность H^+ -насоса сильно лимитируется низкой концентрацией H^+ .

Минорный компонент АТРазной активности полностью устойчив к действию NEM и проявлял K_m для Mg-АТР=0,10 мМ и широкий рН-оптимум в щелочной области.

Кислая среда внутри синаптических пузырьков (СП) нервной ткани, необходимая для поддержания их нормальных функций (активности локализованных там ферментов, процессов сопряженного транспорта медиаторов и их предшественников), поддерживается мембранным H^+ -насосом за счет энергии АТР [1, 2]. H^+ -насос СП отличается от H^+ -насосов классического митохондриального типа устойчивостью к олигомицину, меньшей чувствительностью к дициклогексилкарбодимиду и высокой чувствительностью к NEM [1]. Этими свойствами он близок к протонным насосам секреторных гранул и других органелл кислого компартмента клетки: лизосом, эндосом, «одетых» везикул и аппарата Гольджи [3].

Транспорт H^+ через мембрану СП является АТР-зависимым, что предполагает участие соответствующей H^+ -АТРаза. Механизм сопряжения между гидролизом АТР и транслокацией H^+ не может быть выяснен без кинетической характеристики обеих активностей—АТРазной

и транслоказной. Однако АТРазная активность СП, особенно в неочищенных препаратах [1, 4], явно гетерогенна, а применяемые ингибиторы в большинстве случаев недостаточно специфичны.

В настоящей работе исследовали возможность применения NEM для избирательного выявления активности H^+ -АТРазы мембран СП. В низких концентрациях NEM полностью блокирует транспорт H^+ [1] и частично ингибирует АТРадную активность [5, 6]. Результаты показывают, что в выбранной нами системе измерения NEM проявляет свойства специфического ингибитора H^+ -АТРазы. Идентификацию NEM-чувствительного компонента в качестве H^+ -АТРазы подтверждает совместное с активностью H^+ -насоса обогащение в процессе очистки мембран СП и идентичность их функциональных и кинетических свойств.

Необходимой частью работы было изучение кинетических свойств H^+ -насоса. При этом потребовалось уточнить существующие методические подходы, основанные на использовании проникающих слабых оснований, в частности флуоресцентного амина акридиноранжа (АО). Проведенный кинетический анализ показал, что система транспорта H^+ в СП активируется субстратом транспорта— H^+ , причем максимальная активация наблюдается при рН 6,0. В то же время градиент рН (ΔpH) достигает максимальной величины в физиологической, слабощелочной области рН 7,5—8,0.

Материалы и методы

Очищенные мембраны СП мозга получали после осмотического шока неочищенной фракции синапсом, применяя условия центрифугирования, предложенные в работе March, Thornton [7]. Ткань целого мозга крыс массой 200—250 г промывали в среде выделения (0,32 М сахараза, 10 мМ трис-HCl, рН 7,4 при 4°) и размельчали за 4 «хода» тefлонового пестика в стеклянном гомогенизаторе (зазор 0,2 мм, скорость вращения 500 об/мин) в 6—8 объемах среды. Гомогенат центрифугировали 10 мин при 1000 g, супернатант сливали, а осадки повторно гомогенизировали и центрифугировали. Объединенные супернатанты центрифугировали 10 мин при 10000 g. Полученный осадок неочищенных синапсом суспендировали в 8 объемах бидистиллированной воды и гомогенизировали в том же гомогенизаторе (3 «хода» пестика, 1500 об/мин). Последовательным центрифугированием лизата (55000 g, 60 мин, снопа 55000g, 60 мин и 100000g, 75 мин) получали три осадка субклеточных фракций Φ_1 , Φ_2 и Φ_3 соответственно. Последняя фракция представляла собой очищенные мембраны СП. Осадки суспендировали в среде выделения до концентрации белка 2—4 мг/мл и хранили небольшими аликвотами при —20° в течение 1—2 недель.

Активность H^+ -насоса измеряли методом непрерывной регистрации трансмембранного ΔpH с помощью флуоресцентного слабого основания АО [1, 8]. Измерения проводили в кварцевых кюветах спектрофлуорометра «Hitachi MPF-4» (Япония) при длинах волн возбуждения и

испускания 491 и 530 нм соответственно. Среда измерения (конечный объем 2 мл) содержала 2 мкМ АО в 150 мМ KCl, 20 мМ HEPES/трис pH 7,4 при 25°. После 4 мин преникубации белка (8—15 мкг/мл для Φ_3) инициировали транспорт H^+ добавлением 1 мМ Mg-АТР (эквивмолярная смесь $MgSO_4$ и трис-АТР, pH 7,4) и после снижения флуоресценции АО до стационарного уровня добавляли 10 мкл 2М $(NH_4)_2SO_4$ для обращения флуоресцентного ответа (рис. 1). Устраняя ΔpH , добавление соли аммония позволяет точно определить исходный уровень флуоресценции (F_0) с учетом изменения, вызванного неспецифическим (такой же эффект оказывает ADP) взаимодействием зонда с АТР в момент внесения последнего [1].

Величину U , H^+ -насоса в стандартных условиях измерения выражали из относительной величины изменения флуоресценции АО. Скорость транспорта принимали равной начальной скорости тушения флуоресценции АО ($-dF/dt$, диапазон линейности—до 25 мкг белка/мл) в $мин^{-1} \cdot мг^{-1}$, а величину стационарной аккумуляции H^+ —отношению потушенной флуоресценции зонда к непотушенной $(F_0 - F)/F$, диапазон линейности—до 13 мкг белка/мл) в $мг^{-1}$. Эти величины пропорциональны изменению концентрации H^+ внутри везикул при поддержании постоянного pH среды [8].

Измерение АТРазных и АМРазной активностей. Общую Mg^{2+} -АТРазную активность измеряли при инкубации белка (15—25 мкг/мл) в течение 30 мин в присутствии 2 мМ Mg-АТР в такой же среде, что и для транспорта H^+ , только без АО (pH 7,4 при 37°). В части опытов вместо KCl среда содержала NaCl либо 0,3 М сахарозу. Олигомицин-чувствительную АТРазную активность определяли как активность, ингибируемую 0,5 мкг/мл олигомицином, а NEM-чувствительную—как активность, ингибируемую 0,2 мМ NEM. Na^+ , K^+ -АТРазную активность определяли как разность в отсутствие и в присутствии 1 мМ уабаина в среде, содержащей 2 мМ Mg-АТР, 130 мМ NaCl, 20 мМ KCl, 20 мМ HEPES/трис (pH 7,4 при 37°).

Активность кислой АМРазы (кислой 5'-нуклеотидазы, маркера лизосом) [9] измеряли при инкубации белка (0,8 мг/мл) в течение 30 мин в присутствии 5 мМ Mg-АТР (эквивмолярная смесь $MgCl_2$ и Na_2AMP) в 0,1М Na^+ -ацетатном буфере (pH 5,0 при 37°).

АМР- и АТРазные реакции инициировали добавлением субстратов (конечный объем 1 мл) после 20 мин преникубации белка в присутствии или в отсутствие ингибиторов и ионофоров. Реакции останавливали и определяли содержание образовавшегося при гидролизе субстратов P_i добавлением 1 мл свежеприготовленного реактива, состоящего из следующих компонентов: 10%-ный ДДС-Na, 2М ацетатный буфер, приготовленный титрованием трисом до pH 4,3, 0,1М $CuSO_4$, 2%-ный молибдат аммония и 10%-ная аскорбиновая кислота в соотношении 1:8:0,1:1:0,2. Реактив стабилен на льду 30—40 мин после добавления аскорбата. Через 25 мин при комнатной температуре (или при 37° в тех случаях, когда необходимо предупредить выпадение осад-

ка ДДС-К) измеряли экстинкцию проб при 735 нм. Содержание Р_i рассчитывали, исходя из прироста экстинкции, вызванного присутствием в инкубировавшихся параллельно «холостых» (белок добавляли после остановки реакции) пробах 200 нмоль КН₂РO₄ в полной среде инкубации, включающей АТР или АМР, которые, как и КСl, занижают окраску ([10] и собственные данные), обусловленную восстановлением фосфомолибдатного комплекса.

Материалы. Использовали АО, NEM, олигомицин, карбонилцианид m-хлорфенилкарбазон (Cl-CCP), валиномицин и сахарозу фирмы «Serva» (ФРГ), неорганические соли квалификации х. ч. Олигомицин, Cl-CCP и валиномицин добавляли в пробы из спиртового раствора так, что конечная концентрация этанола составляла 0,5%, и столько же спирта добавляли в контрольные пробы. Трис-АТР получали пропусканием раствора Na₂АТР («Reanal», Венгрия) через колонку с катионообменником Dowex 50wX2 в Н⁺-форме. Элюат нейтрализовали трисом, и концентрацию АТР определяли спектрофотометрически, принимая значение $\epsilon_{259} = 15400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

Результаты исследования

Флуоресцентные ответы АО, наблюдавшиеся при последовательном добавлении СП и Mg-АТР в среду измерения (рис. 1), были аналогичные тем, которые описаны для неочищенной фракции СП мозга [1]. Отличия сводятся к двум моментам: во-первых, величина У.А. транспорта Н⁺ в очищенных препаратах в 3—4 раза выше; во-вторых, эндогенный градиент рН (ΔpH), который проявляется в тушении флуоресценции АО при добавлении СП (подробнее см. [1]), в очищенных мембранах значительно ниже и в отсутствие АТР полностью рассеивается за 3—4 мин, в отличие от 15 мин для неочищенной фракции. Последнее обстоятельство, очевидно, вызвано длительным пребыванием везикул в гипоосмотической среде в процессе выделения, в чем применяемый нами метод отличается от исходной процедуры March, Thornton [7]. Вследствие этого наши препараты представляют собой «тени» или мембраны СП с вымытым в процессе выделения содержимым. Такие препараты удобны для исследования транспорта Н⁺, так как буферной емкостью внутривезикулярного объема «теней» можно пренебречь, что упрощает интерпретацию такого параметра, как аккумуляция Н⁺.

Для уточнения локализации Н⁺-насоса и оценки чистоты препаратов на всех стадиях очистки, следующих за осмотическим шоком грубой фракции синапсом, измеряли активности транспорта Н⁺, различных АТРа_з и маркерных ферментов наиболее вероятных примесей. Из табл. 1 видно, что маркер митохондрий—олигомицинчувствительная АТРа_з полностью удаляется в процессе очистки. Кроме того, в отсутствие АТР добавление 1 мМ NADH не вызывало подкисления везикул (не показано), что служит дополнительным указанием на отсут-

ствии «вывернутых наизнанку» внутренних мембран митохондрий—суб-митохондриальных частиц. Величина У.А. маркера плазмалеммы— Na^+ , K^+ -АТРазы значительно снижалась в ходе очистки. Возможно, что неполное удаление плазмалеммы вызвано прогрессирующей везикуляризацией поверхностной мембраны синапсом при гипотонической обработке. Величина У.А. лизосомного маркера—кислой АМРазы была низкой во всех фракциях порядка на два ниже, чем в очищенных лизосомах [9], а с учетом распределения белка основная часть фермента сосредоточена во фракции крупных частиц Φ_1 .

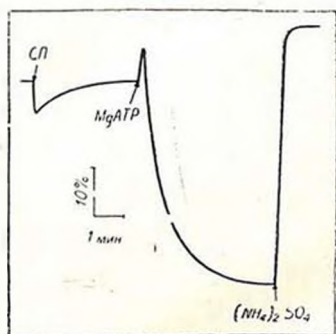


Рис. 1. Изменения флуоресценции акридиноранжа при последовательном добавлении мембраны СП и Mg-ATP . Стрелками указаны моменты добавления СП (12,5 мкг белка/мл), Mg-ATP (1,0 мМ) и $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (10 мМ)

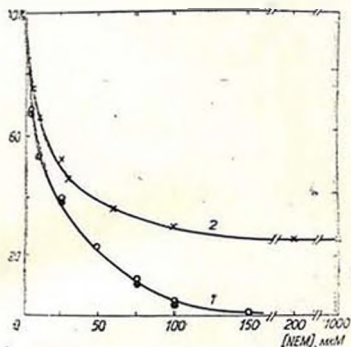


Рис. 2. Ингибирующее действие NEM на транспорт H^+ (1) и АТРазную активность (2) мембраны СП и стандартной KCl -содержащей среде. Кривая 1—общая для скорости транспорта (O) и аккумуляции H^+ (●)

В отличие от маркерных ферментов митохондрий, плазмалеммы и лизосом, величина У.А. АТФ-зависимого транспорта H^+ резко возросла в процессе очистки (табл. 1). Это показывает, что H^+ -насос действительно является компонентом мембраны СП. В то время как общая АТРазная активность не проявляла корреляции с каким-либо маркерным ферментом, что объясняется ее суммарным характером, наблюдалась положительная корреляция между транспортом H^+ и NEM-чувствительным компонентом АТРазной активности.

На рис. 2 представлены концентрационные зависимости ингибирующего действия NEM на транспорт H^+ и АТРазную активность мембраны СП. Полное ингибирование транспорта H^+ и максимальное торможение АТРазной активности (на 74% в KCl -содержащей среде) наблюдается при 0,2 мМ NEM, и дальнейшее повышение концентрации ингибитора не приводит к дополнительному ингибированию АТРазной активности. Полумаксимальное торможение транспорта H^+ и чувствительного к ингибированию компонента АТФ-азной активности наблюдалось при 13

и 12 мкМ NEM соответственно. Такие же результаты были получены при определении АТРазной активности в сахарозной среде. Когда ингибитор добавляли после АТР, степень торможения транспорта H^+ значительно снижалась, достигая максимално 15—20%. Защита субстратом от ингибирования тиоловыми реагентами описана для многих SH-зависимых ферментов. Полученные результаты позволяют предположить, что только основной, NEM-чувствительный компонент АТРазной активности связан с транспортом H^+ и может быть отождествлен с H^+ -АТРазой.

Таблица 1

Удельная активность маркерных ферментов и транспорта протонов в субклеточных фракциях Φ_1 , Φ_2 , Φ_3

Активность	Фракция		
	Φ_1	Φ_2	Φ_3
Общая АТРазная, мкмоль· ·мг ⁻¹ ·ч ⁻¹	43,3±4,5	32,7±2,7	37,8±1,3
Олигомицинчувствительная АТРаза, мкмоль·мг ⁻¹ ·ч ⁻¹	21,6±3,9	0,6±1,0	0,0±0,7
NEM-чувствительная АТРаза, мкмоль·мг ⁻¹ ·ч ⁻¹	6,2±1,8	16,7±2,4	28,3±1,6
Na ⁺ , K ⁺ -АТРаза, мкмоль· ·мг ⁻¹ ·ч ⁻¹	58,8±5,4	44,7±5,0	7,1±1,5
Кислая АМРаза, мкмоль· ·мг ⁻¹ ·ч ⁻¹	0,30±0,10	0,32±0,07	0,22±0,06
Транспорт H^+ : скорость, мин ⁻¹ ·мг ⁻¹	3,2±0,7	14,2±7,6	45,5±3,1
аккумуляция, мг ⁻¹	5,8±0,5	29,2±11,6	77,5±2,2
Выход белка, мг г сухой ткани	7,15±2,11	0,38±0,18	0,20±0,04

Примечание. Представлены данные 4—5 опытов. О размерностях величин транспорта H^+ см. раздел «Методы исследования».

АТРазная активность мембран СП стимулировалась в присутствии KCl или NaCl (табл. 2). Очевидно, стимуляция обусловлена Cl^- , сопряженный перенос которых обеспечивает электронейтральность транспорта H^+ [1]. В присутствии NEM активация АТРазной активности не наблюдается, следовательно, это свойство присуще только NEM-чувствительному компоненту.

Разобщители устраняют ΔpH либо создавая высокую проводимость для H^+ в мембране (протонофор Cl^- -ССР), либо связывая H^+ при аккумуляции внутри везикул в ответ на ΔpH (проникающие слабые основания). В обоих случаях, нарушая сопряжение между гидролизом АТР и транспортом ионов, разобщители вызывают стимуляцию H^+ -АТРаза, работающих в их присутствии «вхолостую». На рис. 3 показано действие двух разобщителей — протонофора Cl^- -ССР и валиномицина на транспорт H^+ в мембранах СП. В согласии с предыдущими данными [1], валиномицин, который обычно проявляет свойства K^+ -специфического ионофора, более эффективно устранял транспорт H^+ в присутствии NaCl, чем KCl. Для обоих разобщителей характерно, что

значительно более высокие концентрации требовались для торможения скорости транспорта, чем аккумуляции H^+ . Величины $K_{0.5}$ равнялись для Cl^- -CCP 0,50 и 0,20 мкМ, а для валиномицина—0,85 и 0,35 мкМ в присутствии KCl и 0,35 и 0,10 мкМ в присутствии $NaCl$ соответственно.

Оба ионофора-разобщителя, а также представитель проникающих слабых оснований— NH_3 , добавленный в виде раствора $(NH_4)_2SO_4$, нарушая сопряжение с транспортом H^+ , избирательно стимулировали (табл. 2) NEM-чувствительную АТРазную активность, не влияя на активность, проявляющуюся в присутствии NEM (NEM-резистентный компонент). Стимуляция наблюдалась в сахарозной и в KCl -содержащей средах, то есть в условиях электрогенного и электронейтрального транспорта H^+ соответственно.

Таблица 2

Изменения АТРазной активности мембран СП при
взадействии хлоридов и разобщителей в присутствии
и в отсутствие NEM

Условия опыта	АТРазная активность, %	
	без NEM	+NEM
сахароза	100	36±2
сахароза+ Cl^- -CCP	119±5**	36±3
сахароза+валиномицин	134±10**	36±2
KCl	145±6*	36±3
KCl + Cl^- -CCP	168±9**	36±3
KCl + $(NH_4)_2SO_4$	170±14**	37±3
KCl +валиномицин	183±16**	36±3
$NaCl$	152±7*	40±4
$NaCl$ +валиномицин	150±14**	39±3

Примечание. Концентрации: 300 мМ сахараза, 150 мМ KCl , 150 мМ $NaCl$, 10 мкМ Cl^- -CCP, 2 мкМ валиномицин, 10 мМ $(NH_4)_2SO_4$, 0,2 мМ NEM. За 100% принята активность в сахарозной среде в отсутствие NEM и разобщителей. Представлены данные 6 (с Cl^- -CCP) или 3 (с сульфатом аммония и валиномицином) опытов. * $p < 0,005$ по сравнению с сахарозной средой, ** $p < 0,01$ по сравнению с отсутствием разобщителя

Оба компонента АТРазной активности проявляли гиперболические зависимости от концентрации Mg -АТР, а линеаризация в координатах Хейнса-Вульфа (см. [11]) показала, что они сильно отличаются по сродству к субстрату (рис. 4). NEM-чувствительный компонент характеризуется величиной K_m 0,64 мМ, а соответствующая величина для NEM-резистентного компонента составляет 0,10 мМ. Исследование подобной зависимости активности H^+ -насоса с помощью флуоресцентного зонда АО показало, что она описывается кривой сложной, негиперболической формы, причем увеличение концентрации Mg -АТР выше 1 мМ вызывало снижение флуоресцентных ответов. Это вызвано усилением взаимодействия зонда с АТР при увеличении концентрации последнего, поэтому были применены особые методические приемы, которые будут

описаны в отдельной публикации, с помощью которых установили, что величина K_m H^+ -насоса близка величине K_m NEM-чувствительного компонента.

Исследования рН-зависимостей двух компонентов АТР-зависимой активности показали (рис. 5, а), что NEM-чувствительный компонент проявляет четкий пик активности при рН 6,0. Стимуляция активности в присутствии KCl наблюдалась во всем исследованном диапазоне рН. В то же время активность NEM-резистентного компонента была максимальной в щелочной области.

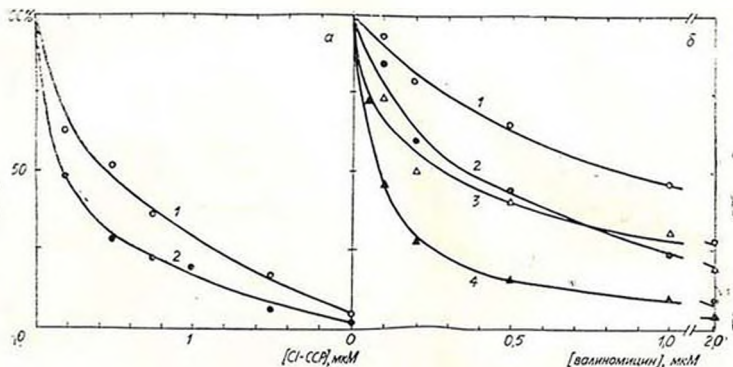


Рис. 3. Влияние протонифора Cl-CCP (а) и валиномицина (б) на транспорт H^+ в мембранах СП (в %). Измерения проводили в присутствии 150 мМ KCl (1, 2) или NaCl (3, 4). Представлены средние величины скорости транспорта (1, 3) и аккумуляции H^+ (2, 4) из трех опытов

АТР-зависимые флуоресцентные ответы АО, которые отражают транспорт H^+ , проявляли особую зависимость от рН, будучи максимальными при рН 7,5—8,0 (рис. 5, б, кривые 1 и 2). Обычно считается, что эта зависимость тождественна рН-зависимости H^+ -насоса. На самом деле, согласно известному уравнению [8, 12], флуоресцентные ответы пропорциональны величине трансмембранного градиента концентрации H^+ :

$$\frac{F_0 - F}{F} = \frac{[H^+]_{in}}{[H^+]_{ex}} \cdot \frac{v_{in}}{v_{ex}}, \quad (1)$$

где индексы in и ex относятся к внутри- и вневезикулярному объемам (v) соответственно. Активность H^+ -насоса, конечно, следует выражать не с помощью термодинамического параметра $[H^+]_{in}/[H^+]_{ex}$, а кинетического—количества переносимых через мембрану ионов. Поэтому величина аккумуляции H^+ будет пропорциональна достигаемой в стационарном состоянии концентрации H^+ внутри везикул:

$$[H^+]_{in} \cdot V_{in} = [H^+]_{ex} \cdot V_{ex} \cdot (F_0 - F)/F \quad (2)$$

Учитывая, что при одинаковой концентрации белка V_{in} и V_{ex} постоянны, удельную величину аккумуляции H^+ можно выразить как

$$[H^+]_{in} = \text{const} \cdot [H^+]_{ex} \cdot (F_0 - F)/F \quad (3).$$

Такой же подход справедлив и в отношении скорости транспорта H^+ . Дифференцируя уравнение (3) с учетом того, что для начальных изменений флуоресценции $(F_0 - F)/F$ можно заменить на $(F_0 - F)/F_0$, получим:

$$d[H^+]_{in}/dt = -\text{const} \cdot [H^+]_{ex} \cdot dF/dt \quad (4).$$

Таким образом, при варьировании рН среды оба параметра—скорость и величину флуоресцентных ответов—следует умножать на концентрацию H^+ в среде измерения.

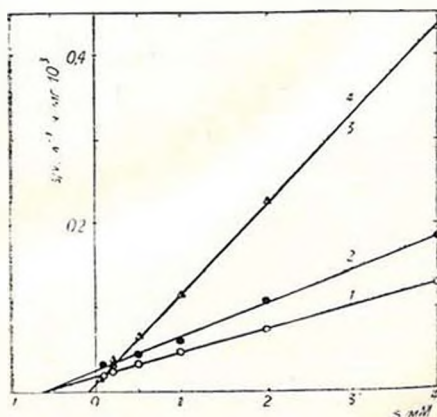


Рис. 4. Зависимости скорости (v) АТРазных реакций от концентрации Mg -АТФ (s) в координатах Хейнса-Вулфа. NEM-чувствительную (1, 2) и NEM-резистентную (3, 4) АТРазные активности измеряли в присутствии 150 мМ KCl (1 и 3, $\circ$) или 300 мМ сахарозы. (2, 4, $\bullet$). Данные для 3 и 4 представлены одной общей прямой

Чтобы представить данные на одном рисунке, не меняя масштаба, воспользуемся тем, что величина $[H^+]_{ex}$ при изменении рН среды на 0.5 единиц каждый раз изменяется в $10^{0.5}$ раз, то есть в $1/10$ раз. Выбрав подходящую экспериментальную точку в качестве начальной для отсчета величины флуоресцентных ответов в остальных точках, отличающихся на ± 0.5 единиц рН, достаточно разделить (при повышении рН) или умножить (при снижении рН) на ± 10 раз. На рис. 5, 6 приведены полученные таким способом кривые, построенные при выборе рН 6.5 и рН 5.5 для начала отсчета (кривые 4 и 5, из которых видно,

что максимальная аккумуляция H^+ наблюдается при pH 6.0. Точно такой же результат получен и для скорости транспорта (кривая 3). Таким образом, pH-зависимости H^+ -насоса и NEM-чувствительной АТРазы практически одинаковы, и их активность в широком диапазоне стимулируется повышением концентрации H^+ в среде.

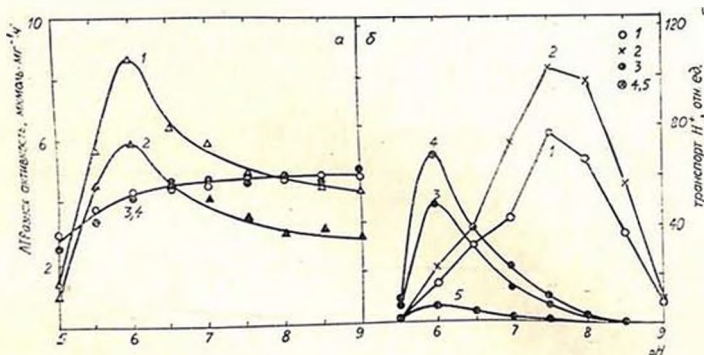


Рис. 5. pH-Зависимости АТРазных активностей (а) и H^+ -насоса (б) мембран СП: а—NEM-чувствительная (1, 2) и NEM-резистентная (3, 4) активности в присутствии 150 мМ KCl (1 и 3, $\circ$) или 300 мМ сахарозы (2, и 4, $\bullet$). Результаты для 3 и 4 представлены одной общей кривой; б—скорость генерации (1) и величина (2) стационарного градиента концентрации H^+ ; скорость (3) и величина (4, 5) стационарной аккумуляции H^+ в относительных единицах (см. текст) при выборе для начала отсчета точек pH 6,5 (3, 4) или pH 5,5 (5). Измерения проводили при 25°, используя в качестве буферов MES/трис в диапазоне pH 5,0—6,5 и HEPES/трис в диапазоне pH 7,0—9,0 при суммарной концентрации буферных компонентов 40 мМ

Обсуждение результатов

Анализ распределения маркерных ферментов, проведенный в настоящей работе, подтверждает локализацию H^+ -насоса в мембране СП мозга. Правда, мы не исследовали распределение «одетых» везикул, однако удельные величины АТРазной активности и транспорта H^+ в них на порядок ниже, чем в мембране СП [3]. К тому же было показано, что в использованном нами режиме центрифугирования «одетые» везикулы, имеющие большие размеры и плотность, удаляются на промежуточных стадиях выделения СП [7]. Явное отличие в распределениях активности H^+ -насоса и маркера плазмалеммы, вопреки недавнему утверждению [13], свидетельствует об отсутствии связи H^+ -насоса с синаптической мембраной.

Отдифференцировать активность АТРазы, ответственной за транспорт H^+ (без солюбилизации, в нативной мембране СП), можно лишь с помощью специфических ингибиторов. Свойства такого ингибитора

проявляет NEM: активность, не связанная с транспортом H^+ , резистента к его действию, а активности Na^+ , K^+ и Ca^{2+} -транспортной АТРа, проявляющих к нему известную чувствительность, не могли проявиться без добавления Na^+ или Ca^{2+} в среду измерения. Ингибирование соответствующей АТРа полностью объясняет действие NEM на транспорт H^+ , и нет никаких оснований предполагать его косвенное, «разобщающее» действие [14]. Такой вывод подтверждается защитным эффектом АТР и отсутствием расхождений в действии NEM на два параметра активности H^+ -насоса (рис. 2). Действие разобщителей как раз характеризуется такими расхождениями—скорость транспорта более устойчива, чем величина аккумуляции (рис. 3).

Функциональные свойства NEM-чувствительной АТРа полностью соответствуют идентификации ее в качестве H^+ -транспортной АТРа. Они включают: а) подверженность действию разобщителей; б) стимуляцию активности анионом хлора; в) совпадение кинетических характеристик с таковыми H^+ -насоса.

Действие разобщителей не требует особого комментария, за исключением валиномицина. Даже не касаясь отсутствия специфичности этого ионофора в отношении K^+ , объяснить его действие стимуляцией электрогенного входа катионов невозможно, так как в присутствии Cl^- мембранный потенциал не мог образоваться. К тому же такой потенциал (положительный внутри) должен был привести к торможению АТРа активности, а наблюдается, наоборот, стимуляция. Так что механизм разобщающего действия валиномицина в наших опытах остается непонятным. Подобные эффекты в отношении АТР-зависимого транспорта АХ наблюдали в интактных, не подвергшихся осмотическому шоку, СП электрического органа ската [15]. Аномальные эффекты валиномицина наблюдали также в других мембранных системах [16].

Стимуляция активности H^+ -АТРа хлоридом, впервые отмеченная в хромаффинных гранулах (ХГ) надпочечников [17], наблюдается при всех экспериментальных условиях—во всем исследованном диапазоне рН и концентраций Mg-АТР, в присутствии и в отсутствие разобщителей. Возможно, она отражает более общее свойство H^+ -АТРа, чем просто потребность в проникающем анионе для поддержания электронейтральности. Иначе трудно объяснить, почему стимуляция наблюдается в присутствии разобщителей (табл. 2).

Имеющиеся в литературе (на материале секреторных гранул) данные о кинетических свойствах H^+ -насоса основаны исключительно на изучении генерации мембранного потенциала. Были получены очень низкие оценки K_m для Mg-АТР [14, 18], тогда как рН-зависимость в ряде работ характеризовалась максимумом в районе рН 6—6,5 [18—20]. Однако применение термодинамических параметров для изучения кинетики в общем случае неприемлемо, о чем свидетельствует анализ поведения термодинамического (ΔpH) и кинетического (активность) параметров при варьировании рН среды. Разработанный нами для этого случая чисто кинетический способ выражения активности H^+ -насоса

из флуоресцентных ответов АО легко распространяется и на другие методы. Например, изотопные, основанные на аккумуляции слабых оснований или слабых кислот, если вместо $(F_0 - F)/F$ использовать отношение концентраций C_{in}/C_{ex} . Скорость проникновения незаряженной формы АО не лимитирует даже при низких рН, когда ее количество сильно уменьшается, так как изменения флуоресценции быстро обратимы и не наблюдается отличия между рН-профилями скорости и величины аккумуляции.

Найденные таким способом кинетические характеристики H^+ -насоса совпадают с таковыми H^+ -АТРАЗы (рН-оптимум 6,0 и K_m для Mg-АТР 0,64 мМ). Это является независимым подтверждением справедливости примененного подхода, а также исключает возможность присутствия более чем одной АТРАЗы со сходной чувствительностью к NEM. Кинетические характеристики H^+ -АТРАЗы находят подтверждение в ряде работ, где изучали общую АТРАЗную активность СП мозга [6], ХГ [19, 21] и секреторных гранул нейрогипофиза [20], что обусловлено давно известным для ХГ [22] преобладанием в ней NEM-чувствительного компонента. Правда, иногда сообщали характеристики, близкие таковым NEM-резистентного компонента. Однако в этих работах препараты СП хранили [5] или ХГ подвергали длительной обработке [23] при 4°, а это, как известно [5], приводит к быстрой инактивации NEM-чувствительной АТРАЗы.

Различия в проявлении кинетических и термодинамических параметров, отмеченные выше, имеют непосредственное отношение к анализу сопряженных транспортных процессов. Так, жестко сопряженный транспорт H^+ и Cl^- , способный вызвать осмотический лизис и выход содержимого, характеризуется в ХГ оптимумом рН 5,8—6,2 и K_m для Mg-АТР 0,6 мМ [24], а сопутствующие изменения объема—близкой величиной K_{in} 0,5 мМ [25], что совпадает с описанной выше кинетикой H^+ -насоса. Другая ситуация наблюдается при непрямом сопряжении, когда транспорт H^+ создает движущую силу (в термодинамическом смысле) для сопряженного процесса. АТР-зависимый транспорт катехоламинов [26] и АХ [15] в СП резко возрастает с повышением рН среды и достигает максимума в районе рН 7,5—8,0, повторяя рН-зависимость генерации ΔpH , отмеченную в настоящей работе. Таким образом, характер рН-зависимости (зависимость от концентрации Mg-АТР не была описана для двух последних процессов) может служить прямым указанием на механизм сопряжения—кинетический (прямой) или термодинамический (косвенный).

Кинетический анализ показывает, что активность как H^+ -насоса, так и H^+ -АТРАЗы проявляет двухфазную зависимость от концентрации H^+ . Наблюдаемая при повышении концентрации H^+ до 1 мкМ активация свидетельствует, во-первых, что генерация ΔpH обусловлена транслокацией H^+ внутрь везикул (а не OH^- изнутри) и, во-вторых, что фермент, осуществляющий эту транслокацию, можно классифицировать как H^+ -стимулируемую Mg^{2+} -зависимую АТРАЗу. Активность

фермента в физиологических условиях лимитируется низкой концентрацией H^+ в цитоплазме, зато при этом с минимальными энергетическими затратами поддерживается максимальная величина ΔpH для обеспечения биоэнергетики везикул.

В отличие от NEM-чувствительной, NEM-резистентная АТРаза, по-видимому, является примесным компонентом в препаратах СП, так как ее активность снижается в процессе очистки. Похожая ситуация наблюдается при анализе распределения ХГ в градиентах плотности [22]. NEM-резистентная АТРаза может использоваться в качестве субстрата Ca^{2+} -АТР (неопубликованные данные), который не поддерживает транспорт H^+ [1]. Кинетические характеристики ее близки к таковым низкоаффинной Ca^{2+}/Mg^{2+} -АТРаза синаптических мембран мозга, что указывает на вероятное происхождение этой активности в препаратах мембран СП.

H^+ -ATPase OF BRAIN SYNAPTIC VESICLE MEMBRANES. IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF AN H^+ -TRANSPORT SYSTEM

MELNIK V. I., GLEBOV R. N.

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

The involvement of an ATPase of brain synaptic vesicle membranes in the active H^+ -transport as monitored with a fluorescent weak base, acridine orange, has been studied. The ATP-dependent H^+ -transport was abolished by N-ethylmaleimide (NEM) while the ATPase activity was resolved into two components differing in their sensitivity to the inhibitor.

A major component (74%) was sensitive to NEM and was identified as an H^+ -ATPase on the basis of the following criteria: a) copurification with the H^+ -pump during isolation of the membranes, b) their identical sensitivities towards NEM, c) selective stimulation of the activity by the presence of Cl^- or uncouplers, d) similarity of characteristics to those of the H^+ -pump, i. e., K_m for Mg -ATP of 0.64 mM and pH-optimum 6.0. Maximal pH gradients were generated at pH 7.5–8.0, where the activity of the H^+ -pump was found to be severely limited by a low H^+ concentration.

A minor component of the ATPase activity was completely resistant to NEM and exhibited a K_m of 0.10 mM and a broad pH-optimum in the alkaline range.

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., Tsukita S. EMBO J., v. 3, № 13, p. 3333—3337, 1984.
3. Rudnick G. Annu. Rev. Physiol., v. 48, p. 403—413, 1986.
4. Глебов Р. Н., Мельник В. И., Крыжановский Г. Н. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 98, № 11, с. 539—541, 1984.
5. Харченко Н. К., Килинов С. А., Полякова Н. М. Укр. биохим. журн., т. 45, № 5, с. 581—586, 1973.
6. Tsudzuki T. J. Biochem., v. 55, № 2, p. 567—574, 1979.
7. March P. E., Thornton E. R. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 110, № 3, p. 804—810, 1983.
8. Lee H.-C., Forte J. G. Biochim. et biophys. acta, v. 508, № 2, p. 339—356, 1978.
9. Burnside J., Schneider D. L. Biochem. J., v. 204, № 2, p. 525—534, 1982.
10. Walter U. Experientia, v. 37, № 12, p. 1263—1265, 1981.
11. Корниш-Бовден Э. Основы ферментативной кинетики, М., Мир, 1979.
12. Schaldiner S., Rottenberg H., Avron M. Europ. J. Biochem., v. 25, p. 64—70, 1972.
13. Van Dyke R. W., Seharschmidt B. F., Steer C. J. Biochim. et biophys. acta, v. 812, № 2, p. 423—436, 1985.
14. Flatmark T., Gronberg M., Husebye E., Berge S. V. FEBS Lett., v. 149, № 1, p. 71—74, 1982.
15. Anderson D. C., King S. C., Parsons S. M. Biochemistry, v. 21, № 13, p. 3037—3043, 1982.
16. Negendank W., Shaller C. Biochim. et biophys. acta, v. 683, № 2, p. 316—322, 1982.
17. Pazoles C. J., Creutz C. E., Ramu A., Pollard H. B. J. Biol. Chem., v. 255, № 16, p. 7863—7869, 1980.
18. Pollard H. B., Zindar O., Hoffman P. G., Nikodejevic O. J. Biol. Chem., v. 251, № 15, p. 4544—4550, 1976.
19. Bashford C. L., Radda G. K., Ritchie G. A. FEBS Lett., v. 50, p. 21—24, 1975.
20. Russell J. T. J. Biol. Chem., v. 259, № 15, p. 9496—9507, 1984.
21. Winkler H., Hörtnagl H., Hörtnagl H., Smith A. D. Biochem. J., v. 118, № 2, p. 303—310, 1970.
22. Kirshner N., Kirshner A. G., Kamin D. L. Biochim. et biophys. acta, v. 113, № 2, p. 332—335, 1966.
23. Johnson R. G., Beers M. F., Scarpa A. J. Biol. Chem., v. 257, № 18, p. 16701—16707, 1982.
24. Pazoles C. J., Pollard H. B. J. Biol. Chem., v. 253, № 11, p. 3962—3969, 1978.
25. Phillips J. H., Allison Y. P. Biochem. J., v. 170, № 3, p. 651—672, 1978.
26. Maron R., Kanner B. I., Schuldiner S. FEBS Lett., v. 93, № 2, p. 237—240, 1979.

Поступила 25. VI 1987



УДК 577.354.2

ХАРАКТЕРИСТИКИ И СОДЕРЖАНИЕ ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ ЦИКЛИЧЕСКОГО 3',5'-ГУАНОЗИНМОНОФОСФАТА В НАРУЖНЫХ СЕГМЕНТАХ ФОТОРЕЦЕПТОРОВ СЕТЧАТКИ СУСЛИКА

КАЛИНИН Е. В., ОРЛОВА Т. Г., ФРЕЙДИН А. А., ОРЛОВ Н. Я.

Институт биологической физики АН СССР, Пущино

Исследованы свойства фосфодиэстеразы (ФДЭ) циклических нуклеотидов в различных типах препаратов из сетчатки суслика, подавляющую часть зрительных клеток которой составляют фоторецепторы системы фотоопического зрения—колбочки. Обнаружено, что данный фермент подобен по всем исследованным характеристикам ФДЭ циклического 3',5'-гуанозинмонофосфата (сGMP) наружных сегментов палочек—фоторецепторов скотопического зрения позвоночных. Методом центрифугирования в градиенте плотности сахарозы показано, что распределение активности ФДЭ совпадает с распределением светочувствительного пигмента, идентифицированного как зонтальный пигмент колбочек сетчатки суслика. Относительное содержание фермента в сетчатке оценено величиной 4—6 молекул ФДЭ на 100 молекул зрительного пигмента колбочек. Полученные данные позволяют предположить, что сGMP-специфичная ФДЭ является эндогенным ферментом наружных сегментов фоторецепторов сетчатки суслика и может быть важным элементом системы фототрансдукции в рецепторах фотоопического зрения позвоночных.

По современным представлениям [1], уникальная специфичная к сGMP ФДЭ (КФ 3.1.4.1)—ключевой элемент ферментативного каскада усиления светового стимула в наружных сегментах палочек (НСП) сетчатки позвоночных (система скотопического зрения). Обесцвечивание молекулы зрительного пигмента родопсина, локализованного в мембранах дисков НСП, ведет к активации за 1 с до 1000 молекул ФДЭ и, таким образом, индуцирует значительное уменьшение концентрации сGMP [1], который выполняет роль диффузионного медиатора и способен непосредственно контролировать режим работы катионных каналов плазматической мембраны НСП [2]. Посредником в процессе фотоактивации ФДЭ в НСП является GTP-связывающий белок трансдукцин [1].

ФДЭ НСП—периферический белок мембран дисков [1, 3]—легко экстрагируется из них растворами низкой ионной силы и состоит из трех субъединиц ФДЭ₁, ФДЭ₂ и ФДЭ₃, с $M_r \sim 88, 84$ и < 13 кД соот-

ветственно [1, 3]. Ее относительное содержание в НСП велико и составляет ~25 молекул фермента на 1000 молекул родопсина [4]; в режиме максимальной активности молекул ФДЭ гидролизует 4000—4500 молекул cGMP в секунду [4, 5]. В темноадаптированных НСП активность ФДЭ значительно подавлена в результате взаимодействия апофермента ФДЭ₁·ФДЭ₂ с субъединицей ФДЭ₃, характеризующейся высоким сродством к нему ($K_d \sim 10^{10} \text{ M}^{-1}$ [5]) и играющей роль ингибитора его ферментативной активности [5, 6]. Субъединица ФДЭ термостабильна, но легко инактивируется в присутствии трипсина [5, 6].

Результаты недавних работ, выполненных нами [7] и другими авторами [8], дают основания предполагать, что наружные сегменты колбочек (НСК) сетчатки позвоночных (система фотопического зрения) также содержат ФДЭ, специфичную к cGMP. Однако вопросы о функциональной роли этого фермента в НСК и степени подобия систем фототрансдукции палочек и колбочек пока остаются открытыми, а их решение требует ряда дополнительных данных и, в частности, данных о содержании ФДЭ в НСК и ее характеристиках. Исследования в этом направлении ограничены трудностями получения достаточно очищенных препаратов НСК: известные способы фракционирования гомогенатов сетчаток, содержащих как палочки, так и колбочки, не позволяют разделить НСП и НСК [9]; животные, обладающие преимущественно колбочковыми сетчатками (суслики, змеи, дневные ящерицы и т. д.), труднодоступны.

В настоящей работе для получения частично очищенных препаратов НСК использовали сетчатки сусликов (*Citellus undulatus*). Подавляющая часть (>95%) фоторецепторов этих сетчаток—колбочки [10], содержащие зрительный пигмент с максимумом спектра поглощения ~520 нм [11]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в наружных сегментах фоторецепторов сетчатки суслика присутствует cGMP-специфичная ФДЭ, близкая по всем исследованным характеристикам детально изученной ранее ФДЭ НСП сетчатки быка [3]. Согласно выполненным оценкам, содержание ФДЭ в сетчатке суслика составляет 4—6 молекул фермента на 100 молекул зрительного пигмента. Совокупность этих данных не только подтверждает предположение о том, что cGMP-специфичная ФДЭ является эндогенным ферментом НСК, но и показывает, что этот фермент может быть ключевым элементом системы фототрансдукции рецепторов фотопического зрения.

Материалы и методы

Животных декапитировали при слабом комнатном освещении, глаза адаптировали к темноте в течение 2—3 ч при 20°. Последующие операции по препарированию сетчаток и их фракционированию проводили при слабом красном свете ($\lambda > 680 \text{ нм}$) и температуре 4° по описанному ранее методу [7] с некоторыми модификациями. Сетчатки резко встряхивали в течение 4—5 мин в 47% (вес/объем) растворе сахарозы, приго-

товленном на изотоническом буфере А (10 мМ трис-НСl, рН 7,4, 140 мМ NaCl, 3,5 мМ KCl, 0,5 мМ MgCl₂ и 0,1 мМ дитиотреитол), и центрифугировали 15 мин при 10000 g. Супернатант (S₁) собирали, гомогенизировали в тefлоновом гомогенизаторе, помещали на дно центрифужной пробирки, последовательно насливали 40%- и 30%-ный (вес/объем) растворы сахарозы, приготовленные на буфере А, а затем центрифугировали 1 ч при 100000 g. Материал, локализованный после центрифугирования на границе между 30%- и 40%-ными растворами сахарозы (препарат НСК) и в стартовом 47%-ном растворе сахарозы (препарат Ф₄₇) собирали, хранили в темноте при 0° и использовали в течение трех дней с момента получения. Выход препарата НСК составлял 100—300 мкг белка на сетчатку и в значительной мере определялся условиями гомогенизации. В качестве экстрактов препаратов НСК использовали супернатанты, полученные в результате гомогенизации препаратов НСК в растворе с низкой ионной силой (10 мМ трис-НСl, рН 7,4) и последующего центрифугирования (100000 g, 2 ч). Аналогичным образом получали экстракты фракции Ф₄₇.

В ряде опытов были использованы препараты S₁ — супернатанты, полученные по несколько отличной от вышеописанной методике из сетчаток животных, адаптированных к темноте в течение 10—12 ч. Декапитацию животных, препарирование сетчаток и все последующие операции проводили в темноте или слабом красном свете. Сетчатки (1—2 шт.) помещали в 1—2 мл буфера А, резко встряхивали и центрифугировали 1 мин при 300 g. Полученный таким образом супернатант S₁ собирали, хранили в темноте при 8—10° и использовали в работе в течение 20—30 мин после их получения.

НСП и ФДЭ НСП сетчатки быка выделяли, как описано ранее [7]. Препараты ингибиторной субъединицы ФДЭ из НСП сетчатки быка (И-НСП) получали по стандартному методу [5] с некоторыми модификациями. Суспензию НСП (концентрация по белку 1—3 мг/мл) в буфере А закисляли до рН 2—3 титрованием 0,1 М HCl, инкубировали при 100° в течение 5 мин, охлаждали до 20°, защелачивали до рН 7,6—8,0 добавлением 0,1 М NaOH и центрифугировали 30 мин при 10000 g. Супернатант собирали и использовали в качестве препарата И-НСП. Ингибитор ФДЭ из препарата НСК (И-НСК) получали аналогичным образом. Определение концентрации белка выполняли, как описано ранее [7].

Измерение активности ФДЭ в светоадаптированных препаратах проводили рН-метрическим методом [7]. Закисление среды в ходе реакции гидролиза cAMP или cGMP регистрировали спектрофотометрически по изменению пропускания рН-индикатора крезолового красного при 575 нм [7]. Реакционная среда (объем 1—2 мл) содержала 2—10 мМ трис-НСl (начальное значение рН 8,0, конечное значение рН > 7,8), 5 мМ MgCl₂, 25—50 мкМ крезоловый красный, cAMP или cGMP (0,02—15 мМ, «Sigma», США) и исследуемый препарат. За

исключением особо отмеченных случаев ФДЭ в препаратах предварительно активировали трипсином в концентрации 10 мкг/мл в течение 2 мин при 30°. Протеолиз останавливали ингибитором трипсина из сои (40 мкг/мл). Реакции инициировали добавлением циклических нуклеотидов и вели 5—30 мин при 30°. Ингибиторную способность И-НСП и И-НСК определяли, измеряя рН-метрическим способом скорость гидролиза сАМР (2—10 мМ) трипсинолизированными препаратами НСП и НСК до и после добавления препаратов ингибиторов. Опыты по изучению влияния видимого света ($\lambda > 540$ нм) на активность ФДЭ в препаратах S_7 проводили при температуре 20°, используя в качестве субстрата [14 C] сGMP (У.А. 55 мКи/ммоль, «Amersham», Англия). Реакционная смесь содержала (в мМ): трис-HCl—50, рН 7.4, NaCl—140, $MgCl_2$ —5, [14 C] сGMP—2—3 (конечная У.А. 5—20 мКи/ммоль) и указанное количество препарата S_7 . Количество [14 C] GMP и [14 C] сGMP в пробах, взятых из реакционного объема в соответствующие моменты времени определяли в результате их разделения методом тонкослойной хроматографии на силикагелевых пластинках «Kieselgel 60F₂₅₄» («Merck», ФРГ) в смеси изопропанол-аммиак-вода в соотношении 7:1:2 по объему с последующей резкой пластин и определением радиоактивности соответствующих зон на счетчике SL-4000 («Intertechnique», Франция) в толуольном сцинтилляторе. Фотоллиз препаратов S_7 и определение содержания обесцвеченного пигмента проводили по стандартной схеме [7, 9, 12].

Спектральные и спектрофотометрические измерения выполняли на спектрофотометре «Specord UV VIS» (ГДР). Для полного обесцвечивания зрительного пигмента в образцах их облучали светом с $\lambda > 540$ нм в течение 2 мин.

Гель-фильтрацию экстрактов препаратов НСК и Ф₄₇ проводили на предварительно калиброванной с помощью белков-маркеров и декстрана колонке (55 см×1 см) с сефакрилом S-200 («Pharmacia», Швеция) в 5 мМ трис-HCl, рН 8.0, 500 мМ NaCl, 0.1 мМ $MgCl_2$ и 0.1 мМ дитиотрептоле при скорости элюции 5 мл/ч и температуре 4°. В качестве маркеров использовали очищенную ФДЭ НСП [7], димер и мономер сывороточного альбумина быка, овальбумин, миоглобин кашалота и декстран с $M_r \times 10^{-3} = 180, 134, 67, 45, 18$ и 2000 Д соответственно. Поглощение элюата при 280 нм регистрировали с помощью проточного денситометра «Uvicord S» («LKB», Швеция) при длине оптического пути 0.2 см. Объем собираемых фракций составлял 0.9 мл. ИЭФ экстрактов НСК и Ф₄₇ в градиенте плотности сахарозы в диапазоне рН 3.5—10 проводили при 0° на колонке с рабочим объемом 35 мл при концентрации амфолитов («LKB», Швеция) 0.5% (по объему) и конечных значениях тока и напряжения 0.5 мА и 600 В в течение 24 ч. Объем собираемых фракций—1 мл.

Центрифугирование препаратов НСК при 100000 g в течение 2 ч в линейном градиенте концентрации сахарозы (25—45%, вес/объем), приготовленном на буфере А, проводили в пробирках с объемом 35 мл

в темноте при 10—15° в роторе со свободно подвешенными стаканами. Препарат НСК, разбавленный в 2,5 раза буфером А (объем 1—1,5 мл, концентрация белка 1—2 мг/мл) наносили на поверхность предварительно сформированного градиента концентрации сахарозы. Нанесение препарата и сбор фракций проводили при слабом красном свете ($\lambda > 680$ нм). Плотность раствора и концентрацию сахарозы в образцах определяли взвешиванием дозированного объема (100 мкл), отобранного из фракций.

Точность определения активности ФДЭ составляла 5—7%. Каждый из описанных в работе экспериментов был выполнен не менее 2—3 раз с практически одинаковыми результатами.

Результаты и обсуждение

Светоиндуцированные изменения спектральных характеристик препаратов НСК. Облучение препаратов НСК светом с $\lambda > 540$ нм приводило к уменьшению их поглощения в диапазоне 430—650 нм ($\lambda_m \sim 520$ нм) и его увеличению при длинах волн < 430 нм ($\lambda_m = 380—390$ нм) (рис. 1). Последующая инкубация образцов в темноте в течение 1—2 ч, а также их дальнейшее облучение не вызывали дополнительных спектральных изменений. Однако спектральные изменения, аналогичные представленным на рис. 1, можно было наблюдать в ре-

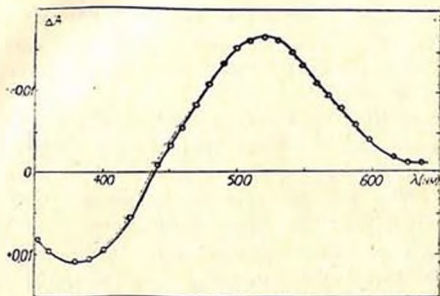


Рис. 1. Дифференциальный спектр, представляющий собой разность оптических плотностей (ΔA) обесцвеченного и темноадаптированного препаратов НСК (концентрация белка 3,6 мг/мл). По оси абсцисс—длина волны λ (нм). Длина оптического пути — 0,5 см.

зультате темновой инкубации светоадаптированных препаратов НСК с 11-цис-ретиналом (но не его транс-формой) и их последующего облучения светом.

Описанное спектральное поведение характерно для зрительных пигментов позвоночных, распадающихся при фотолизе на белковую часть и хромофор ретиналь в полностью-транс-форме ($\lambda_m = 380—390$ нм) и восстанавливающих свои спектральные характеристики в ходе темновой реакции с 11-цис-ретиналом [12]. Следовательно, светочувствительный

пигмент препаратов НСК, по-видимому, является зрительным пигментом. Положение максимума его спектра поглощения ($\lambda_{\text{м}} \sim 520$ нм) указывает на то, что этот пигмент является зрительным пигментом НСК, а не НСП сетчатки суслика [11]. Спектральных изменений, свидетельствующих о присутствии светочувствительных пигментов в других препаратах, полученных при фракционировании сетчаток суслика, не наблюдалось.

Содержание зрительного пигмента колбочек в сетчатке суслика определяли путем измерения величины фотоиндуцированного уменьшения поглощения при 520 нм в препаратах НСК, полученных из известного количества сетчаток. Значение молярного коэффициента экстинкции было равно $40000 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [12]. По данным 6 определений, выполненных на 4 независимо полученных препаратах НСК, сетчатка суслика содержала 65 ± 18 пмоль зрительного пигмента колбочек.

Близкая величина получена нами в результате оценки, выполненной иным образом. Известно [12], что концентрации зрительных пигментов в фоторецепторах сумеречного и дневного зрения позвоночных близки и составляют около 3 мМ. Данные электронномикроскопического анализа [13, 14] позволяют рассчитать, что сетчатка суслика содержит $1,2\text{--}1,5 \cdot 10^6$ колбочек, наружные сегменты которых имеют длину ~ 7 мкм и диаметр ~ 2 мкм. Таким образом, их общий объем составляет $0,026\text{--}0,033$ мкл. Следовательно, содержание зрительного пигмента колбочек в сетчатке суслика должно составлять около 80—100 пмоль. Это дополнительно свидетельствует о том, что присутствующий в препаратах НСК пигмент с $\lambda_{\text{м}} \sim 520$ нм действительно является зрительным пигментом колбочек сетчатки суслика.

Характеристики ФДЭ препаратов НСК и Φ_{47} . Активность ФДЭ в препаратах S_1 составляла подавляющую часть ($>95\%$) активности гомогената сетчаток и находилась в пределах $0,8\text{--}1$ мкмоль cGMP в мин на сетчатку. 60—70% ферментативной активности S_1 было обусловлено препаратом НСК. При центрифугировании препаратов НСК в линейном градиенте концентрации сахарозы распределение активности ФДЭ и светочувствительного пигмента с $\lambda_{\text{м}}$ при 520 нм полностью совпадали (рис. 2), при этом пигмент и материал, обладающий активностью ФДЭ, локализовались в зоне с плотностью $1,12\text{--}1,13 \text{ г/см}^3$ (концентрация сахарозы $\sim 31\text{--}33\%$, вес/объем). Подобные значения плавучей плотности характерны для препаратов изолированных наружных сегментов фоторецепторов как палочек, так и колбочек сетчатки позвоночных [9]. Изложенные данные позволили предположить, что активность ФДЭ в препаратах НСК является результатом функционирования эндогенного фермента наружных сегментов фоторецепторов сетчатки суслика. В согласии с этим предположением в сравнительных экспериментах было показано, что ФДЭ в составе препаратов НСК сетчатки суслика подобна фоторецепторной ФДЭ НСП быка по чувствительности к действию трипсина и термостабильности (рис. 3). Высокая чувствительность к действию трипсина позволяет допустить, что

в наружных сегментах фоторецепторов может присутствовать протеолитический фермент, участвующий в регуляции активности ФДЭ.

Процессы гидролиза сАМР и сGMP препаратами НСК хорошо описывались кинетикой Михаэлиса. Полученные значения кинетических характеристик представлены в таблице. Преимущественным субстратом реакции всегда являлся сGMP. Пренникубация препаратов НСК с трипсином увеличивала скорость гидролиза циклических нуклеотидов в 8—15 раз и заметно уменьшала величины K_m . Значения удельных скоростей гидролиза сАМР и сGMP варьировали от препарата к препарату, однако их отношение было постоянной величиной для всех исследованных образцов (см. таблицу). Близкими кинетическими характеристиками описываются и процессы гидролиза циклических нуклеотидов препаратами НСП сетчатки позвоночных [3—5, 8].

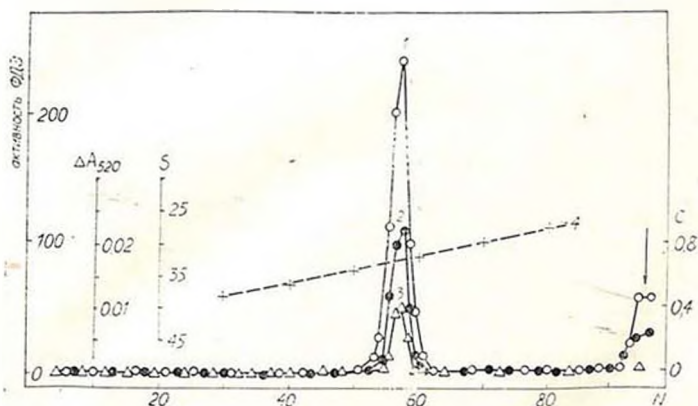


Рис. 2. Анализ препаратов НСК методом центрифугирования в линейном градиенте концентрации сахаразы. N—номер фракции. 1—активность ФДЭ при использовании в качестве субстрата 5 мМ сАМР (нмоль сАМР в мин на фракцию); 2—концентрация белка С (мг/мл) во фракциях; 3—относительное содержание светочувствительного пигмента с максимумом поглощения при 520 нм, измеренное как разность поглощения фракций в кювете с длиной оптического пути 0,5 см при 520 нм (ΔA_{520}) до и после их облучения светом с $\lambda > 540$ нм; 4—концентрация сахаразы S (% , вес/объем). Вертикальной стрелкой отмечена зона, в которую был внесен препарат НСК. Объем фракций—0,35 мл

Результаты дальнейших экспериментов дали основания считать, что ФДЭ препаратов НСК сетчатки суслика, как и ФДЭ сетчатки позвоночных [1, 3], является водорастворимым ферментом. В самом деле, общая активность ФДЭ в экстрактах НСК, полученных при гомогенизации препаратов НСК в растворе с низкой ионной силой и последующего центрифугирования, составляла 70—80% общей ферментативной активности исходного препарата НСК. Последующий анализ экстрак-

тов НСК методами гель-фильтрации и ИЭФ показал (рис. 4), что ФДЭ, экстрагированная из препарата НСК, ведет себя как глобулярный белок с M_r около 180 кД и характеризуется значением pI 5,3—5,6. Такие результаты дополнительно свидетельствуют о подобии ферментов препаратов НСК и ФДЭ НСП сетчатки позвоночных [3].

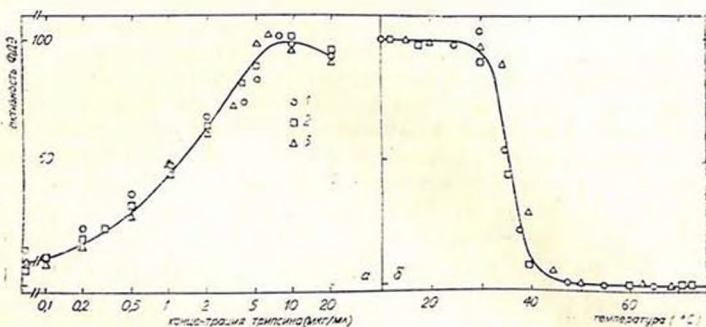


Рис. 3. Зависимости активности ФДЭ (в % от максимального значения) препаратов НСК (1), Ф₄₇ (2) сетчатки суслика и НСП сетчатки быка (3) от концентрации трипсина (а) и температуры инкубации (б): а—препараты НСК, Ф₄₇ и НСП (конечные концентрации по белку 135, 160 и 50 мкг/мл соответственно) инкубировали с трипсином в указанных концентрациях в течение 2 мин при 30°. Активность ФДЭ измеряли при 8 мМ сАМР (1, 2) или 2 мМ сАМР (3). Уровни ферментативной активности, принятые за 100%, составляли 0,8, 0,115 и 3 мкмоль сАМР в мин на мг белка препаратом НСК, Ф₄₇ и НСП соответственно; б—препараты инкубировали в течение 10 мин при указанных температурах и быстро охлаждали до 10°. Значения удельной скорости гидролиза 8 мМ сАМР, принятые за 100%, составляли 0,6, 0,08 и 9 мкмоль сАМР в мин на мг белка препаратов НСК, Ф₄₇ и НСП соответственно

Заметная часть (25—30%) активности ФДЭ в супернатантах S_1 принадлежала препарату Ф₄₇. Эксперименты показали, что фермент, ответственный за гидролиз сАМР и сГМР препаратами Ф₄₇, подобен ФДЭ препаратов НСК по кинетическим характеристикам (см. таблицу), чувствительности к действию трипсина и термостабильности (рис. 3). Общая активность ФДЭ в экстрактах препаратов Ф₄₇ составляла подавляющую часть общей активности исходного препарата Ф₄₇ (>90%), а поведение элюированной формы фермента при гель-фильтрации и ИЭФ не отличалось от поведения ФДЭ, присутствующей в экстрактах препаратов НСК. Таким образом, ферменты препаратов НСК и Ф₄₇, скорее всего, подобны. По-видимому, присутствие ФДЭ в препаратах Ф₄₇ связано с частичной экстракцией фермента из фоторецепторных структур в процессе гомогенизации сетчаток и фракционирования гомогенатов.

Препараты И-НСК подавляли активированный трипсином процесс гидролиза сАМР как в препаратах НСК сетчатки суслика, так и в препаратах НСП сетчатки быка, причем степень ингибирования была примерно пропорциональна количеству И-НСК (рис. 5, а, б.). Предварительная инкубация И-НСК с трипсином (10 мкг/мл) в течение 10 мин при 20° полностью подавляла его ингибирующую способность. Это может означать, что в составе препарата НСК присутствует белковый компонент, близкий по своей термостабильности и функциональной активности субъединице ФДЭ фермента НСП сетчатки позвоночных. В

Таблица

Кинетические характеристики процессов гидролиза сАМР и сGMP препаратами НСК и Ф₄₅ сетчатки суслика

Параметр	Режим измерения ФДЭ-активности	Препарат	
		НСК	Ф ₄₅
$K_m^{сА}$ (мМ)	без трипсина	5.5 ± 1.2	5.0 ± 1.0
$K_m^{сG}$ (мМ)	без трипсина	0.25 ± 0.10	0.3 ± 0.12
$V^{сG}, V^{сА}$	без трипсина	1.2 ± 0.3	1.3 ± 0.4
$K_m^{сА}$ (мМ)	с трипсином	1.5 ± 0.3	1.2 ± 0.4
$K_m^{сG}$ (мМ)	с трипсином	0.10 ± 0.03	0.11 ± 0.03
$V^{сG}, V^{сА}$	с трипсином	2.7 ± 0.7	2.7 ± 0.6

Примечание. Индексы сА и сG при K_m и V означают субстрат (сАМР или сGMP соответственно), при использовании которого получены указанные в таблице значения. Каждое из приведенных значений является результатом измерений, выполненных не менее чем на трех независимо полученных препаратах.

последующих опытах было показано, что И-НСП подавляет гидролиз циклических нуклеотидов не только в препаратах НСП сетчатки быка, но и в препаратах НСК сетчатки суслика (рис. 5, в, г). Таким образом, субъединица ФДЭ из НСП сетчатки быка, по-видимому, может выступать в роли ингибитора фермента препарата НСК. Совокупность полученных данных хорошо согласуется с предположением о том, что присутствующий в препарате НСК сетчатки суслика фермент близок ФДЭ НСП сетчатки позвоночных.

В целях изучения принципов регуляции сGMP-специфичного фермента сетчатки суслика мы выполнили ряд опытов с использованием супернатантов S_1 , полученных из сетчаток животных, длительно адаптированных к темноте. Кратковременное облучение светом таких препаратов в присутствии 25 мкМ GTP быстро увеличивало скорость гидролиза сGMP (рис. 6, а): активность ФДЭ в образце, содержащем ~10% обесцвеченного зрительного пигмента, была близка к активности фермента в полностью обесцвеченном препарате и составляла до 50% от величины активности ФДЭ в трипсинизированном супернатанте S_1 (рис. 6, а). В темноадаптированных супернатантах S_1 добавля-

ление ГТР не меняло активности сГМР-специфичной ФДЭ (рис. 6, а), однако, в согласии с полученными ранее результатами [7], в светоадаптированных образцах ГТР увеличивал скорость гидролиза сГМР в 2—3 раза (рис. 6, б). Совокупность полученных данных позволяет предположить, что сГМР-специфичный фермент сетчатки суслика активируется при обесцвечивании зрительного пигмента, а ГТР, как и в НСП сетчатки позвоночных, играет роль кофактора в процессе фотоактивации ФДЭ.

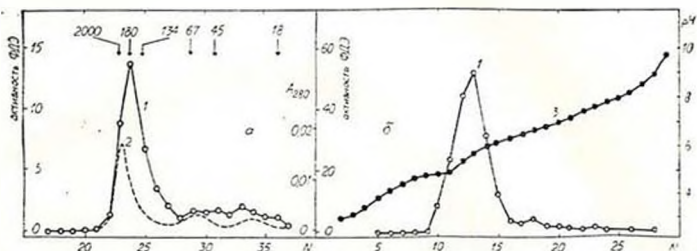


Рис. 4. Гель-фильтрация (а) и НЭФ (б) экстрактов препаратов НСК. Разделению подвергали 100 мкл (а) и 300 мкл (б) экстрактов с концентрацией по белку 0,8 мг/мл и величиной У. А. ФДЭ 1,2 мкмоль сАМР в мин на мг белка (при 8 мМ сАМР). N—номер фракции. Стрелками показаны фракции, в которых элюировались белки-маркеры и декстрин указанных значений $M_r \times 10^{-3}$. 1—активность ФДЭ (нмоль сАМР в мин на фракцию), 2—поглощение элюата при 280 нм (A_{280}), 3—значение pH в полученных фракциях

Известно [4, 5], что максимальная скорость гидролиза сГМР фосфодинэстеразой НСП очень велика (~ 0.25 мкмоль сГМР в мин на пмоль фермента) и практически равна предельному значению V (ограниченному диффузией) для фермента с K_m около 10^{-4} М. Согласно данным настоящей работы, сГМР-специфичная ФДЭ фоторецепторов сетчатки суслика подобна ФДЭ НСП сетчатки быка по всем использованным для сравнения характеристикам. Это дает основание считать, что величина максимальной удельной активности фермента фоторецепторов сетчатки суслика не может значительно превышать приведенное выше значение V . Согласно нашим данным, сетчатка суслика способна гидролизовать 0,8—1 мкмоль сГМР в мин. Следовательно, фоторецепторные структуры этой сетчатки содержат не менее 3—4 пмоль ФДЭ.

Количество зрительного пигмента с $\lambda_{\max} \sim 520$ нм в сетчатке суслика составляет около 65 пмоль, следовательно на 100 молекул зрительного пигмента колбочек приходится не менее 4—6 молекул ФДЭ. Относительное содержание ФДЭ в НСП сетчатки позвоночных составляет около 2 молекул фермента на 100 молекул родопсина [4], а в сетчатке суслика палочки составляют не более 5% от общего количества фото-

рецепторных клеток [10]. Таким образом, результаты выполненного выше расчета фактически исключают возможность того, что гидролиз циклических нуклеотидов в препаратах сетчатки суслика является результатом функционирования ФДЭ НСП. Следовательно, обнаруженная нами cGMP-специфичная ФДЭ, скорее всего, является эндогенным ферментом колбочек.

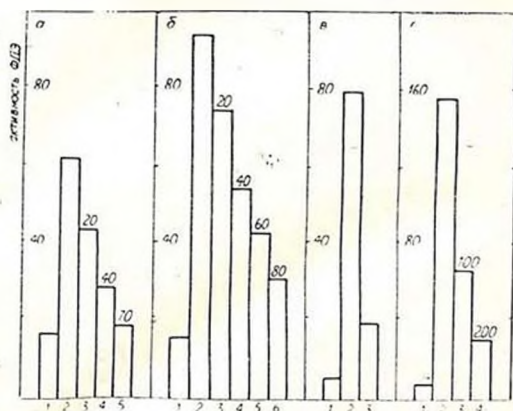


Рис. 5. Влияние препаратов И-НСК (а, б) и И-НСП (в, г) на скорость гидролиза 2 мМ сАМР (а, б) и 10 мМ сАМР (в, г) препаратами НСК сетчатки суслика (а, в) и НСП сетчатки быка (б, г). 1, 2—активность ФДЭ (нмоль сАМР в мин на пробу) в препаратах НСК и НСП до и после их инкубации с трипсином соответственно. 3, 6—активность ФДЭ в препаратах НСК и НСП после добавления указанных количеств (в мкл) препаратов И-НСК или И-НСП. Объем реакционной смеси—2 мл

Полученные нами данные показывают, что в НСК сетчатки суслика присутствует фермент, подобный ФДЭ НСП по своим кинетическим характеристикам во всех исследованных режимах его функционирования, термостабильности, чувствительности к действию трипсина, поведению при его анализе методом гель-фильтрации, значению pI , способности заметно активироваться в присутствии обесцвеченного зрительного пигмента и GTP, а также ингибироваться термостабильным трипсиноинактивируемым белковым компонентом, функционально подобным субъединице ФДЭ НСП сетчатки быка. Результаты выполненного нами ранее исследования [7] позволяют предполагать, что в состав ФДЭ НСК сетчатки суслика входят субъединицы с M_r около 90 кД. Это хорошо согласуется с данными работы Hargwitz и соавт. [8], в которой было продемонстрировано, что НСК сетчатки позвоночных содержат фермент, иммунологически родственный ФДЭ НСП. Хотя поведение этого фермента при его анализе методом ИОХ несколько отличалось от поведения ФДЭ НСП, он, как и ФДЭ НСП, обладал

ярко выраженной специфичностью к сGMP, имел в своем составе субъединицы с $M_r \sim 90$ кД и активировался в присутствии трансдуцина НСП и GTP [8]. Совокупность этих результатов, а также полученные нами данные, согласно которым содержание ФДЭ в НСК не ниже, чем в НСП, дают веские основания предполагать, что колбочки, как и палочки, содержат ферментативный каскад усиления зрительного стимула, ключевым элементом которого является ФДЭ, посредником—GTP, связывающий белок, а сGMP играет роль диффузионного медиатора. Это заключение хорошо согласуется с данными о наличии в НСК GTP-связывающего белка [15] (по-видимому, несколько отличающегося от трансдуцина [16]) и высоким содержанием в колбочках сGMP [17], способного, как и в палочках, управлять катионной проводимостью фоторецепторных мембран [18, 19].

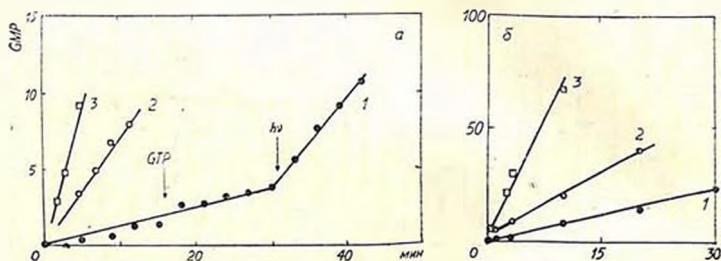


Рис. 6. Действие света (а) и GTP (а, б) на процессе гидролиза [^{14}C] сGMP темноадаптированными (а) и светсадаптированными (б) препаратами супернатантов S_T . По оси абсцисс—время реакции (мин). GMP—количество образовавшегося [^{14}C] GMP (нмоль) в реакционной смеси (объем 30 мкл). Реакции инициировали добавлением [^{14}C] сGMP до конечных концентраций 3 мМ (а) и 2,5 мМ (б). Реакционная смесь содержала 3 мкл (а) и 15 мкл (б) препарата S_T , полученных в результате двух независимых выделений: а—и отмеченные стрелками моменты времени в реакционную смесь добавляли GTP до конечной концентрации 25 мкМ и облучали образец в течение 20 с светом с $\lambda > 540$ нм, обесвечивавшим $\sim 10\%$ зрительного пигмента. Кинетики гидролиза [^{14}C] сGMP предварительно полностью обесвеченными и преинкубированными с 25 мкМ GTP препаратами S_T (2) или препаратами S_T , преинкубированными с трипсином в стандартных условиях (3), приведены для сравнения; б—кинетики гидролиза [^{14}C] сGMP светсадаптированными препаратами S_T в отсутствие GTP (1), в присутствии 25 мкМ GTP (2) и после предварительной инкубации препарата S_T с трипсином в стандартных экспериментальных условиях (3)

Хорошо известно [20], что колбочка, в отличие от палочки, характеризуется относительно низкой чувствительностью, но обладает высоким быстродействием и способна работать в широком диапазоне интенсивностей света. Это предполагает наличие некоторых отличий в характеристиках систем фототрансдукции НСП и НСК. Поиску и исследованию таких отличий будет посвящена наша последующая работа.

CYCLIC 3',5'-GUANOSINEMONOPHOSPHATE PHOSPHODIESTERASE PROPERTIES AND CONTENT IN THE GROUND SQUIRREL RETINAL PHOTORECEPTORS OUTER SEGMENTS

KALININ E. V., ORLOVA T. G., FREIDIN A. A., ORLOV N. J.
Institute of Biological Physics of the USSR Academy of Sciences,
Poustchino, Moscow region, USSR

The cyclic nucleotides hydrolysis in the different preparations of cone-dominant ground squirrel retinas has been investigated. Data obtained indicate that this retina contains the cGMP-specific PDE (cGMP-PDE). The characteristics of this enzyme are very similar to those of cGMP-PDE in vertebrate retinal rod outer segments. This enzyme sediments with cone visual pigment containing membranes at sucrose density linear gradient centrifugation. The cGMP-PDE content in the ground squirrel retina has been estimated to be 4–6 copies of enzyme molecules per 100 molecules of cone visual pigment. These results suggest that cGMP-PDE is an endogenous enzyme of cones and may play an important role in phototransduction in vertebrate photopic vision receptor cells.

ЛИТЕРАТУРА

1. Stryer L., Hurley J. B., Fung B. K.—K. Trends Biochem. Sci., v. 6, p. 245—247, 1981.
2. Fesenko E. E., Kolesnikov S. S., Lyubarsky A. L., Nature, v. 313, p. 310—313, 1985.
3. Baehr W., Dewlin M. J., Applebury M. L. J. Biol. Chem., v. 254, p. 11669—11677, 1979.
4. Sitaramayya A., Harkness J., Parkes J. H., Gonzalez-Oliva C., Liebman P. A. Biochemistry, v. 25, p. 651—656, 1986.
5. Hurley J. B., Stryer L. J. Biol. Chem., v. 257, p. 11094—11099, 1982.
6. Dumber I. L., Etingoff R. H., Biochim. et biophys. acta, v. 479, p. 474—484, 1976.
7. Орлов Н. Я., Калинин Е. В., Орлова Т. Г., Фрейдлин А. А., Ивановичкий Г. Р. Докл. АН СССР, т. 286, с. 454—457, 1986.
8. Hurwitz R. L., Bant-Millam A. H., Chang M. L., Beavo J. A. J. Biol. Chem., v. 260, p. 568—573, 1985.
9. Matsumoto H., Takunaga F., Yoshizawa T. Biochim. et biophys. acta, v. 404, p. 300—308, 1975.
10. West R. W., Dowling G. J. J. Comp. Neurol., v. 159, p. 439—460, 1975.
11. Jakobs G. H., Netts J., Croguale M. J. Comp. Physiol., v. A156, p. 503—509, 1985.
12. Fein A., Shutz E. Z., Photoreceptors. Their role in vision. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK, 1982.
13. Anderson D. H., Fisher S. K. J. Ultrastruct. Res., v. 55, p. 119—141, 1976.
14. DeVries G. W., Cohen A. I., Lowry O. H., Ferendelly J. A. Exp. Eye Res., v. 29, p. 315—321, 1979.
15. Fukada Y., Akino I. Photochem. Photobiophys., v. 11, p. 269—279, 1986.
16. Grunwald G. B., Gierschik P., Nirenberg M., Spiegel A. Science, v. 231, p. 856—859, 1986.
17. Ortiz R. A., Tamayo A., Johnson C., Sperling H. G. J. Histochem. and Cytochem., v. 31, p. 1305—1311, 1983.
18. Haynes L., Yau K.—W. Nature, v. 317, p. 61—64, 1985.
19. Cobbs W. H., Barkdoll A. E., Rugh Jr. E. N. Nature, 317, p. 64—66, 1985.
20. Paylor D. A., Nunn B. J. Methods Enzymol., v. 81, p. 403—423, 1982.

Поступила 4. V 1987



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

Ca²⁺-КАЛЬМОДУЛИНЗАВИСИМАЯ 5'-НУКЛЕОТИДАЗА ГИПОТАЛАМУСА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА И ЕЕ РЕГУЛЯЦИЯ С-МОДУЛИНОМ

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

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

5'-нуклеотидаза (5'-НК) была выделена из растворимой фракции гипоталамуса быка с использованием ИОХ на ДЭАЭ TSK, аффинной хроматографии на фенил-сефарозе, с которой 5'-НК связывалась в присутствии Ca²⁺ и элюировалась буфером, содержащим ЭГТА, а также аффинной хроматографии на конканавалин А-сефарозе. Установлено, что выделенный фермент активируется более чем в 6 раз под действием кальмодулина (КМ) в комплексе с Ca²⁺ (10⁻⁴ M). Полумаксимальный эффект наблюдался при концентрации КМ 5 · 10⁻⁷ M.

Наряду с этим продемонстрирована активация 5'-НК под влиянием термостабильного Ca²⁺-независимого пептида (С-модулина), обнаруженного в составе фракции, содержащей кардиотропный нейрогормон «С», выделенной ранее из гипоталамуса быка. С-модулин проявлял более высокое средство к ферменту по сравнению с КМ и активировал 5'-НК в отсутствие Ca²⁺.

Высказано предположение о сходстве механизмов регуляции 5'-НК и других КМ-зависимых ферментов.

Согласно современным представлениям, подавляющее число процессов, регулируемых ионами кальция, происходит с участием Ca²⁺-связывающих белков [1]. Одним из наиболее известных внутриклеточных рецепторов Ca²⁺ является КМ [2]. Связывание Ca²⁺ индуцирует конформационные изменения молекулы КМ, вызывающие увеличение степени ее гидрофобности. Вследствие этого белок-модулятор приобретает способность взаимодействовать с различными ферментами, белками, пептидами, компонентами мембран и низкомолекулярными соединениями.

В настоящей работе приведены новые данные о взаимодействии 5'-НК (КФ 3.1.3.5) гипоталамуса с Ca²⁺ и с КМ. Они свидетельствуют о том, что пути регуляции этого Ca²⁺, КМ-зависимого фермента аналогичны механизмам, характерным для других активируемых КМ систем. Наряду с этим продемонстрирована возможность активации 5'-НК под действием термостабильного пептидного фактора, обнаруженного в составе фракции, содержащей кардиотропный нейрогормон «С», выделенный ранее из гипоталамуса быка [3]. Этот фактор был назван С-модулин

ном в связи с тем, что он, по всей вероятности, является модулятором кардиотропного действия нейрого르몬 «С», сопровождая его почти на всех этапах очистки, а также на основании его способности вызывать активацию фосфодиэстеразы (ФДЭ) циклических нуклеотидов, подобную КМ по характеру действия на фермент.

Материалы и методы

В работе были использованы следующие реактивы: 5'-AMP, 5'-GMP, ADP, ATP, дитиотреитол (ДТТ) («Reanal», Венгрия); ЭГТА («Calbiochem», США); β-меркаптоэтанол («Merck», ФРГ); трис («Serva», ФРГ); хроматографические сорбенты: ДЭАЭ TSK Toyoparl 650 M, «Toyo Soda», Япония), фенил-сефароза и конканавалин А-сефароза, а также сефакрил S-200 (Соп А-сефароза) («Pharmacia», Швеция); анионообменная смола Амберлит CG-400, 100-200 меш («Serva», ФРГ); пластины «Силуфол» («Kawalier», ЧССР); α-метилманноза (α-MM) была предоставлена сотрудником нашей лаборатории Возным Я. В. [¹⁴C] 5'-AMP и [¹⁴C] 5'-GMP («Chemapol», ЧССР); остальные препараты марок х. ч. и ос. ч. («Союзхимреактив», СССР).

Фермент выделяли из гипоталамуса крупного рогатого скота в соответствии с методом, использованным ранее для очистки ФДЭ циклических нуклеотидов [4], модифицированным [5] на основе афинной хроматографии на фенил-сефарозе [6]. Ткань гомогенизировали в 2,5 мМ трис-HCl буфере, pH 7,0 (1:2,5), содержащем 1 мМ MgCl₂, в отсутствие или в присутствии 0,1 мМ ЭГТА. Супернатант, полученный при центрифугировании гомогената (75 000 g, 60 мин) наносили на колонку (4×6 см) с ДЭАЭ TSK. Колонку промывали тем же буфером, содержащим 0,05 М NaCl. Элюцию проводили с использованием линейного и ступенчатого градиента NaCl (0,05—0,35 М). Элюат подвергали далее афинной хроматографии на колонке с фенил-сефарозой (4×6 см), предварительно уравновешенной буфером, содержащим 1 мМ CaCl₂. После промывки колонки элюцию осуществляли буфером, содержащим 5·10⁻⁴ М ЭГТА и 0,15 М NaCl, а затем тем же буфером с использованием непрерывного обратного градиента NaCl (0,15—0,00 М). Элюат наносили далее на колонку (1,2×1,5 см) с Соп А-сефарозой, уравновешенную 25 мМ трис-HCl буфером, pH 7,0, содержащим 0,1 М NaCl, 1 мМ MgCl₂, 1 мМ CaCl₂ и 1 мМ MnCl₂. После промывки колонки элюцию проводили буфером, содержащим 0,1 М α-MM. В некоторых случаях выделенный фермент подвергали гель-фильтрации на колонке (1,5×100 см) с сефакрилом S-200 со скоростью 10 мл/ч с применением 25 мМ трис-HCl буфера, pH 7,0, содержащего 0,1 М NaCl и 10⁻⁴ М ЭГТА. Все операции проводили при 4°. Выход белка контролировали по изменению оптической плотности при длине волны 280 нм.

КМ был выделен из мозга быка по методу Gopalakrishna, Anderson [6] с некоторыми модификациями [5].

Активность 5'-НК определяли двумя способами. В первом случае для этого использовали 10 мкл инкубационной среды, содержащей 50 mM трис-HCl буфер, pH 7,0, 1 mM $MgCl_2$, 5'-AMP и $[^{14}C]$ -5'-AMP (0,1 мкКи) или 5'-GMP и $[^{14}C]$ 5'-GMP (0,1 мкКи) в качестве субстрата, и определенное количество фермента элюированных колоннок фракций. Инкубацию проводили при 30° в течение различных промежутков времени. Реакцию останавливали в кипящей водяной бане. Продукты реакции разделяли с помощью ТСХ на силикагеле и идентифицировали с применением свидетелей в ультрафиолете. Счет радиоактивности проб определяли с помощью жидкостного сцинтилляционного спектрометра типа «Intertechnique» (Франция).

Во втором случае продукты гидролиза, осуществляемого в инкубационной смеси объемом 100 мкл, разделяли с использованием анионообменной смолы «Амберлит». По окончании ферментативной реакции к пробам добавляли 0,5 мл смолы, суспендированной в воде (1:2). После центрифугирования производили счет радиоактивности супернатанта (8000 об/мин, 5 мин), содержащего $[^{14}C]$ аденозин, не сорбирующийся на смоле, в отличие от 5'-AMP. В первом случае использовали сцинтиллятор ЖС-106, во втором—ЖС-7А. Результаты рассчитывали по количеству гидролизованного субстрата с учетом остаточной радиоактивности проб в отсутствие фермента и уровня неспецифической сорбции аденозина на ионообменнике при полном гидролизе субстрата в присутствии избытка фермента.

Результаты и обсуждение

ИОХ растворимой фракции гипоталамуса быка на колонке с ДЭАЭ TSK выявила наличие двух пиков активности 5'-НК (рис. 1). Эти пики элюируются при концентрации NaCl в буфере 0,15 и 0,25 M, соответственно. При аффинной хроматографии суммарного элюата пер-

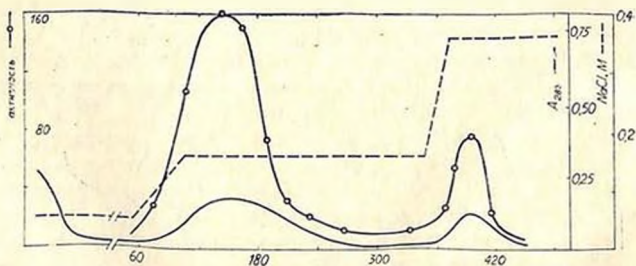


Рис. 1. Хроматография 5'-НК на колонке с ДЭАЭ TSK. По оси абсцисс — объем элюата в мл; по оси ординат (слева) — базальная активность фермента (имоль 5'-GMP/мин) при концентрации субстрата — 5 мМ

вого пика на феноил-сефарозе оказалось, что фермент обладает способностью связываться с гидрофобной матрицей при наличии Ca^{2+} (0,1 mM), в отсутствие которого этого связывания не происходит. Возможность

элюирования связанного фермента с колонки с помощью ЭГТА (0,2 мМ), специфично хелатирующего Ca^{2+} , свидетельствует о Ca^{2+} -зависимом взаимодействии 5'-НК с фенил-сефарозой. Можно полагать, что под влиянием Ca^{2+} происходят конформационные изменения молекулы фермента, приводящие к увеличению степени её гидрофобности. С фенил-сефарозы фермент также элюировался двумя пиками (рис. 2, а). 5'-НК, выделенная в каждом из этих пиков, активировалась при добавлении Ca^{2+} .

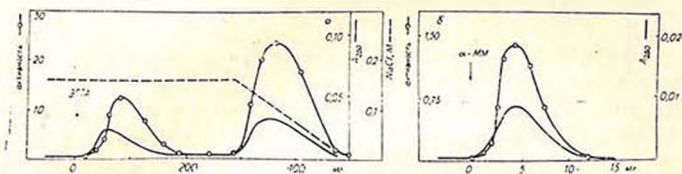


Рис. 2. а—хроматография 5'-НК на колонке с фенил-сефарозой. По оси абсцисс—объем элюата в мл; по оси ординат (слева)—активность фермента в присутствии $5 \cdot 10^{-4}$ М ЭГТА (нмоль 5' АМР/мин) при концентрации субстрата—5 мкМ. б—хроматография 5'-НК на колонке с Со. А-сефарозой. По оси ординат (слева)—активность фермента (мкмоль 5'-АМР/мин) при концентрации субстрата—5 мкМ

Далее фермент подвергали аффинной хроматографии на СоА-сефарозе. Оказалось, что 5'-НК, выделенная как в первом, так и во втором пиках с колонки с фенил-сефарозой, связывается к СоА в присутствии Mn^{2+} и Ca^{2+} (1 мМ) и элюируется буфером, содержащим 0,1 М α -ММ (рис. 2, б). Это, вероятно, свидетельствует о том, что выделенная из растворимой фракции гомогената 5'-НК, подобно ферменту фракции мембран [7], является гликопротеином, имеющим в своем составе α -D-маннопиранозидальные остатки. Чувствительность 5'-НК, элюированной с СоА-сефарозы, к активации в присутствии Ca^{2+} сохранялась. Зависимость активности 5'-НК от Ca^{2+} в диапазоне концентраций 10^{-8} — 10^{-5} М имела сигмовидный характер (рис. 3, а). Полумаксимальная активация наблюдалась при концентрации Ca^{2+} $5 \cdot 10^{-7}$ М, что свидетельствует о высоком сродстве фермента к Ca^{2+} . Максимальный эффект достигался в присутствии 10^{-5} М Ca^{2+} . При дальнейшем повышении концентрации Ca^{2+} степень активации фермента снижалась.

Несомненный интерес представлял вопрос о возможности регуляции активности 5'-НК под действием КМ. Результаты исследования показали, что 5'-НК, специфично элюированная с СоА-сефарозы, активируется КМ в присутствии 10^{-4} М Ca^{2+} (рис. 3, б). Чувствительностью к активации КМ обладала как первая, так и вторая форма фермента, выделенная с помощью фенил-сефарозы и подвергнутая дальнейшей очистке. При внесении в инкубационную смесь 1 мМ ЭГТА активирующий эффект не проявлялся. Это свидетельствует о том, что стимулирующее действие КМ на активность 5'-НК является Ca^{2+} -за-

висимым процессом. В большинстве случаев КМ в комплексе с Ca^{2+} активировал фермент приблизительно в 6 раз, кривая зависимости скорости реакции от концентрации КМ, так же как и в случае Ca^{2+} , носила сигмовидный характер.

Кинетический анализ показал, что действие КМ выражается в увеличении V ; сродство фермента к субстрату при этом не изменяется (K_m для 5'-AMP составляет 5 мкмоль). Отметим при этом, что адениловые нуклеотиды конкурировали с субстратом за активный центр: ADP (50 мкМ) и АТР (250 мкМ) полностью подавляли активность 5'-НК.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что 5'-НК гипоталамуса является Ca^{2+} -зависимым ферментом. Наряду с этим было обнаружено, что термостабильный пептидный фактор—С-модулин, выделенный из состава фракций кардиотропного нейrogормона «С» [3], также способен активировать 5'-НК, но Ca^{2+} -независимым способом. С-модулин в концентрации 1 мкг/мл стимулировал фермент в 5—8 раз в отсутствие экзогенного Ca^{2+} (рис. 4). При добавлении в инкубационную смесь 10^{-4} М CaCl_2 или 10^{-4} М ЭГТА результат не изменялся. С-модулин проявлял значительно большее сродство к 5'-НК по сравнению с КМ. Можно полагать, что при лимитированных концентрациях Ca^{2+} или КМ в интактной клетке 5'-НК преимущественно регулируется С-модулинподобными пептидами, не требующими присутствия Ca^{2+} для проявления своей активности. При этом нельзя исключить вероятность того, что в коронарорасширяющем влиянии нейrogормона «С» определенную роль играют С-модулины, которые способствуют образованию 5'-AMP из cAMP, а затем и аденозина. При этом необходимо принять во внимание данные, свидетельствующие о нейротрансмиттерных функциях аденозина в ЦНС, опосредованных пуринергическими рецепторами [7], а также о роли аденозина в регуляции сердечно-сосудистой деятельности [8].

Нам представляется, что 5'-НК по своим свойствам проявляет значительное сходство с другими КМ-зависимыми ферментами, которые обладают способностью активироваться Ca^{2+} в отсутствие экзогенного КМ. Наиболее характерными примерами этих ферментов могут служить киназа фосфоорилазы [9] и фосфопротенифосфатаза (кальцинейрин) [10]. Они могут стимулироваться Ca^{2+} двумя путями. С одной стороны, эффект возникает в результате взаимодействия Ca^{2+} с Ca^{2+} -связывающим белком, входящим в качестве субъединицы в состав фермента (в случае киназы фосфоорилазы этим белком является КМ, в случае кальцинейрина—отличный от КМ белок с $M_r=19$ кД). С другой стороны, стимулирование активности обусловлено наличием у фермента дополнительного КМ-связывающего центра, к которому проявляет сродство комплекс Ca^{2+} -КМ.

Взаимодействие с КМ при минимально возможных в условиях клетки концентрациях Ca^{2+} ($<10^{-7}$ М), недостаточных для насыщения КМ, показано и для Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазы [11]. Авторами высказано

предположение о том, что КМ может быть слабо связанной субъединицей АТРаза. Оказалось, что фермент располагает, по крайней мере, двумя КМ-связывающими центрами, а комплекс КМ-АТРаза — тремя Ca^{2+} -связывающими центрами.

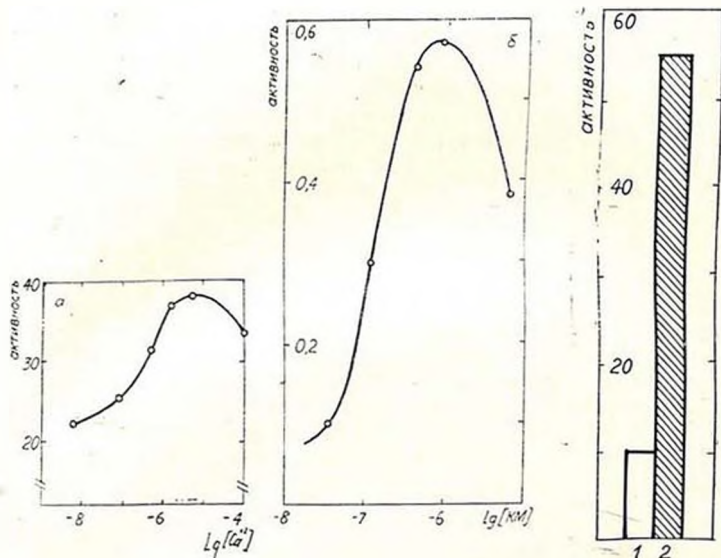


Рис. 3. Активация 5'-НК под действием Ca^{2+} (а) и КМ в присутствии 10^{-4} М Ca^{2+} (б). По оси ординат — активность фермента (нмоль 5'-АМР/мин) при концентрации субстрата 5 мкМ

Рис. 4. Активность 5'-НК (в нмоль 5'-АМР/мин) в отсутствие и в присутствии С-модулина (1 мкг/мл)

По-видимому, и ФДЭ циклических нуклеотидов мозга крысы также обладает способностью к образованию прочного комплекса с КМ в отсутствие Ca^{2+} . Одна из множественных форм фермента активировалась Ca^{2+} без экзогенного КМ [12]. Ранее это свойство было продемонстрировано на ФДЭ легких [13]. Отмечалось, что ФДЭ мозга и сердца быка менее прочно связывает эндогенный КМ, который легко отделяется от фермента под действием ЭГТА [14, 15].

В пользу существования промежуточного комплекса КМ ФДЭ, обладающего низкой активностью, свидетельствует также тот факт, что диссоциация КМ из тройного активированного комплекса КМ- Ca^{2+} -ФДЭ под действием ЭГТА происходит медленно, в то время как инактивация ФДЭ — очень быстрый процесс.

На основании вышесказанного можно сделать заключение, что наряду с известными Ca^{2+} -связывающими белками, к числу которых

относятся парвальбумины, тропонины-С, кальмодулин, легкие цепи миозина, белок S-100 и др., роль рецепторов Ca^{2+} могут играть ферменты, содержащие эти белки в составе ферментного комплекса. В то же время существует система пептидов в мозгу, оказывающих регулирующее влияние на активность ФДЭ cAMP и 5'-НК без участия Ca^{2+} и кальмодулина.

5'-НК является гликопротеином и принадлежит к эктоэнзимам во многих тканях, в том числе и в мозгу [17]. Первоначально Naidoo в 1962 г. было высказано мнение, что 5'-НК является миелиновым ферментом [18] и связана главным образом с аксолемой олигодендроглии. Нам же удалось выделить 5'-НК из растворимой фракции гипоталамуса.

Недавно было обнаружено, что выделенная нами 5'-НК гипоталамуса обладает также фосфодиэстеразной активностью (неопубликованные данные). При использовании последовательных этапов очистки 5'-НК на ДЭАЭ TSK, фенил-сефарозе, голубой сефарозе, Соп А-сефарозе, cAMP-силикагеле и сефакриле S-200 нами были получены пики активности 5'-НК, которые строго соответствовали пикам активности ФДЭ циклических нуклеотидов. Кроме того, была выявлена взаимосвязь между этими ферментами. Так, при исследовании начальных скоростей 5'-НК показано, что константа скорости реакции первого порядка в 100 раз выше в случае гидролиза 5'-AMP, образующегося из cAMP, по сравнению с гидролизом 5'-AMP, внесенного в пробирку извне. Полученные результаты позволяют предположить существование в гипоталамусе сопряженной системы ФДЭ—5'-НК.

Ca^{2+} , CALMODULIN-DEPENDENT 5'-NUCLEOTIDASE FROM BOVINE HYPOTHALAMUS AND ITS REGULATION BY C-MODULIN

GALOYAN A. A., GURVITS B. Y., SHAROVA N. P., ALEXANYAN S. S.

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

5'-Nucleotidase has been purified from the soluble fraction of bovine hypothalamus by chromatography on DEAE-TSK, phenyl- and concanavalin A-Sepharose. Complex of calmodulin and calcium (the latter 10^{-4} M) activates the enzyme more than 6-fold; calmodulin (5×10^{-5} M) induces half maximal activation.

In addition to that 5'-nucleotidase is activated by C-modulin—a thermostable Ca^{2+} -independent peptide, previously identified in the preparation of neurohormone "C". C-modulin exerts a higher affinity to enzyme than calmodulin and activates it in the absence of Ca^{2+} .

ЛИТЕРАТУРА

1. Kretsinger R. H. Ann. Rev. Biochem., v. 45, p. 239—266, 1975.
2. Cheung W. Y. Science, v. 207, p. 19—27, 1980.
3. Galoyan A. A. Neurochem. Res., v. 11, p. 759—787, 1986.

4. Galoyan A. A., Gurvitz B. Ya. *Neurochem. Res.*, v. 10, p. 1467—1481, 1985.
5. Бобруский И. Л., Шайхин С. М., Муратова М. В., Баранова Л. Н., Северин Е. С. *Биохимия*, т. 52 с. 1344—1351, 1987.
6. Gopalakrishna R., Anderson W. B. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, v. 104, p. 830—836, 1982.
7. Nakamura S., Mimori Y., Iijima S., Nagata H., Yamao S., Kamayama M.—In: *Physiology and Pharmacology of Adenosine Derivatives* (eds. I. W. Daly, Y. Kuroda, I. W. Phillis, H. Shimizu, M. Ui), p. 21—29, N. Y., Raven Press, 1983.
8. Arch J. R. S., Newsholme E. A. *Biochem. J.*, v. 174, p. 965—977, 1978.
9. Cohen P., Burchell A., Fculkes J. G., Cohen P. T. W., Vanaman T. C., Nairn A. C. *FEBS Lett.*, v. 92, p. 287—293, 1978.
10. Klee C. B., Krinks M. N., Manalan A. S., Cohen P., Stewart A. A. *Methods in Enzymol.*, v. 102, p. 227—244, 1983.
11. Alakhov V. Yu., Emelyanenko E. I., Shukhparonov M. I. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, v. 132, p. 591—697, 1985.
12. Strada S. J., Murtin M. W., Thompson W. J.—In: *Advances in Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Res.* (eds. S. I. Strada, W. J. Thompson) v. 16, p. 13—29, N. Y., Raven Press, 1984.
13. Sharma R. K., Wirch E. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, v. 91, p. 338—344, 1979.
14. Sharma R. K., Wang T. A., Wirch E., Wang I. H. *J. Biol. Chem.*, v. 255, p. 5916—5923, 1980.
15. La Porte D. C., Toscano W. A., Storm D. R. *Biochemistry*, v. 18, p. 2820—2825, 1979.
16. Галоян А. А. *Нейрохимия*, т. 6, № 1, с. 3—9, 1987.
17. Stefanovic V., Mandel P., Rosenberg A. *Biochemistry*, v. 18, p. 357—361, 1979.
18. Naidoo D. J. *Histochem. Cutochem.*, v. 10, p. 421—434, 1962.
19. Mallol J., Bozal J. J. *Neurochem.*, v. 40, p. 1205—1211, 1982.
20. Centelles J. J., Franco R., Canelu E. J., Bozal J. *Neurochem. Res.*, v. 11, № 4, p. 471—479, 1986.

Поступила 19. V 1987



СОДЕРЖАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ КЛАССОВ РНК В ГОЛОВНОМ МОЗГУ ПРИ ДЕЙСТВИИ ПИРИМИДИНОВЫХ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ И НУКЛЕОЗИДОВ

ХАЧАТРЯН Г. С., ГАЛСТЯН Г. Г., АНТОНЯН А. А., АЛАВЕРДЯН А. А.,
ХАЧАТРЯН В. Г., МИНАСЯНЦ Р. Т., ВАГРАДЯН А. Г., АДАМЯН М. Х.

Филиал ВНИИГНТОКСа, Ереван

Изучено действие внутрицеребрально введенных пириимидиновых циклических нуклеотидов и нуклеозидов на генную экспрессию клеток головного мозга. Установлено значительное увеличение содержания я-РНК AU типа (пре-м-РНК), р-РНК и т-РНК в клетках мозга на 30- и 60-й мин после введения сСМР, сUMP, цитидина и уридина в концентрации 50 и 100 мкг/200 г массы животного соответственно. Эффект сСМР и цитидина оказался более значимым. Точкой приложения пириимидиновых циклических нуклеотидов оказались как нейроны, так и глиоциты. Однако активность синтеза исследуемых нуклеиновых кислот, а следовательно, и содержание различных форм РНК (в пг/клетку) в нейронах значительно выше, чем в глиоцитах. Показана односторонность действия сСМР и цитидина, а также сUMP и уридина на нуклеиновый обмен. Кроме подтверждения важной биологической роли фосфодиэфирной структуры циклических нуклеотидов в генной экспрессии, допускается возможность существования идентичных или близких механизмов в действии сСМР, сUMP и их соответствующих нуклеозидов при связывании ими соответствующих рецепторов или вовлечении в метаболические пути своими пириимидиновыми конфигурациями. Выдвинута идея о возможном образовании пириимидиновых циклических нуклеотидов в живой клетке и существовании циклоцитидилат- и циклоуридилатчувствительной транскрипции.

Изучению механизмов синтеза и формирования различных классов РНК в клетках млекопитающих посвящен ряд работ [1—4], однако регуляторные механизмы биогенеза нуклеиновых кислот остаются недостаточно изученными. Головной мозг высших животных высокодифференцирован, нервные клетки не реплицируются после рождения [5]. Продолжительность жизни мозговой р-РНК колеблется в пределах 6—15 дней, что в два раза больше, чем в других тканях. Скорость синтеза предшественников РНК и их формирование, активность РНК-полимеразы, ядерно-цитоплазматический транспорт рибосом в мозгу значительно ниже, чем в печени [6], но, несмотря на эти особенности, зрелый мозг характеризуется относительной интенсивностью метаболизма РНК и белков [1, 7]. Функциональное состояние ЦНС базируется на рецеп-

торных перестройках и внутриклеточной медиации сигналов информации, в которых участвуют нейрогормоны, нейромедиаторы, пептиды, нуклеозиды, циклические нуклеотиды и другие соединения. За последние годы опубликован ряд работ о биологической роли пуриновых циклических нуклеотидов в генной экспрессии, контроле роста и пролиферации клеток [1, 4, 8, 9], об участии нейромедиаторов в индукции биосинтеза и регуляции уровней cAMP и cGMP посредством специфических циклаз и фосфодиэстераз в различных структурах мозга и других тканей. В клетках животных кроме пуриновых циклических нуклеотидов найден и идентифицирован пиримидиновый циклический нуклеотид 3',5'-cCMP [10], функция которого не выяснена. Не изучен вопрос о наличии в клетках и биологической роли cUMP, cTMP. Недостаточно исследована функция пиримидиновых нуклеозидов в механизме генной экспрессии.

Нами установлено стимулирование биосинтеза различных форм РНК в головном мозгу при внутрицистернальном введении пуриновых циклических нуклеотидов [3, 4]. В частности, показано, что 3',5'-AMP стимулирует, в основном, биосинтез р-РНК и т-РНК, а 3',5'-GMP индуцирует синтез ядерной РНК AU типа (пре-м-РНК). 2',3'-AMP, как правило, выступает в качестве ингибитора биосинтеза всех форм РНК мозга. Характеристика различных форм РНК при действии пуриновых и пиримидиновых циклических нуклеотидов по критериям содержания ДНК, увеличения метки с применением [¹⁴C] UMP в РНК-синтезирующей системе дана в нашей предыдущей публикации [11]. Для выяснения роли пиримидиновых циклических нуклеотидов и нуклеозидов в генной экспрессии клеток головного мозга в данной работе мы изучали содержание различных форм РНК в целом мозгу, нейронах и глиоцитах при действии экзогенно введенных cCMP, cUMP, цитидина и уридина.

Материалы и методы

Исследования проводили на белых крысах-самцах массой 150—200 г. Первая серия экспериментов служила в качестве контроля. Животным других серий опытов внутрицистернально вводили cAMP, cUMP, цитидин и уридин («Sigma», США), соответственно в концентрации 50 и 100 мкг/200 г массы животного. Концентрацию вводимых доз применяемых нами активных веществ определяли экспериментальным путем. Через 30 и 60 мин после введения соответствующих доз нуклеотидов или нуклеозидов животных подвергали замораживанию в жидком азоте. В холодильной комнате при 0° у замороженных крыс извлекали головной мозг, отделяли его от оболочек, крупных сосудов, гипофиза и нижележащих отделов. Коровое вещество большого мозга оставляли в холодильной комнате на 1 ч до повышения температуры до 2° и гомогенизировали в 0,25 М сахарозе в течение 2 мин в гомогенизаторе с тефлоновым пестиком. Гомогенат использовали для выделения я-РНК AU и GC типов, р-РНК и т-РНК. Выделение, очистку и количествен-

ное определение различных форм РНК проводили разработанным нами комбинированным методом фенольной экстракции, дифференциальной ультрацентрифугации и гель-фильтрации без предварительного гидролиза с последующей ультрафиолетовой спектроскопией и идентификацией полученных РНК с чистыми РНК («Sigma», США) [4]. Содержание РНК выражали в мкг/г свежей мозговой ткани.

Ядерная РНК. Изолированные при центрифугировании гомогената при 600 g ядра суспендировали в 10 объемах 0,5 М трис-буфера, рН 7,6, содержащего 0,003 М CaCl_2 , и перемешивали на мешалке в течение 3 мин при 600 g. Полученную суспензию центрифугировали в течение 15 мин при 1000 g. ДНК из осадка удаляли смешиванием с 20 объемами 1 М раствора NaCl . Для разрушения образующегося геля смесь интенсивно встряхивали и экстрагировали в течение 16 ч при 2°. Полученный вязкий раствор центрифугировали 15 мин при 40000 g на центрифуге «Spinco L-2-65K», осадок суспендировали в 10 объемах 0,05 М фосфатного буфера (рН 6,85), добавляли равный объем 90%-ного фенола, смесь встряхивали в течение 60 мин при комнатной температуре и центрифугировали 30 мин при 1000 g и 2°. В результате образовывалось четыре слоя: водный (РНК+полисахариды), промежуточный (нерастворимые белки), фенольный и осадок (белки+ДНК). В верхнем водном слое находилась я-РНК GC типа. Этот слой отсасывали, а фенольный и промежуточный промывали равным объемом 0,05 М фосфатного буфера, рН 6,85 и центрифугировали 20 мин при 2000 g. Надосадочную жидкость собирали, объединяли с водным слоем и доводили до конечной 2%-ной концентрации.

Получение я-РНК GC типа. я-РНК GC типа осаждали 2 объемами холодного 96° этанола. Осадок отделяли центрифугированием в течение 20 мин при 2000 g и 2°, растворяли в дистиллированной воде и я-РНК GC типа осаждали в водной фазе 2 объемами холодного 96%-ного этанола. После центрифугирования (2000 g, 20 мин, 2°) осадок растворяли в 20 мл дистиллированной воды и наносили на колонку с сефадексом G-200. Для выделения всех форм РНК использовали колонку размерами 18×180 мм с холодильной рубашкой, которую уравнивали трис- HCl буфером, рН 7,02. После нанесения соответствующего раствора РНК проводили элюцию тем же 0,05 М трис- HCl буфером, рН 7,02, со скоростью 30—35 мл/ч и собирали элюаты по 3,5 мл.

Получение я-РНК AU типа. Объединенные (фенольная и промежуточная) фазы обрабатывали 5 объемами смеси этанол-эфир (4:1) и центрифугировали в течение 15 мин при 2000 g и 2°. После повторного центрифугирования к осадку добавляли 10 объемов дистиллированной воды и встряхивали на мешалке в течение 60 мин при комнатной температуре. Полученный экстракт центрифугировали 30 мин и к надосадочной жидкости приливали равный объем 90%-ного фенола и вновь встряхивали в течение 60 мин. После 30-минутного центрифугирования получали четыре слоя. Верхний водный слой, в котором находилась я-РНК AU типа, отсасывали и к нему добавляли калий-ацетат до конечной

2%-ной концентрации. γ -РНК АУ типа осаждали добавлением 2 объемов холодного 96%-ного этанола. Центрифугировали в течение 20 мин при 1000 г и 2°. Осадок растворяли в дистиллированной воде и наносили на колонку с сефадексом G-200.

Рибосомная РНК. Надосадочную жидкость, содержащую микросомы, центрифугировали на ультрацентрифуге «Spinco L-2-65 K» (ротор 65 т) в течение 60 мин при 2° и 105000 g. Осадок, содержащий микросомы и рибосомы, суспендировали в 3 мл 0,25 М сахарозы и центрифугировали на той же центрифуге в течение 60 мин при 105000 g и 2°. Надосадочную жидкость и промывные воды, содержащие т-РНК, использовали для определения количества т-РНК, а осадок, содержащий микросомы и рибосомы, суспендировали в среде «А», содержащей 17,1 г сахарозы, 25 мл 0,2 М трис, 3,5 мл HCl, конечный pH 7,6; 5 мл 1 М HCl и 10 мл 0,1 М MgCl₂. Перед применением в среду «А» добавляли 33 мл 3%-ного ДОХ-На и объем смеси доводили дистиллированной водой до 100 мл. Полученную суспензию центрифугировали в течение 45 мин при 2° и 105000 g. К осадку добавляли среду «В» для промывания рибосом следующего состава: 11,7 г сахарозы, 25 мл 0,2 М трис, 3,5 мл 1 М HCl, 0,125 мл 1 М KCl, 0,4 мл 0,1 М MgCl₂; объем воды доводили до 100 мл. Для депротенинизации полученного осадка применяли смесь фенол-версен (90%-ный фенол и 10⁻² М версен) в соотношении 1:1 из расчета 380 мл фенол-версена/4,0 г сырой мозговой ткани. К осадку (рибосомы) добавляли 10 мл смеси фенол-версен и суспендировали в течение 60 с в гомогенизаторе. Всю смесь переносили в колбу Эрленмейера, куда добавляли 1 М бензоат натрия (pH 8,0) до конечной концентрации 0,2 М. Полученную суспензию встряхивали на магнитной мешалке в течение 30 мин при 20°, добавляли хлороформ в соотношении 100:5 и снова встряхивали в течение 30 мин при 20°. Добавление хлороформа способствовало лучшему отделению белков. Полученную суспензию центрифугировали при 2000 g в течение 10 мин при 2°. В результате образовывалось три слоя. В верхнем водном слое находились ρ -РНК и полисахариды. Большая часть белков растворялась в фенольном слое, часть белков оставалась на границе водной и фенольной фаз (промежуточный слой). Осторожно, не смешивая слои, верхний слой переносили в колбу Эрленмейера и к нему добавляли 90%-ный фенол в соотношении 1:1. Снова встряхивали в течение 20 мин при 20° на мешалке. К суспензии добавляли хлороформ в соотношении 100:5 и встряхивали в течение 20 мин при 20°. Центрифугировали при 2000 g в течение 10 мин при 2°. Последнюю процедуру повторяли трижды. ρ -РНК осаждали добавлением к верхнему водному слою 3 объемов 96%-ного этанола при -6°, 20%-ного уксуснокислого калия (в соотношении 1:10) и 10%-ного NaCl в тех же пропорциях и оставляли на холоде при -2°, несколько раз помешивая стеклянной палочкой. Затем центрифугировали при 2000 g и 2° в течение 15 мин. Осадок, содержащий ρ -РНК, растворяли в 40 мл дистиллированной воды. 10 мл этого раствора наносили на колонку с сефадексом G-200.

Транспортная РНК. Надосадочная фракция при 105000 g содержала исключительно т-РНК и ее депротенинизация позволяла получить очищенную РНК. К надосадочной фракции добавляли равный объем 90%-ного фенола, встряхивали в течение 60 мин при комнатной температуре, затем центрифугировали при 2500 g в течение 25 мин. В результате образовывалось три слоя. Осторожно, не смешивая слои, верхний водный слой, в котором находилась растворенная т-РНК, отсасывали и к нему добавляли 90%-ный фенол в соотношении 1:1. Вновь встряхивали на мешалке 20 мин, добавляли хлороформ из расчета 5 мл на каждые 100 мл суспензии и встряхивание продолжали еще в течение 20 мин. После центрифугирования при 2500 g в течение 20 мин при 2° верхний слой отсасывали, к нему добавляли 1/10 объема 20%-ного уксуснокислого калия и т-РНК осаждали 2,5 объема холодного 96° этанола. Осадок отделяли центрифугированием, растворяли в 10 мл дистиллированной воды и наносили на колонку с сефадексом G-200.

Выделение нейронов и глиоцитов. Обогащенные фракции нейронов и глии выделяли по методу Blomstrand, Hamberger [12] и Henn [13]. Все процедуры выполняли в холодных условиях. Измельченную ткань коры головного мозга суспендировали в 15 мл среды, содержащей 7,5% поливинилпирролидона, 1%-ного бычьего сывороточного альбумина (БСА), 10 mM CaCl_2 , и разрушали протягиванием через тефлоновый шприц (объем 10 мл), конец которого был закрыт нейлоновым ситом (размер пор 1000 мкм). Разрушенную мозговую ткань суспендировали в 35—40 мл среды, содержащей 0,3 M сахарозу, 10 mM трис-HCl буфер, pH 7,4, 1 mM ЭДТА, 2%-ный фиколл и 1%-ный БСА. Суспензию клеток последовательно без давления пропускали через нейлоновые сита с уменьшающимися размерами пор (1000, 110, 75, 50 мкм и двойной слой 50 мкм нейлонового сита). Конечную взвесь центрифугировали при 150 g в течение 5 мин и осадок суспендировали в 30%-ном растворе фиколла (конечная концентрация 20%). В 35 мл пробирках последовательно насливали 5 мл 40%-ной сахарозы, 5 мл 30%-ного фиколла, 15 мл клеточной суспензии, 5 мл 15%-ного фиколла и, наконец, 5 мл 10%-ного фиколла, изготовленные в 1%-ном растворе БСА. Клетки разделяли центрифугированием при 54000 g 120 мин в роторе SW 28 на центрифуге «Beckman L-2-65 K». Нейроны и глиоциты собирали пастеровской пипеткой и промывали 0,32 M сахарозой, содержащей 10 mM трис-HCl буфер, pH 7,4 и 1 mM CaCl_2 .

Чистоту изолированных клеточных фракций определяли фазоконтрастной микроскопией при увеличении в 400—1000 раз. Исследовали также препараты, окрашенные 0,1%-ным раствором метиленовой сини. Морфологическую целостность клеток определяли электронномикроскопическим исследованием.

Количество клеток в единице объема измеряли путем подсчета окрашенных ядер в камере Горяева. Число ядер определяли в нескольких последовательных разведениях и выводили среднюю величину.

Результаты и обсуждение

Как показывают данные табл. 1, действие пиримидиновых циклических нуклеотидов приводит к значительным сдвигам в содержании исследуемых форм РНК в мозгу как на 30-й, так и на 60-й дни после их введения. Оба циклических нуклеотида (сСМР и сУМР) вызывают достоверное повышение содержания р-РНК, т-РНК и я-РНК АУ типа в мозгу во все сроки исследования. При этом сСМР выступает в качестве мощного стимулятора активности генетического аппарата нервных клеток и вызывает значительное повышение содержания всех изученных форм РНК. Особо следует отметить факт стимуляции биосинтеза я-РНК АУ типа и р-РНК под действием сСМР. Содержание этих форм РНК на 30- и 60-й дни исследования по сравнению с контролем повышается соответственно на 40 и 57% и 37 и 45%. Значительное повышение содержания т-РНК отмечается и при действии сУМР, которое составляет 35 и 46% по сравнению с контролем соответственно в указанные сроки исследования. При этом достоверно повышается и содержание р-РНК и я-РНК АУ типа.

В отличие от сСМР сУМР понижает содержание я-РНК GC типа на 30-й дни исследования и достоверно повышает ее содержание на 60-й дни эксперимента. Известно, что я-РНК GC типа является предшественником р-РНК. В наших экспериментах уровень р-РНК исключительно высок при действии сСМР и сУМР (1772.70 ± 14.97 и 1611.34 ± 14.27 мкг/г соответственно), а уровень я-РНК GC типа при этом значительно ниже.

Данное явление, по-видимому, объясняется тем, что исследуемые циклические нуклеотиды, кроме стимуляции биосинтеза указанной РНК, которая в дальнейшем определяется в составе р-РНК, способствуют ее транспорту из ядра в цитоплазму и уменьшению ее ядерного пула.

Агисавс и соавт. [14] изучали эффект сСМР в переднем гипофизе в опытах *in vitro*. Было показано, что гипофизарное содержание сСМР по сравнению с другими органами значительно меньше, при стимуляции препаратом LH-RF оно не меняется, тогда как сАМР увеличивается. Это дало основание полагать, что сСМР метаболически инертен и менее активен. В противовес этому Hellman, Kuio [15] обнаружили способность гомогенной сСМР-фосфодиэстеразы из печени свиньи катализировать гидролиз как пиримидиновых, так и пуриновых циклических 2',3'- и 3', 5'-нуклеотидов. При этом выявлен следующий ряд скорости гидролиза 2',3'-нуклеотидов: сСМР (100), сУМР (46), сГМР (28), сАМР (2) и циклических 3', 5'-нуклеотидов—сАМР (25), сГМР (19) соответственно. Все циклические 2',3'-нуклеотиды оказались конкурентными ингибиторами гидролиза 3',5'-СМР. Авторы допускают, что в гидролизе пиримидиновых и пуриновых циклических 2',3'- и 3',5'-нуклеотидов принимает участие единый центр каталитического участка сСМР-фосфодиэстеразы и данный фермент является первой и уникальной мультифункциональной фосфодиэстеразой, способной гидролизовать различные и несходные по своей структуре циклические нуклеотиды.

Полученные нами данные относительно стимуляции биосинтеза различных форм РНК в нервной ткани под действием сСМР и сУМР могли быть интерпретированы как результат непосредственного действия этих внутриклеточных медиаторов, способных индуцировать генетический аппарат посредством их вовлечения в соответствующие рецепторы своей фосфодиэфирной конфигурацией, или их коферментной активностью в процессе фосфорилирования соответствующих РНК-полимераз [4]. Кроме того, существует возможность их участия в биосинтезе цитидиловых и уридилловых полифосфатов с последующим их вовлечением в биосинтез РНК. При этом не исключается и роль пиримидинового участка структуры испытанных циклических нуклеотидов в индукции генетического аппарата. Для решения последнего вопроса в другой серии опытов мы изучали непосредственное действие пиримидиновых нуклеозидов—цитидина и уридина на процессы генной экспрессии нервных клеток.

Из приведенных данных (табл. 2) видно, что внутрицистернально введенные цитидин и уридин, в основном, оказывают аналогичное с пиримидиновыми циклическими нуклеотидами действие на обмен нуклеиновых кислот. Содержание р-РНК, т-РНК и я-РНК АУ типа значительно повышается во все сроки исследования. Сдвиги в содержании этих нуклеиновых кислот при действии цитидина оказались более выраженными. Изменение в содержании различных классов РНК при действии уридина, за исключением я-РНК GC типа, оказалось также значимым. В отличие от сСМР и сУМР их соответствующие нуклеозиды вызвали понижение содержания я-РНК GC типа. Данное понижение оказалось более выраженным при действии уридина. Подобный эффект в отношении я-РНК GC типа наблюдался и при действии сУМР на 30-ой мин исследования.

Анализ полученных односторонних сдвигов в нуклеиновом обмене при действии сСМР и цитидина, с одной стороны, сУМР и уридина—с другой, указывает на возможность существования идентичных механизмов действия пиримидиновых циклических нуклеотидов и соответствующих нуклеозидов на генную экспрессию. По-видимому, как циклические нуклеотиды, так и нуклеозиды занимают одни и те же рецепторы своими пиримидиновыми компонентами. Кроме того, не исключена возможность действия этих нуклеозидов в качестве нейротрансмиттеров в индукции биосинтеза сСМР и сУМР и проявления их эффекта на нуклеиновый обмен посредством увеличения их концентрации в нервной ткани.

В пользу нашего предположения о возможном участии цитидина и сСМР в индукции биосинтеза нуклеиновых кислот свидетельствуют некоторые данные литературы по ингибиторному анализу. Показано, что арабинозилцитозин ингибирует полуконсервативный синтез ДНК [16, 17], возможно, включаясь в цепь ДНК и оказывая ингибирующее влияние на процессы терминации, либо на конформационные изменения спиральной структуры ДНК [17].

Таблица 1
Содержание различных классов РНК в мозгу при действии пиримидиновых
гиданеских нуклеотидов в мкг/г ткани

Класс РНК	Контроль	сСМР		сУМР	
		30 мин	60 мин	30 мин	60 мин
p-РНК	1232, 10 ± 12, 80	1668, 6 ± 26, 1*	1772, 70 ± 14, 97*	1560, 30 ± 20, 80*	1611, 34 ± 14, 27*
r-РНК	281, 60 ± 5, 79	351, 38 ± 4, 60*	382, 56 ± 6, 32*	380, 28 ± 6, 9*	415, 84 ± 6, 21*
s-РНК GC типа	53, 69 ± 2, 51	60, 32 ± 2, 76	81, 06 ± 4, 02	41, 38 ± 2, 20*	76, 90 ± 3, 40*
s-РНК AU типа	272, 96 ± 8, 40	350, 28 ± 6, 54*	425, 26 ± 7, 42*	290, 44 ± 5, 38	320, 16 ± 5, 26
Общая РНК	1843, 35	2450, 48	2664, 58	2337, 40	2424, 24

Примечание: * $p < 0,001$.

Таблица 2
Содержание различных классов РНК в мозгу при действии трипимидиновых
нуклеотидов в мкг/г ткани

Класс РНК	Контроль	Цитидин		Уридин	
		30 мин	60 мин	30 мин	60 мин
p-РНК	1262, 33 ± 9, 75	1618, 28 ± 13, 91*	1690, 04 ± 26, 73*	1473, 08 ± 13, 09**	1521, 78 ± 13, 54*
r-РНК	294, 92 ± 8, 29	426, 18 ± 9, 97*	462, 78 ± 6, 41*	346, 04 ± 4, 51**	437, 64 ± 5, 29*
s-РНК GC типа	73, 10 ± 3, 89	61, 38 ± 3, 81**	58, 42 ± 2, 77*	38, 52 ± 1, 98*	42, 90 ± 2, 07*
s-РНК AU типа	295, 66 ± 7, 57	551, 36 ± 8, 03*	582, 50 ± 7, 64*	425, 8 ± 6, 0*	454, 54 ± 7, 98*
Общая РНК	1926, 01	2660, 20	2793, 74	2283, 40	2466, 86

Примечание: * $p < 0,001$, ** $p < 0,01$

Введенный в организм цитидин, кроме стимуляции активности генетического аппарата в качестве биологически активного вещества, может подвергаться фосфорилированию и переходу в дезоксицитидинфосфат. Показано, что после внутривентрикулярного введения $[^3\text{H}]$ цитидина $[^3\text{H}]$ дезоксицитидин быстро исчезает из СМЖ и частично из мозга, где около 65% $[^3\text{H}]$ дезоксицитидина переходит в $[^3\text{H}]$ дезоксицитидинфосфат [18]. Дезоксицитидиннуклеотиды образуются из цитидина рибонуклеотидредуктазой или транспортируется из крови в ЦСЖ и мозг специальной глубокой транспортной системой через спинальное сплетение [19]. После гомогенизации и субклеточного фракционирования мозговых срезов и инкубации с $[^3\text{H}]$ дезоксицитидином в течение 30 мин увеличивается процентное соотношение $[^3\text{H}]$ дезоксицитидинфосфатов и $[^3\text{H}]$ ДНК, которые присутствуют в ядерной и митохондриальной фракциях всех отделов мозга.

На основании приведенных литературных и полученных нами данных по значительной индукции биосинтеза различных классов РНК, в особенности я-РНК AU типа и р-РНК, можно сделать вывод о возможности непосредственного участия цитидина и cCMP в процессах синтеза ДНК, в активации цитидинкиназы, ДНК-полимеразы, в механизмах терминации и конформационных изменений ДНК в процессе транскрипции и синтеза различных классов РНК в нервной ткани.

Изучение метаболизма уридина в сетчатке золотистых рыб при повреждении оптического нерва выявило увеличение захвата уридина и аденозина сетчаткой, мечення р-РНК и содержания РНК [20]. Повышение накопления радиоактивности и увеличение захвата уридина из экстрацеллюлярной среды или усиление метаболической ловушки можно было бы объяснить внутриклеточным фосфорилированием уридина. С помощью 5'-дезоксаденозина показано, что нуклеозиды внутри клетки не фосфорилируются [21] и их поглощение одинаково для нормальной и поврежденной сетчатки. Биохимическая характеристика механизмов индукции биосинтеза РНК по результатам усиления метаболизма уридина в сетчатке при повреждении зрительного нерва могла бы иметь прямое отношение к природе инициации процессов нервной регенерации.

Для изучения процессов индукции генетического аппарата представляет определенный интерес также состояние активности тимидинкиназы в качестве маркера клеточной пролиферации и определяемой тотальной активности ферментов, обеспечивающих внедрение тимидина в ДНК [22]. Ашапкин и соавт. [23] показали усиление внедрения $[^3\text{H}]$ тимидина в ДНК коры мозга крыс при активном условном рефлекс избегания по сравнению с активным контролем.

В свете полученных по нуклеиновому обмену данных при действии пиримидиновых циклических нуклеотидов и нуклеозидов представляло особый интерес изучение содержания различных форм РНК в нейронах и глиоцитах. Для сохранения функции генома необходимы репаративные процессы, которые могли бы обеспечить функциональную целостность ДНК нейронов и направлены на синтез необходимых форм

Содержание различных классов РНК в нейронах и ганглиях головного мозга
(в мкг/г и нг/капсула) при действии пиримидиновых циклических нуклеотидов

Класс РНК	Вид РНК	Контроль		сСМР		сУМР	
		мкг/г	нг/капсула	мкг/г	нг/капсула	мкг/г	нг/капсула
р-РНК	нейрон	$548,50 \pm 5,93$	$34,90 \pm 0,26$	$680,50 \pm 1,42^*$	$43,66 \pm 0,02^*$	$622,80 \pm 2,16^*$	$39,60 \pm 0,02^*$
	глия	$654,25 \pm 8,85$	$11,30 \pm 0,20$	$764,13 \pm 1,65$	$13,26 \pm 0,02$	$735,25 \pm 3,28$	$12,70 \pm 0,02$
т-РНК	нейрон	$108,13 \pm 1,74$	$6,05 \pm 0,07$	$196,80 \pm 3,23^*$	$11,01 \pm 0,03^*$	$136,02 \pm 1,08$	$7,70 \pm 0,002^*$
	глия	$132,28 \pm 2,06$	$3,02 \pm 0,02$	$125,25 \pm 2,47$	$2,85 \pm 0,02$	$123,0 \pm 1,89$	$2,81 \pm 0,02$
р-РНК ГС типа	нейрон	$30,22 \pm 0,79$	$2,40 \pm 0,014$	$31,33 \pm 0,35$	$2,47 \pm 0,013$	$28,17 \pm 0,14$	$2,23 \pm 0,01$
	глия	$23,52 \pm 0,56$	$0,80 \pm 0,01$	$38,28 \pm 0,09^*$	$1,72 \pm 0,01^*$	$37,26 \pm 0,21$	$1,26 \pm 0,01$
р-РНК АУ типа	нейрон	$102,12 \pm 2,91$	$6,02 \pm 0,16$	$256,34 \pm 3,94^*$	$15,11 \pm 0,05^*$	$222,96 \pm 0,70$	$11,45 \pm 0,20^*$
	глия	$135,73 \pm 3,98$	$2,88 \pm 0,06$	$273,67 \pm 4,20^*$	$5,88 \pm 0,03^*$	$313,20 \pm 7,13^*$	$6,64 \pm 0,12^*$
Общая РНК	нейрон	$789,97$	$49,37$	$1164,97$	$72,25$	$1019,93$	$60,68$
	глия	$945,78$	$18,00$	$1201,33$	$23,71$	$1208,71$	$23,41$
Сумма всех форм РНК		$1734,75$	$67,37$	$2366,30$	$95,96$	$2228,64$	$84,09$

//примечание: * достоверно по отношению к контролю.

РНК, нейроспецифических белков, ферментов и других веществ, хотя нейроны в мозгу зрелых животных незаменимы и неспособны к редупликации ядерной ДНК, связанной с митозом и образованием новых клеток. В экспериментах с внутриистернальным введением сСМР и сUMP была выявлена интересная закономерность в распределении и количественных сдвигах различных форм РНК в нейронах и глиоцитах.

Как показывают данные табл. 3, содержание всех форм РНК в контрольных опытах в расчете на 1 г мозговой ткани в глиоцитах больше, чем в нейронах. При этом содержание р-РНК, т-РНК, я-РНК, АУ типа в глиоцитах составляет $654,25 \pm 8,85$; $132,28 \pm 2,06$; $135,73 \pm 3,98$ мкг/г против $548,50 \pm 5,93$; $108,13 \pm 1,74$; $102,12 \pm 2,91$ мкг/г соответственно в нейронах. Однако при расчете содержания исследуемых форм РНК на 1 клетку обнаруживается противоположная картина в количественной характеристике изученных форм РНК. В расчете на 1 клетку содержание р-РНК, т-РНК и я-РНК GC и АУ типов оказалось в 2—3 раза больше в нейронах, чем в глиоцитах. Оно в нейронах соответственно составляет $34,90 \pm 0,26$; $6,05 \pm 0,07$, $2,40 \pm 0,014$; $6,02 \pm 0,16$ пг/г клетка против $11,30 \pm 0,20$; $3,02 \pm 0,02$; $0,80 \pm 0,01$ и $2,88 \pm 0,06$ пг/клетка в глии. Таким образом, в норме содержание различных форм РНК в нейронах значительно больше, чем в глиоцитах, что, по-видимому, связано со специфической функцией генетического аппарата нейронов.

После установления контрольного фона содержания исследуемых форм РНК в нейронах и глиоцитах было испытано действие сСМР и сUMP, при этом выявлена однонаправленность в их действии на нуклеиновый обмен как в целом мозгу, так и в нейронах и глиоцитах с характерными особенностями. Как и в контрольных опытах, при действии сСМР и сUMP содержание различных форм РНК в расчете на мкг/г ткани в глиоцитах было больше, чем в нейронах, однако при пересчете на 1 клетку содержание всех форм РНК в нейронах по сравнению с контролем увеличилось почти в два раза. Хотя точкой приложения циклических нуклеотидов оказались как нейроны, так и глиоциты, была выявлена значительная разница в индукции биосинтеза РНК в указанных клеточных структурах. Активность синтеза нуклеиновых кислот в нейронах оказалась значительно интенсивней. Из данных табл. 3 видно, что содержание р-РНК, т-РНК, я-РНК АУ типа в нейронах при действии сСМР соответственно составляют $43,66 \pm 0,002$; $11,01 \pm 0,03$ и $15,11 \pm 0,05$ пг/клетка, а в глии $13,26 \pm 0,02$; $2,85 \pm 0,02$ и $5,88 \pm 0,03$ пг/клетка. Аналогичная закономерность отмечается и при действии сUMP. При этом содержание р-РНК, т-РНК и я-РНК АУ типа в нейронах составляет $39,60 \pm 0,02$; $7,700 \pm 0,002$; $11,45 \pm 0,20$, а в глиоцитах $12,70 \pm 0,02$ и $6,64 \pm 0,02$ пг. Хотя повышение содержания различных форм РНК в нейронах при действии сUMP также было достоверным, уровни исследуемых РНК колебались на сравнительно низких цифрах, чем при действии сСМР. Содержание т-РНК почти не изменялось или даже несколько понижалось в глиоцитах при действии

cCMP и cUMP. В отношении содержания я-РНК GC типа в нейронах и глиоцитах была выявлена противоположная картина. В нейронах почти не отмечалось повышения его содержания, в то время как в глиоцитах оно имело место.

Таким образом, экзогенно введенные cCMP и cUMP оказались мощными стимуляторами биосинтеза р-РНК, т-РНК, я-РНК AU типа. Причем эффект применяемых циклических нуклеотидов в нейронах значительно больше, чем в глиоцитах. Интенсивность обмена РНК в нейронах ядер шва мозга крыс по сравнению с глиоцитами в условиях лишения сна показана и другими авторами [24].

На основании полученных нами и литературных данных можно заключить, что не исключается возможность образования в живой клетке пиримидиновых циклических нуклеотидов; подтверждается их важная роль в генной экспрессии и других биохимических механизмах при экзогенном их введении. Какова интенсивность образования cCMP, cUMP и, возможно, cTMP посредством своих специфических циклаз, если таковые имеются, метаболизируются ли они через соответствующие фосфодиэстеразы, каким изменениям подвергаются их уровни в нервной клетке при стимуляции различных рецепторов и выделении соответствующих нейротрансмитторов?—изучение этих вопросов, являющихся важнейшими аспектами современной молекулярной биологии и функциональной нейрохимии, станет задачей специального рассмотрения.

THE EFFECT OF PYRIMIDINE-CONTAINING CYCLIC NUCLEOTIDES ON THE CONTENT OF VARIOUS TYPES OF BRAIN RNA

KNACHATRIAN G. S., GALSTIAN H. G., ANTONIAN A. A., ALAVERDIAN A. A.,
KNACHATRIAN V. G., MINASIAN R. T., VAHRADIAN H. G.,
ADAMIAN M. K.

An affiliate of VNIIGINTOX, Yerevan

The effect of intracisternally injected pyrimidine-containing cyclic nucleotides and nucleosides on the gene expression in brain cells has been studied. A significant increase in the content of mRNA AU type (pre-mRNA), r-RNA and t-RNA in brain cells 30 and 60 min after injection of cGMP, cUMP, cytidine and uridine in concn. of 50 and 100 mcg/200 g b. w. respectively has been established. The effect of cCMP and cytidine was more significant. Pyrimidine-containing cyclic nucleotides injected affect both neurons and glial cells. However, the activity of nucleic acids synthesis and therefore the content of various forms of RNA (pg/cell) in neurons was greater than in glial cells. The effect of cCMP and cytidine, on one hand and of cUMP and uridine on the other hand on nucleic acid metabolism has been established. Besides the confirmation of a significant biological role of

phosphodiether structure of cyclic nucleotides in gene expression, a possibility of the existence of identical or similar mechanisms of action of cCMP, cUMP and corresponding nucleosides in the occupation of the corresponding receptors or involvement in the metabolic pathways with their pyrimidine moieties is supposed.

An idea about a possible biogenesis of pyrimidine-containing cyclic nucleotides in the living cell and existence of cyclocytidilate and cyclouridilate-sensitive transcription is put forward.

ЛИТЕРАТУРА

1. Perry R. P. *Annu. Rev.*, v. 45, p. 605—630, 1976.
2. Hadjalov A. A.—In *subcell. Biochem.* (ed. O. B. Roodyn), v. 7, p. 1—80, N. Y., Plenum Press, 1980.
3. Хачатрян Г. С.—В кн.: Циклические нуклеотиды, с. 73—78, М., Наука, 1979.
4. Хачатрян Г. С. Биохимия нуклеиновых кислот и высшие функции головного мозга, Ереван, Айастан, 1981.
5. Davison A. N., Dobbing J. *Appl. Neurochem.* (Eds. A. N. Davison, J. Dobbing), p. 253—286, Oxford, Blackwell Scientific publ. 1968.
6. Stoykova A. S., Dudov K. P., Dabeva M. D., Hadjalov A. A. *J. Neurochem.*, v. 41, № 4, p. 942—949, 1983.
7. Lajtha A., Dunlop D. *Life Sci.*, v. 29, p. 755—767, 1981.
8. Pastan I. H., Johnson G. S., Anderson W. B. *Annu. Rev. Biochem.*, v. 44, p. 491—522, 1975.
9. Goldberg N. D., Haddox M. F. *Annu. Rev. Biochem.*, v. 46, p. 832—896, 1977.
10. Bloch A. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, v. 58, p. 652—659, 1974.
11. Галстян Г. Г., Захарян Р. А., Хачатрян Г. С. *Нейрохимия*, т. 5, с. 413—415, 1986.
12. Blomstrand C., Hamberger A. *J. Neurochem.*, v. 16, p. 1401—1407, 1969.
13. Henn F. A. *Adv. in cell Neurobiol.*, v. 1, p. 379—403, 1981.
14. Arisawa M., Makino T., Lin H., Ohno T., Lizuka R. *Endocrinol. Jpn.*, v. 29, № 2, p. 241—244, 1982.
15. Helfman D. M., Kuo J. F. *J. Biol. Chem.*, v. 257, № 2, p. 1044—1047, 1982.
16. Cohen S. S.—In: *Progr. Nucleic acid Research and Molecular Biology* (eds. J. M. Davidson, W. E. Dohn), v. 5, p. 1—88, New-York, Acad. Press, 1966.
17. Hunter T., Francke B. *J. Virol.*, v. 15, p. 759—755, 1975.
18. Spector R., Huntoon S. *J. Neurochem.*, v. 40, № 5, p. 1481—1486, 1983.
19. Spector R., Huntoon S. *J. Neurochem.*, v. 41, p. 1131—1136, 1983.
20. Burell H. R., Dokas L., Agranoff B. W. *J. Neurochem.*, v. 31, p. 289—298, 1978.
21. Kessel D. *J. Biol. Chem.*, v. 253, p. 400—403, 1978.
22. Ellims P. H., Gan T. E., Cosgrove L. *Mol. and Cell. Biochem.*, v. 45, p. 113—116, 1982.
23. Ашапкин В. В., Романов Г. А., Тушмалова Н. А., Ванюшин Б. Ф., *Биохимия*, т. 48, вып. 3, с. 355—362, 1983.
24. Маликов У. М., Панов А. Н. *Физиол. журн. СССР*, т. 67, № 10, с. 1506—1510, 1981.

Поступила 13. II. 1987



УДК 577.154+577.150.5+578.085.23

ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ
НЕКОТОРЫХ ГЛИКОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ
ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЭСТРАДИОЛА В
КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК НЕЙРОБЛАСТОМЫ

НАЗАРЯН К. Б., ГЕВОРКЯН Э. С., КАГРАМАНЯН М. С.,
ЕРОЯН А. Г., МАНУКЯН К. А., КАЗАРЯН Б. А.

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР,
Ереванский государственный университет

Изучено действие эстрадиола 17β на активность ряда гликолитических ферментов в культуре клеток мышинной нейробластомы С1300. Установлено активирующее влияние эстрадиола на гексокиназу, фосфофруктокиназу и пируваткиназу (при отсутствии влияния на активность енолазы и D-фосфоглицеромутазы). В клеточных культурах фибробластов мыши и лимфоцитов человека активация этих ферментов была выражена значительно слабее. Определенной корреляции между процентом делящихся клеток в указанных культурах и повышением активности выявлено не было. Активирующий эффект эстрадиола на ферменты в клетках нейробластомы, видимо, отражает особенности регуляции гликолиза в нейронах, так как сходную картину воздействия эстрадиола наблюдали в нервной ткани *in vivo*.

Изучение действия физиологически активных соединений на функции головного мозга затруднено ввиду его морфо-функциональной гетерогенности и разнонаправленности динамики ряда протекающих в нем процессов. В связи с этим становится актуальным использование для нейрохимических исследований клонированных культур различных опухолей мозга нейронального и глияльного происхождения. Как объект исследования они обладают рядом преимуществ: гомогенность морфологического состава, стабильность, сохранение ряда свойств, присущих нормальной ткани [1]. Поэтому для изучения воздействия стероидных гормонов, в частности эстрадиола, на нейроны в качестве модели избрали культуру клеток мышинной нейробластомы перевиваемой линии С1300, которая сохраняет целый ряд специфических свойств нейронов: типичная морфология клеток (аксоны, содержащие нейрофилamenty), генерация потенциалов действия, синтез ферментов метаболизма медиаторов, наличие нейроспецифической енолазы и др. [2]. С другой стороны, необходимо учитывать определенную специфику поведения клеток в условиях культивирования *in vitro*. В связи с этим в качестве

контроля нами были использованы две другие клеточные культуры: мышинных фибробластов (L-929) и суспензионная, в норме неделящаяся, культура лимфоцитов периферической крови человека. При культивировании указанных клеток была изучена активность ряда гликолитических ферментов: гексокиназы (КФ 2.7.1.2), фосфофруктокиназы (КФ 2.7.1.11), пируваткиназы (КФ 2.7.1.40), енолазы (КФ 4.2.1.11), D-дифосфоглицератзависимой D-фосфоглицеромутазы (КФ 5.4.2.1.).

Целью настоящей работы было выявление особенностей регуляторного влияния эстрадиола на гликолиз в клетках нейробластомы по сравнению с культурами других клеток, что может способствовать пониманию специфики энергетического метаболизма в нейронах, поскольку гексокиназа, енолаза и пируваткиназа в головном мозгу представлены, в основном, органоспецифическими формами, целесообразность экспрессии которых остается невыясненной [3].

Материалы и методы

Условия культивирования клеток. В экспериментах были использованы следующие клеточные линии: клетки мышинной нейробластомы C1300, клон N2a, клетки фибробластов мышцы линии L-929, клетки культуры лимфоцитов периферической крови человека. Клетки нейробластомы и фибробластов мышцы культивировали в модифицированной среде Игла с добавлением 10%-ной сыворотки крови крупного рогатого скота. До эксперимента клетки поддерживались в логарифмической фазе роста несколько генераций, а затем высевались в количестве 3×10^5 клеток на флакон. Выращивали клетки во флаконах Карреля при 37°. Длительность культивирования для клеток нейробластомы составляла 40, а для фибробластов—24 ч. Клетки дезагрегировали 0.25%-ным раствором трипсина. Культуру лимфоцитов получали из цельной периферической крови человека, которую гепаринизировали из расчета 25 МЕ гепарина на 1 мл крови. Выделение из крови очищенной популяции лимфоцитов проводили в асептических условиях в градиенте плотности (1.077) фиколл-верографина. Кровь, смешанную с равным объемом раствора Хенкса наслаивали на градиент в соотношении 3:1. Центрифугировали в течение 35 мин при 400 g при комнатной температуре. Выделенную и отмытую фракцию лимфоцитов переводили в культуру, содержащую сыворотку крови крупного рогатого скота и модифицированную среду Игла в соотношении 1:3:12. Для стимуляции лимфоцитов к делению в культуру добавляли фитогемогглютинин (ФГА) (IBF, Франция) из расчета 0.2 мл ФГА на 10 мл культуральной смеси. Культивирование проводили в течение 70 ч при 37°.

Обработка эстрадиолом. Эстрадиол 17 β («Sigmia», США) расторгали в 95%-ном этаноле и добавляли в культуру *ex tempore* за 3,5 ч до конца культивирования в конечной концентрации 25, 50, 100 мкг/мл. Контролем служила необработанная, а также обработанная этанолом культура. Дезагрегированные клетки собирали и дважды отмывали холодным раствором ЭДТА. Суспензию клеток обрабатывали в ультра-

звуковым дезинтеграторе в трис-HCl буфере (рН 7.5) при 0° в течение 30 с.

Митотическая активность. Для определения уровня митотической активности используемых культур, а также выяснения возможного ее изменения под действием эстрадиола были получены препараты метафазных хромосом. После инкубации с эстрадиолом во флаконы с клетками нейробластомы добавляли свежую среду с добавлением колхицина (0,25 мкг/мл) за 2 ч до фиксации. Гипотоническую обработку проводили 0,55%-ным раствором KCl при 37° в течение 7 мин. Клетки фиксировали свежеприготовленной охлажденной смесью метанол-ледяная уксусная кислота (3:1). Суспензию клеток наносили на охлажденные предметы стекла и окрашивали азур-эозином в течение 5 мин. Подсчитывали количество митозов на 1000 клеток.

Определение белка и ферментативной активности. Содержание белка в пробах определяли по методу Lowry и соавт. [4]. Активность гексокиназы, фосфофруктокиназы и пируваткиназы определяли спектрофотометрически, при длине волны 340 нм на спектрофотометре «Spersof M-40» (Carl Zeiss, ГДР) в непрерывном режиме регистрации. Гексокиназная реакция сопряжена с глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой и за ее активностью следили по приросту NADPH. Инкубационная смесь для определения активности гексокиназы содержала: 50 mM трис-HCl (рН 7.5), 45 mM HEPES, 3,7 mM D-глюкозы, 7,5 mM MgCl₂, 220 mM АТР, 25 мг/мл NADP, 1 ед. глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. Активность фосфофруктокиназы определяли по убыли NADP в сопряженной системе, содержащей 50 mM Na⁺-фосфатного буфера (рН 8.0), 1 mM ЭДТА, 0,02 mM дитиотрептола, 5 mM MgCl₂, 25 mM KCl, 0,5 mM NH₄Cl, 0,2 mM NADH, 0,1 mM фруктозо-6-фосфата, 0,5 mM АТР, 2 mM фосфоенолпирувата, 30 мкг/мл лактатдегидрогеназы и 60 мкг/мл пируваткиназы. Пируваткиназную активность определяли по убыли NADH в сопряженной системе, содержащей 50 mM трис-HCl буфера (рН 7.5): 0,8 mM фосфоенолпирувата, 6 mM MgCl₂, 3 mM АТР, 100 mM KCl, 0,13 mM NADH, 1 ед. лактатдегидрогеназы. Активность енолазы определяли по Baranowski [5], а D-фосфоглицератуазы — по Grisolia [6]. Общий объем смеси составлял 0,5 мл. Ферментативные реакции запускали добавлением 100—300 мкг белка в пробе и проводили при температуре 30° в течение 5—15 мин. Активность ферментов выражали в процентах по отношению к контролю. Результаты обрабатывали статистически с использованием t-критерия Стьюдента [7].

Результаты и обсуждение

Результаты измерения активности фосфофруктокиназы, гексокиназы, пируваткиназы, енолазы и фосфоглицератуазы показывают (рис. 1), что при инкубации культуры клеток нейробластомы с эстрадиолом имело место статистически достоверное повышение активности для первых трех ферментов. Ключевые гликолитические ферменты, гексокиназа и фосфофруктокиназа, наряду с пируваткиназой, относятся к числу

регуляторных, функционирующих по неравновесному типу [8]. Повышение активности этих ферментов по сравнению с контролем под влиянием эстрадиола имеет важное функциональное значение, так как приводит к активации гликолиза в целом. При 3,5-часовой экспозиции это наиболее отчетливо выражается при воздействии 25 и 50 мкг/мл эстрадиола 17 β . Активность же функционирующих по «равновесному» типу двух других ферментов—енолазы и фосфоглицеромутаза оставалась на уровне контрольной. Поскольку енолаза и фосфоглицеромутаза не выявили какой-либо тенденции к изменению активности при воздействии эстрадиола, а в литературе нет указаний на их индуцибельность, дальнейшие исследования проводили только на регуляторных ферментах гликолиза.

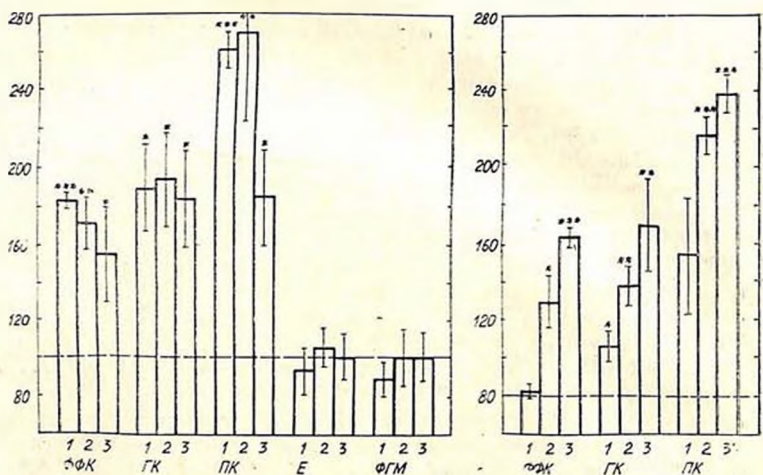


Рис. 1. Действие эстрадиола 17 β в различных дозах на активность фосфофруктокиназы (ФФК), гексокиназы (ГЛ), пируваткиназы (ПК), енолазы (Е) и фосфоглицеромутаза (ФГМ) культуры клеток нейробластомы при 3,5-часовой инкубации. По оси ординат—процент ферментативной активности по сравнению с контролем (100%). Концентрации эстрадиола: 1—25 мкг/мл, 2—50 мкг/мл и 3—100 мкг/мл. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, $n = 5$.

Рис. 2. Действие эстрадиола (50 мкг/мл) на активность ФФК, ГЛ и ПК при различных сроках экспозиции гормона. 1—1 ч, 2—2 ч, 3—3,5 ч. Остальные обозначения, как на рис. 1.

Повышение активности этих ферментов при воздействии эстрадиола обнаружено нами в мозгу крысы в условиях *in vivo* [9]. При этом было показано, что ингибирование биосинтеза белка на стадии транскрипции снимало эффект активации; таким образом, можно допустить, что последняя имела место в результате синтеза исследуемых ферментов *de novo*. В условиях культуры ткани временная зависимость между

добавлением гормона в среду и ферментативной индукцией может быть иной, чем в опытах *in vivo*, поэтому было изучено действие эстрадиола при различных сроках после его добавления (рис. 2). Оказалось, что повышение активности фосфофруктокиназы, гексокиназы и пируваткиназы зависело от продолжительности инкубации культуры клеток с гормоном и достигало максимума при 3—3,5-часовой экспозиции. Такой результат совпадает с литературными данными, полученными при изучении гормональной индукции ряда ферментов *in vitro* [10]. Следовательно, и по этому параметру культура клеток нейробластомы может служить адекватной моделью нервной ткани.

Другая, интенсивно делящаяся в норме клеточная линия фибробластов китайского хомячка также обнаруживала тенденцию к повышению ферментативной активности фосфофруктокиназы и гексокиназы при воздействии эстрадиола, однако оно оказалось статистически достоверным только в случае гексокиназы при двух концентрациях эстрадиола, но и при этом процент прироста активности был значительно ниже, чем в опытах с нейробластомой (рис. 3, а).

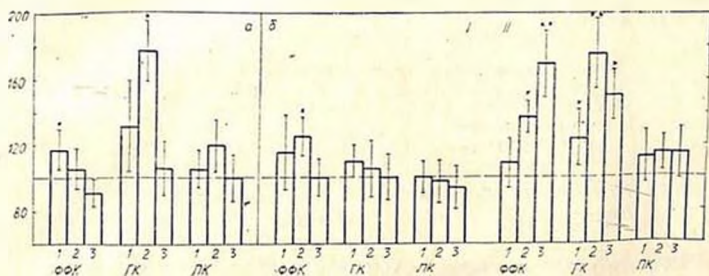


Рис. 3. Действие эстрадиола в различных дозах на активность ФФК, ГК, ПК культуры клеток фибробластов (а) и лимфоцитов (б). I—без стимуляции. II—стимулированные; остальные обозначения, как на рис. 1

Чтобы выявить возможность существования взаимосвязи между способностью клеток к делению и степенью чувствительности регуляторных ферментов гликолиза к эстрадиолу для дальнейшей работы была использована неделящаяся культура клеток лимфоцитов периферической крови человека. Как видно из рис. 3, б, при тех же воздействиях эстрадиолом активность указанных ферментов статистически достоверно не менялась. Однако, если лимфоциты стимулировать к делению митогеном—ФГА, картина изменялась. Эстрадиол достоверно активировал гексокиназу и фосфофруктокиназу, повышая таким образом активность гликолиза в целом. Это наблюдение хорошо согласуется с литературными данными об активации гликолиза и окислительного фосфорилирования в стимулированных лимфоцитах [11]. Тем не менее, надо подчеркнуть, что несмотря на достоверную активацию фосфофруктокиназы и пируваткиназы в стимулированных лимфоцитах и некоторое по-

вышение активности в фибробластах, ни в одном из этих случаев степень повышения активности не доходила до уровня, наблюдаемого в клетках нейробластомы. Интенсивность клеточного деления при этом не играет существенной роли, о чем свидетельствуют результаты определения митотического индекса для этих клеточных культур (табл.). Установлено, что воздействие эстрадиола в дозе 25 и 50 мкг/мл незначительно—в культуре фибробластов, а доза 100 мкг/мл оказалась явно токсичной для них. Таким образом, поскольку эстрадиол в концентрации 25 и 50 мкг/мл при 3-часовой инкубации не оказывал заметного влияния на митотический индекс культуры нейробластомы, вероятно, эти дозы не оказывали выраженного токсического эффекта. Однако при хроническом 4-дневном введении эстрадиол, как и дексаметазон, вызывал весьма сильное токсическое действие уже в дозе 10 мкг/мл [12], что необходимо учитывать при хронических экспериментах. Иначе обстоит ситуация в стимулированных лимфоцитах. Имея значительно меньший митотический индекс, их деление активировалось при дозах эстрадиола 25 и 50 мкг/мл и возвращалось к контрольному уровню при дозе 1000 мкг/мл.

Таблица

Зависимость величины митотического индекса от различных доз эстрадиола при 3,5 ч инкубации

Концентрация эстрадиола, мкг/мл	Контроль	25	50	100
Митотический индекс	16	20	33	16

Все это свидетельствует о том, что степень активации эстрадиолом регуляторных ферментов гликолиза непосредственно не связана со скоростью деления клеточной популяции. Вероятно, индуцибельность изученных ферментов в клетках нейробластомы—свойство, присущее и нейронам *in vivo*, которые в норме не делятся. Таким образом, можно с определенной долей вероятности утверждать, что культура клеток нейробластомы по механизму регуляции гликолиза при воздействии стероидных гормонов находится ближе к нейронам *in vivo*, чем к клеточным культурам фибробластов и делящихся и неделящихся лимфоцитов. Дополнительным свидетельством этого является факт значительной активации пируваткиназы, наблюдавшийся только в культуре нейробластомы, так как из литературных данных [13] следует, что только в нервной ткани пируваткиназа обнаруживает некоторые регуляторные свойства.

PECULIARITIES OF ESTRADIOL EFFECT ON THE ACTIVITY OF SOME GLYCOLYTIC ENZYMES IN NEUROBLASTOMA CELL CULTURE

NAZARYAN K. B., *GEVORKIAN E. S., KAGRAMANYAN M. S., EROYAN L. G.,
MANUKYAN K. L., KAZARYAN B. A.

Institute of Experimental Biology, Arm. SSR Acad. Sci., Yerevan
*Yerevan State University

Estradiol 17β induces activity of hexokinase, phosphofructokinase and pyruvate kinase in the cell culture of mouse neuroblastoma C 1300 much more pronouncedly than in the culture of mouse fibroblasts and human lymphocytes. No definite correlation between the percent of dividing cells and increase in the enzyme activity has been established in these cell cultures. It is supposed that the drastic activating effect of estradiol 17β on the neuroblastoma enzymes is due to the peculiarities of glycolysis regulation in neurons because a similar pattern of estradiol 17β action is described for nervous tissue in vivo conditions.

ЛИТЕРАТУРА

1. Haffke S. G., *Seeds N. W.* Life Sci., v. 16, № 11, p. 1649—1658, 1975.
2. Amano T., Richelson E. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Biol. Sci., v. 69, № 1, p. 258—263, 1972.
3. Keller A., Scarns H., Nermet A., Pujol I.—F. J. Neurochem., v. 36, № 4, p. 1389—1397, 1981.
4. Lowry O. H., Rosenbrough N. I. J. Biol. Chem., v. 193, № 2, p. 265—275, 1951.
5. Baranowski T., Wolna E.—In: Methods in Enzymology, v. 42, p. 335—338, N.—Y. Acad. Press., 1975.
6. Grisolia S., Carreras J.—In: Methods in Enzymology, v. 90, p. 435—450, N.—Y. Acad. Press, 1982.
7. Лакин Г. Д. Биометрия, М., Высшая школа, 1973.
8. Ньюсхолм Э., Старт К. Регуляция метаболизма, М., Мир, 1977.
9. Назарян К. Б., Геворкян Э. С., Костанян А. А., Акопян Н. С., Паносян Г. А. Журн. невропатол. и психиатрии, т. LXXXVII, вып. 6, с. 870—873, 1987.
10. Протасова Т. Н. Гормональная регуляция активности ферментов, М., Медицина, 1975.
11. Линг Н. Р. Стимуляция лимфоцитов, М., Медицина, 1971.
12. Sandquist D., Williams T. H., Sahu S. K. Exper. Cell Res., v. 113, № 2, p. 375—381, 1978.
13. Rolleston F. S., Newsholme E. A. Biochem. J., v. 104, № 3, p. 524—533, 1967.

Поступила 17. II 1987



УДК 576.8.097.2+612.82+616.834

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
ВИДОНЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ БЕЛКОВЫХ АНТИГЕНОВ
МОЗГА, ЯВЛЯЮЩИХСЯ МИШЕНЯМИ АУТОАНТИТЕЛ
ПРИ НЕКОТОРЫХ НЕРВНО-ПСИХИЧЕСКИХ
ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЧЕЛОВЕКА**

ПОЛЕТАЕВ А. Б., СЕЛИФАНОВА О. П.

Институт нормальной физиологии им. П. К. Анохина АМН СССР, Москва

С помощью твердофазного иммуоферментного анализа и тест-системы антигенов (АГ; фракции тритон-мочевинного экстракта мозга крыс, разделенного на 12 зон отличающихся по значениям pI составляющих их белков) в крови больных шизофренией, эпилепсией и рассеянным склерозом обнаружено наличие «антимозговых» аутоантител (а-АТ), спектры конкретной АГ направленности которых были специфичны для каждой из исследовавшихся нозологических форм. Наряду с этим, в крови 75—80% больных нервно-психическими заболеваниями, независимо от диагноза, выявлялись а-АТ к мозгоспецифическим белкам группы S-100. С помощью иммобилизованных на протени А-сефарозе (ковалентная сшивка) «антимозговых» а-АТ, иммуоаффинно полученных из крови больных шизофренией и эпилепсией, и экстрактов мозга крыс было выделено соответственно 11 и 5 белков, специфически связывающихся «шизофреническими» и «эпилептическими» а-АТ. Получены данные об их значениях pI и величине M_r . Отмечено, что АГ-мишенями при шизофрении являются, преимущественно, ядерные, а при эпилепсии—цитоплазматические белки нервных клеток. Данные иммуносорбции очищенных а-АТ на колонках с белками печеночных экстрактов свидетельствуют о выраженной органной (тканевой) специфичности направленности «антимозговых» а-АТ при шизофрении и эпилепсии.

В свете представлений о наличии «антимозговых» а-АТ в крови больных шизофренией, эпилепсией, многими формами деменций, демиелинизирующими и другими формами нервно-психических заболеваний [1, 2] и появлении экспериментальных данных о возможной патогенетической роли этих а-АТ [3, 4], вопросы о конкретной АГ направленности соответствующих а-АТ становятся весьма актуальными. Очевидно, что от их решения будет зависеть возможность разработки новых инструментальных методов экспресс-диагностики (в том числе «превентивной», доклинической диагностики) и способов лечения нервно-психических заболеваний, основанных на устранении из кровотока и/или специфическом подавлении синтеза аутоагрессивных а-АТ [1]. Кроме того, физико-химическая и функциональная идентификация отдельных

белков и групп белков нервной ткани, аутоиммунное поражение которых сопровождается развитием определенных психоневрологических симптомов, будет способствовать пониманию биологической роли соответствующих белков в обеспечении нормального функционирования нейрофизиологических механизмов.

В нашей работе была предпринята попытка определения характеристической АГ направленности «антимозговых» а-АТ, присутствующих в крови больных шизофренией, эпилепсией и рассеянным склерозом, а также получения сведений о количестве, величине M_r и значениях pI видонеспецифических белковых АГ-мишеней «шизофренических» и «эпилептических» а-АТ.

Методы исследования

Приготовление тест-системы АГ. Двух наркотизированных взрослых беспородных белых крыс перфузировали транскардинально 150—200 мл 0,15 М NaCl с 5 мМ ЭДТА- Na_3 , извлекали отмытый головной мозг, гомогенизировали его в 12 мл 6 М деионизированной мочевины с 0,05% тритона X-100, центрифугировали 15 мин при 20000 g и белки полученного экстракта после 3-кратного разбавления H_2O подвергали ИЭФ в гранулированном геле (2-х мм слой геля «ультродекс» с 3% амфолинов днапозона 3,5—10; «ЛКВ», Швеция) 18 ч при мощности 6 Вт и напряжении 100—2000 В. После завершения фокусировки и промера pH в геле контактным электродом («ЛКВ», Швеция) собирали зоны геля, имеющие значения pH: менее 4,0, 4—4,5, 4,5—5, 5—5,5, 5,5—6, 6—6,5, 6,5—7, 7—7,5, 7,5—8, 8—8,5, 8,5—9 и выше 9. Таким образом были получены 12 зон тест-системы. Помимо указанных зон в тест-системе дополнительно включали мозгоспецифические белки группы S-100, полученные, как описано ранее [5], основной белок миелина и кальмодулин (два последних—коммерческие препараты «Calbiochem», Швейцария). АГ, разделенные ИЭФ и элюированные из геля деионизированной водой, а также водные растворы индивидуальных белков разливали по аликвотам и хранили до использования при -40° .

Проведение твердофазного иммуноферментного анализа. Все АГ разводили 0,1 М карбонатным буфером pH 9,0 с 0,1%-ным NaN_3 до концентрации белка 10 мкг/мл и вносили в лунки 96-луночных плоскодонных полистироловых планшетов «Dynatech», Швейцария. После 12—16 ч сорбции при комнатной температуре лунки отмывали от избытка АГ и вносили в них по 100 мкл проб сывороток крови больных шизофренией (шубобразная параноидная форма), эпилепсией (генерализованная форма с частыми судорожными припадками), рассеянным склерозом или соматически и неврологически здоровых лиц. Все сыворотки использовали в разведениях 1:100 и инкубировали в лунках с АГ 16 ч при комнатной температуре. Затем лунки вновь отмывали и вносили в них по 100 мкл конъюгатов пероксидазы хрена с козьими иммуноглобулинами к IgG человека («La Miranda», США), разведенных 1:1000. Спустя 1 ч лунки отмывали и вносили в них по 100 мкл раствора хромагена (1 мг/мл о-фенилендиамина, «Sigma», США), на

0,01 М фосфатном буфере рН 6,5 с 0,01% H_2O_2). Спустя 30 мин инкубации в темноте, интенсивность реакции в лунках регистрировали фотометрически с помощью ридера МР-580 («Dynatech», Швейцария), на длине волны 405 нм. Для разведений иммунореагентов и отмывки лунок применяли 0,15 М раствор NaCl с 0,1% NaN_3 и 0,5% твин-20. Отмывки производили с помощью прибора «Autowash» («Flowlabs», Великобритания) 3-кратно после каждого иммунореагента и 6-кратно — перед внесением в лунки хромагена. Постановку реакций повторяли трижды и учитывали средний результат. Всего было проанализировано 50 проб сывороток крови больных шизофренией, 50 — больных эпилепсией и 20 — больных рассеянным склерозом. Полученные данные сравнивали с усредненными результатами тестирования 55 проб сывороток крови клинически здоровых лиц, подвергавшихся плановым диспансерным обследованиям. Значения реакций каждой пробы сыворотки с каждой из зон тест-системы выражали в усл. ед. иммунореактивности (УЕР), значение которых определяли в процентах по отношению к среднему уровню реакции данной пробы сыворотки со всеми АГ тест-системы. Расчет производили по формуле:

$$\text{УЕР} = N \cdot \frac{15}{\sum (n_1 + n_2 + \dots + n_{15})} \cdot 100\%,$$

где $n_1, n_2 \dots n_{15}$ — интенсивность реакции (в единицах оптической плотности на 405 нм) данной пробы сыворотки с зонами 1... 15 тест-системы, N — интенсивность реакции (в единицах оптической плотности) данной пробы с данной конкретной зоной тест-системы антигенов.

Такой способ представления и анализа данных был принят для устранения возможных артефактных влияний, обусловленных техническими причинами (использованием разных партий планшетов для иммуноферментного анализа, разных партий вторичных антител, меченных пероксидазой, разных партий субстратов и т. п.).

Получение антительных иммуносорбентов: выделение АГ-мишеней, связывающихся а-АТ при шизофрении и эпилепсии. После проведения иммуноферментного анализа объединенные образцы 50 сывороток крови больных шизофренией и 50 больных эпилепсией пропускали через колонки носителей, содержащих по 300 мг суммарных белков мозга крыс, иммобилизованных на CNB-сефарозе («Pharmacia», Швеция), интенсивно отмывали от несвязанного материала 0,15 М NaCl с 0,1% тритона X-100 (50 объемов) и элюировали специфически связавшиеся с колонкой «антимозговые» а-АТ с помощью 3 М NaSCN (сразу же освобождая АТ от элюирующего агента с помощью гель-фильтрации на последовательно подсоединенной колонке сефадекса G-25). Полученные фракции «антимозговых» а-АТ сывороток крови больных шизофренией и эпилепсией концентрировали ультрафильтрацией до 5 мг/мл и иммобилизовывали на протени А-сефарозе («La Miranda», США) в результате рециркуляции а-АТ через колонки указанного сорбента (16 ч при 4°), отмывки колонок от несвязанного материала и ковалентной сшивки а-АТ с протенином А с помощью 0,5%-ного глутаральдегида (1 ч

при комнатной температуре с последующей отмывкой 0,5 М NaCl). Сходным образом были получены антительные сорбенты, содержащие а-АТ к белкам ядер клеток мозга (на основе «антимозговых» а-АТ крови больных шизофренией, выделенных на иммобилизованных белках экстракта субклеточной фракции ядер мозга крыс). Полученные иммуносорбенты (по 2 мл геля) загружали в микроколонки (готовили из пастеровских пипеток), соединяли их последовательно, присоединяли преколонку 10-кратно большего объема, содержащую иммобилизованные нефракционированные γ -глобулины сывороток крови здоровых людей и через полученную систему колонок пропускали экстракты мозга 5 перфузированных крыс, приготовленные на 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,5 с 0,1% тритона X-100, 2 мМ ЭДТА-Na₃, 0,1 мМ фенилметилсульфанилфторида и 10 мМ йодацетамида. После экстенсивной отмывки тем же буфером колонки расстыковывали и с каждой элюировали сорбированные белки, используя 0,5 мл 3 М NaSCN. Элюирующий агент устранили гель-фильтрацией на колонке сефадекса G-25, уравновешенной 0,05 М формиат-аммонийным буфером, pH 7,5. Белки, снятые с колонок, гидрофильно высушивали и исследовали их с помощью электрофореза и ИЭФ. Процедура часть этого раздела работы иллюстрируется на схеме.

Схема получения антимозговых аутоантител из сывороток крови больных эпилепсией и шизофренией (I этап), их иммобилизации на протеин А-сефарозе (II этап) и применения антительных сорбентов для выделения АГ-мишеней (III этап).

I этап

Объединение сывороток больных эпилепсией (шизофренией)

Пропускание сывороток через колонки с иммобилизованными суммарными белками экстракта мозга (экстракта ядер мозга)

Отмывка колонок 50 объемами 0,15 М NaCl с 0,1% тритона X-100

Элюция суммарной фракции антимозговых «эпилептических» («шизофренических») а-АТ 3 М NaSCN

Удаление NaSCN гель-фильтрацией на G-25

Концентрирование а-АТ ультрафильтрацией на фильтре PS1M („Millipore Inc.“, США)

II этап

Рециркуляция (16 ч, 4°) полученных «эпилептических» («шизофренических») а-АТ через 2-мл колонки протеин А-сефарозы

Отмывка 0,15 М NaCl

Инкубация геля сефароза-протеин а-АТ 1 ч с 0,5% глутаральдегида

Отмывка 0,5 М NaCl

III этап

Получение суммарного экстракта перфузированного мозга 5 крыс

Пропускание экстракта через систему последовательно соединенных колонок:

а — преколонка с иммобилизованными γ -глобулинами сыворотки здоровых людей

б и в — колонки с иммобилизованными «эпилептическими» и «шизофреническими» антимозговыми а-АТ

Отмывка системы колонок (0,1 М фосфатный буфер pH 7,0 с 0,1% тритона X-100, 2 мМ ЭДТА-Na₃, 0,1 мМ ФМСФ, 10 мМ йодацетамида)

Расстыковка колонок.

Раздельная элюция сорбированных белков 3 М NaSCN. Обессоливание; гидрофильное высушивание десорбированных АГ-мишеней

Аналитическое ИЭФ и определение величины M_r белковых антигенов с помощью электрофореза в градиенте ПААГ. Полученные белки растворяли в минимальном объеме 6 М деионизированной мочевины с 0,01% тритона X-100. Электрофоретическое разделение материалов вели в градиентном (5—30% сшивки) ПААГ толщиной 1 мм в нативных условиях при использовании в качестве электродного раствора 0,01 М борат-глицинового буфера, pH 8,5. Гели готовили согласно описанию [6]. ИЭФ материалов проводили на коммерческих ПААГ-пластинах с амфолинами диапазона 3,5—10 («LKB», Швеция) при использовании фитилей, смоченных 1 М NaOH для катода и 0,1 М H_2SO_4 для анода. Электрофоретическое разделение и ИЭФ проводили на приборах GE 2/4 («Pharmacia», Швеция) и Multifor («LKB», Швеция) соответственно. В качестве маркеров для определения величины M_r и изоэлектрической точки использовали соответствующие наборы белковых свидетелей производства «Pharmacia» (Швеция).

Детектирование разделенных белков проводили по следующей схеме. Сначала гели с разделенными белками фиксировали 30 мин в 10% ТХУ, отмывали 5 мин проточной водой, окрашивали 30 мин 0,5% Кумасси R-250 в 7%-ной уксусной кислоте с 50% этанола, отмывали 5-кратно 7%-ной уксусной кислотой с 50%-ным этанолом и 0,5% $CuSO_4$ (окраску и отмывку вели при 70°), и зарисовывали расположение видимых полос. Затем гели последовательно инкубировали в 15%-ном растворе метанола (30 мин), переносили в 5%-ный раствор глутаральдегида (на 30 мин), 3-кратно отмывали чередованием деионизированной воды и 15% метанола (инкубации по 15 мин) и на 2 ч заливали гели 12 мМ раствором $AgNO_3$. После ополаскивания в деионизированной воде пластины помещали в проявитель (0,76 М NaOH с 23 мМ $NaBH_4$ и 7,5 мл/л 40%-ного формалина) и выдерживали в нем до появления интенсивной черно-коричневой окраски белковых зон. Дальнейшее развитие окраски останавливали помещением гелей в 7%-ную уксусную кислоту с 50% этанола и 0,5% $CuSO_4$. Следует отметить, что предварительная фиксация гелей в ТХУ и окраска их Кумасси в 5—10 раз повышала чувствительность последующей окраски белковых зон нитратом серебра. Описанный метод позволял выявлять зоны, содержащие менее 1 нг белка (по данным детекции стандартных разведений бычьего сывороточного альбумина).

Результаты и обсуждение

Обобщенные результаты иммуноферментного тестирования проб сывороток крови больных шизофренией, эпилепсией и рассеянным склерозом при сравнении их с данными тестирования сывороток здоровых лиц позволяют отметить характерные для каждого из заболеваний зоны пидонеспецифичных АГ, к которым наблюдается продукция а-АТ (рисунки). Так, для шизофрении это ряд зон слабокислых белков, фокусирующихся в диапазоне pH 5,0—6,5, для эпилепсии—кислые и уме-

ренно кислые белки (с pI 4—4,5 и 4,5—5), а для рассеянного склероза—слабощелочные белки и белки с резко выраженными катионными свойствами (pI 7—7,5 и pI выше 9,0).

Помимо отмеченных, характерных для каждого из исследованных заболеваний зон повышенной иммунореактивности, обращает на себя внимание наличие повышенных титров а-АТ к глияльным мозгоспецифическим белкам группы S-100, но не основному белку миелина или близкому по свойствам к S-100 кальмодулину, имеющему, преимущественно, нейрональную локализацию [7]. Были выявлены а-АТ такой направленности у 75—80% больных независимо от формы заболевания. Отметим, что данные о наличии а-АТ к белкам S-100 у больных самыми разными нервно-психическими заболеваниями были получены также югославскими исследователями, использовавшими принципиально иной метод детекции—кожно-аллергические пробы [8]. Эти данные позволяют предполагать причинную связь самых разных форм психо- и невропатологии с нарушениями метаболизма белков S-100 и могут рассматриваться как косвенное свидетельство в пользу гипотез о ведущей роли поражений глияльных клеток в патогенезе различных заболеваний мозга [9].

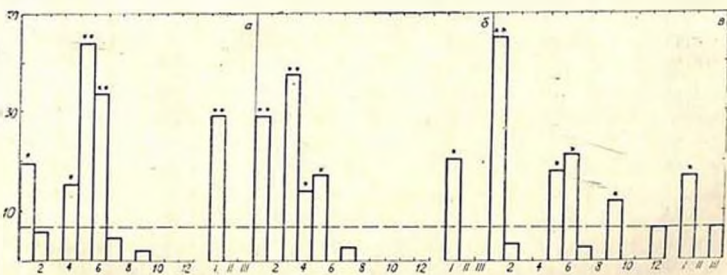


Рис. Спектр антигенной направленности видонеспецифических антимозговых а-АТ, выявляемых в сыворотках крови больных шизофренией (а), эпилепсией (б), рассеянным склерозом (в). По оси абсцисс—фракции: (зоны) 1—12 белков со значениями pI соответственно 3,0—9,5, а также белки S-100 (I), кальмодулин (II), основной белок миелина (III), с которыми проходило тестирование проб сывороток. По оси ординат—уровень относительной иммунореактивности аутоантител (в усл. ед. иммунореактивности в виде разности между данными анализа проб сывороток здоровых и больных) с антигенами тест-системы (уровень иммунореактивности здоровых лиц с соответствующими антигенами принят за 0)

С целью выявления индивидуальных АГ-мишеней (помимо S-100) было предпринято их иммуноаффинное выделение из белкового экстракта суммарного мозга крыс и субклеточной фракции ядер. В ходе проведения подготовительного этапа (выделение а-АТ из сывороток крови больных) был обнаружен интересный факт преимущественной сорбции «антимозговых» а-АТ больных шизофренией на колонках с ядерными

АГ: в экспериментах по насыщению аффинных сорбентов на равные по количеству иммобилизованных белков колонки с белками ядер сорбировалось ≈ 10 -кратное большее количество а-АТ, чем на колонки с суммарными белками экстракта мозга. В свою очередь, иммобилизованные а-АТ больных шизофренией сорбировали, преимущественно, белки ядерных экстрактов. Подобных феноменов не отмечалось при работе с сыворотками больных эпилепсией и преколонкой, содержащей γ -глобулины из крови здоровых людей. Эти данные подтверждают прежние иммуногистохимические наблюдения об антиядерной направленности «антимозговых» а-АТ при шизофрении [10].

Таблица 1

Изоэлектрические точки белковых антиген-мишеней аутоантител крови больных шизофренией и эпилепсией

Значения pI элюируемых белков

Носитель с неиммунными γ -глобулинами (преколонка)	Носитель с АТ больных шизофренией	Носитель с АТ больных эпилепсией
4,30	4,30	—
4,55	—	—
5,00	—	—
5,15	—	—
5,20	—	—
—	5,25	—
5,30	—	—
—	5,50	5,50
—	5,57	—
—	—	5,65
5,75	5,75	—
—	6,00	—
—	6,15	—
6,20	6,20	6,20
—	6,25	—
6,27	—	—
—	6,33	—
—	6,55	6,55
—	6,75	—
6,95	—	—
7,25	7,25	—
—	7,50	—
—	—	7,60
7,70	—	—
—	7,85	—
—	—	8,05
8,17	—	—
8,20	—	—
8,35	—	—
—	—	8,50

Таблица 2

Величины M_r белковых антиген-мишеней аутоантител крови больных шизофренией и эпилепсией

M_r элюируемых белков (в кД)

Носитель с неиммунными γ -глобулинами (преколонка)	Носитель с АТ больных шизофренией	Носитель с АТ больных эпилепсией
14	14	14
—	—	19
—	—	23
—	—	27
29	—	—
—	31	—
—	34	—
44	—	—
—	46	—
—	47	47
54	54	—
—	56	—
—	62	—
63	—	—
—	67	—
74	74	—
—	100	—
—	300	—
>300	>300	>300

Данные о величине M_r и изоэлектрических точках белковых АГ-мишеней при шизофрении и эпилепсии, а также о характеристиках белков сорбируемых преколонкой, представлены в табл. 1 и 2. При их анализе обращает на себя внимание общее соответствие между значениями

р) индивидуальных белковых АГ и характерными для шизофрении и эпилепсии зонами повышенной иммунореактивности тест-системы, выявленными с помощью иммуноферментного анализа. Это подтверждает возможность использования данной тест-системы либо ее модификаций в качестве основы для разработки инструментальных экспресс-диагностических методов, пригодных для клинического использования и массовых диспансерных обследований.

Отметим, что среди индивидуальных АГ-мишеней а-АТ больных шизофренией и эпилепсией нам удалось обнаружить соответственно 11 и 5 белков (за вычетом белков, характеристики которых совпадали с сорбировавшимися на преколонку). При этом общий состав АГ-мишеней при данных заболеваниях был существенно различным, что, вероятно, отражает различия в молекулярных изменениях в мозгу, приводящих к возникновению или сопровождающих развитие шизофрении и эпилепсии. Помимо физико-химических характеристик АГ-мишеней следует отметить тот факт, что большая часть обнаруженных белков имела признаки органной (тканевой) специфичности. Это заключение было сделано нами на основании экспериментов по изучению сорбции на иммобилизованных белках экстрактов печени и крови крыс «антимозговых» а-АТ, выделенных из крови больных с использованием колонок с белками мозга, так как было обнаружено, что с сорбентами, содержащими белки печени и крови крыс связывается не более 10—15% а-АТ крови больных шизофренией и эпилепсией, сорбирующихся на колонки с белками мозга, а 85—90% общей популяции а-АТ проходит через сорбент без задержки.

Обнаруженные и описанные 11 и 5 белков, являющихся АГ-мишенями «антимозговых» а-АТ при шизофрении и эпилепсии, вероятно, не исчерпывают всего спектра белков мозга человека, являющихся объектами аутоиммунных процессов при указанных заболеваниях. Это обусловлено тем, что, во-первых, помимо видонеспецифичных АГ-мишеней, общих для мозга человека и других млекопитающих, мишенями а-АТ могут быть и видоспецифичные белки, связанные с молекулярным обеспечением структурно-функциональных особенностей, присущих только мозгу человека. Используемые нами подходы не позволяли детектировать наличие или отсутствие таких видоспецифичных АГ-мишеней; во-вторых, следует иметь в виду, что, используя в качестве основного инструмента иммобилизованные «антимозговые» а-АТ, выделенные из небольших по объему проб сывороток крови множества больных шизофренией и эпилепсией, мы обнаружили и проанализировали свойства лишь тех видонеспецифических АГ-мишеней, а-АТ к которым присутствовали в крови всех или значительной части больных одной и другой нозологической формой. Выделение отдельных АГ, поражаемых а-АТ лишь у индивидуальных больных, возможно, имело место в наших экспериментах, однако количество этих белков оказалось за пределами разрешения методов их детекции. Подтвердить или опровергнуть эти предположения смогут дальнейшие углубленные исследования, однако обнаружение

того факта, что мишенями аутоиммунных процессов при шизофрении и эпилепсии являются не сотни или тысячи, а гораздо меньшее число белков, внушает оптимизм в плане исследования соответствующих процессов и разработки способов их коррекции.

PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF SPECIES-NONSPECIFIC BRAIN PROTEIN ANTIGENS—TARGETS FOR AUTOANTIBODIES IN SOME NEUROLOGICAL DISORDERS

POLETAYEV A. B., SELIFANOVA O. P.

P. K. Anokhin Institute of Normal Physiology, USSR Acad. Med. Sci., Moscow

„Anti-brain“ autoantibodies (a-AT) specific for each pathology have been detected in the blood of patients suffering from schizophrenia, epilepsy and multiple sclerosis with the aid of solid-phase immunoenzyme analysis and test system of antigens. In addition to them, a-AT to brain-specific S-100 proteins have been detected in the blood of 70–80% of patients with various neurological disorders. With the aid of anti-brain a-AB, immobilized on protein A-Sepharose, proteins specifically binding „schizophrenic“ and „Epileptic“ a-AB have been isolated from rat brain extracts—11 and 5 proteins respectively. Their M_r and pI values have been determined. It's emphasized that in the case of schizophrenia antigen targets are nuclear proteins, whereas in epilepsy—cytoplasmic ones. Immunosorbition data point to a tissue-specificity of anti-brain a-AB in schizophrenia and epilepsy.

ЛИТЕРАТУРА

1. Полетаев А. Б., Шерстнев В. В., Долгов О. Н. Вестн. Акад. мед. наук СССР, № 2, с. 53–55, 1982.
2. Семенов С. Ф., Семенова К. А. Иммунобиологические основы патогенеза нервных и психических заболеваний. М., Медицина, 1984.
3. Полетаев А. Б. Изменение биосинтеза макромолекул мозга животных под влиянием антител к белкам S-100, циркулирующих в общем кровотоке. Ден. ВИНТИ 26, 03, 1986, № 2074-B.
4. Бурбаева Г. Ш., Каменский А. А., Ключиник Т. П., Нинатов С. А., Зайко С. А., Андросова А. В. Журн. высш. нерв. деят-сти, т. 35, № 4, с. 747–752. 1985.
5. Беляев С. В., Куприяненко Т. И., Лысова Н. П., Полетаев А. Б. Биохимия, т. 46, № 12, с. 2193–2201, 1981.
6. Gel-electrophoresis. Principles and methods. Pharmacia guidebook, Uppsala, 1984.
7. Donato R., Battaglia F., Cocchia D. J. Neurochem., v. 47, № 2, p. 350–354, 1986.
8. Vernadakis A. Federat. Proc., 34; № 1, p. 89–95, 1975.
9. Jankovic B. D., Jakulic S., Horvat J. Biol. Psychiat., v. 17, № 6, p. 687–698, 1982.
10. Heath R. G., Krupp I. M. Arch. Gen. Psychiat., v. 16, № 1, p. 1–9, 1967.

Поступила 12. I. 1987

ВЫСВОБОЖДЕНИЕ [^{14}C] β -ФЕНИЛЭТИЛАМИНА ПРИ
ЛОКАЛЬНОЙ СУПЕРФУЗИИ НЕОСТРИАТУМА
ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

ЖАРИКОВА А. Д., ГОДУХИН О. В., ЖАРИКОВ С. П.

Институт биологической физики АН СССР, Пущино

Амфетаминоподобный симпатомиметик β -фенилэтиламин (β -ФЭА) идентифицирован в головном мозгу животных и человека [1], причем основная часть эндогенного β -ФЭА обнаружена во фракции нервных окончаний [2]. Считается, что эффекты экзогенно введенного β -ФЭА на ЦНС преимущественно связаны с его влиянием на моноаминергические системы головного мозга и в особенности на дофаминергическую систему [3]. В исследованиях *in vivo* установлено [4], что β -ФЭА может модулировать эффективность дофаминергической нейротрансмиссии, взаимодействуя с пресинаптической [5] и постсинаптической [6] областью дофаминергического синапса. Кроме того, обнаружено, что региональное распределение эндогенного дофамина (ДА) в головном мозгу крыс совпадает с распределением экзогенно введенного в больших дозах β -ФЭА с максимальным накоплением в неостриате [7]. Неостриат обладает значительной активностью декарбоксилазы ароматических аминокислот—фермента, катализирующего синтез β -ФЭА из L-фенилаланина и занимает одно из первых мест среди структур головного мозга по содержанию эндогенного β -ФЭА [1]. Учитывая вышесказанное, закономерен вопрос, не локализуется ли эндогенный β -ФЭА в дофаминергических, в частности, нигростриатных нейронах, обладающих всеми ферментными системами, необходимыми для синтеза и разрушения β -ФЭА? Одним из подходов к решению этого вопроса является сравнительный анализ высвобождения предварительно апплицированных в неостриат [^3H] ДА и [^{14}C] β -ФЭА в ответ на электрическую стимуляцию сомы дофаминергических нейронов в компактной зоне черной субстанции. В данной статье представлены результаты такого сравнительного анализа.

В работе использована методика локальной суперфузии головного мозга с помощью описанной ранее системы нагнетательно-отсасывающей

(push-pull) канюли с одновременной регистрацией электрической активности мозга из области суперфузии [8]. Эксперименты проводили в условиях острого опыта на белых крысах-самцах массой 300—400 г, находящихся под нембуталовым наркозом (40 мг/кг, внутривенно). В ходе предварительной операции животным стереотаксически (по атласу Фифковой и Маршалла) в неостриатум вживляли направляющую трубку с регистрирующим электродом ($AP = -1,5$; $L = 2,5$; $V = 5$), а в компактную зону черной субстанции — стимулирующие электроды ($AP = +4,5$ и $4,3$; $L = 2$; $V = 8,5$). Методика анализа высвобождения в перфузат предварительно апплицированного в неостриатум [3H] ДА подробно приведена ранее [9]. В экспериментах с β -ФЭА в области будущей суперфузии через направляющую трубку с помощью микрошприца вводили [^{14}C] β -ФЭА (4 мкл, $8 \cdot 10^{-9}$ моль, У. А. 50 мКи/ммоль, «Amersham», Англия). По истечении 30-минутного периода накопления [^{14}C] β -ФЭА в клеточных элементах в неостриатум до уровня кончика регистрирующего электрода погружалась push-pull канюля. Для суперфузии использовали искусственную цереброспинальную жидкость следующего состава (мМ): NaCl—117; KCl—5,4; CaCl₂—1,3; NaH₂PO₄—1,1; NaHCO₃—25; MgSO₄—0,6; глюкоза—10 с добавлением ингибитора МАО ниамида (12,5 мкМ). Перед экспериментом перфузионную жидкость насыщали карбогеном (O₂:CO₂=95:5%) до pH 7,4. Скорость тока перфузионной жидкости составляла 50 мкл/мин, общее время суперфузии около 3,5 ч. Сбор перфузата начинали спустя 100 мин от начала суперфузии. Собранные в счетные флаконы 20-минутные фракции перфузата высушивали при 90°. Оценку суммарной радиоактивности производили в толуольном сцинтилляторе на счетчике SL-4000 фирмы «Intertechnique» (Франция). Радиоактивность первой 20-минутной фракции перфузата принимали за 100% и относительно неё оценивали высвобождение [^{14}C] β -ФЭА в последующие 20-минутные периоды суперфузии. В течение 2- и 4-го 20-минутных периодов суперфузии проводили электрическую стимуляцию компактной зоны черной субстанции в течение 20 мин серийными импульсами длительностью 0,1 мсек, с частотой серии 0,6, частотой внутри серии 5 Гц, длительностью серии 1 с. Достоверность различия уровней высвобождения [^{14}C] β -ФЭА в аналогичные периоды суперфузии у сравниваемых групп животных оценивали по критерию Стьюдента. В конце эксперимента осуществляли морфологический контроль положения канюли и электродов.

В проведенных экспериментах установлено, что спустя 100 мин от начала локальной суперфузии неостриатума головного мозга крыс спонтанное высвобождение предварительно апплицированного [^{14}C] β -ФЭА постепенно уменьшается в течение пяти последовательных 20-минутных периодов суперфузии. Результаты экспериментов по анализу высвобождения [^{14}C] β -ФЭА при электрической стимуляции черной субстанции приведены на рисунке. Для сравнения на этом же рисунке представлены данные по высвобождению в перфузат предварительно апплицированного в неостриатум [3H] ДА, полученные нами ранее [9]. При элек-

трической стимуляции компактной зоны черной субстанции с частотой 5 Гц в течение 2-го 20-минутного периода суперфузии наблюдали достоверное 20%-ное увеличение ($p < 0.05$) высвобождения в перфузат предварительно апплицированного в неостриатум [^{14}C] β -ФЭА. При электрической стимуляции, производимой в течение 4-го 20-минутного периода суперфузии проявлялась лишь тенденция к росту высвобождения [^{14}C] β -ФЭА. Эффекты электрической стимуляции на высвобождение [^{14}C] β -ФЭА зависели от расположения канюли в неостриатуме и стимулирующих электродов в черной субстанции. Как и в слу-

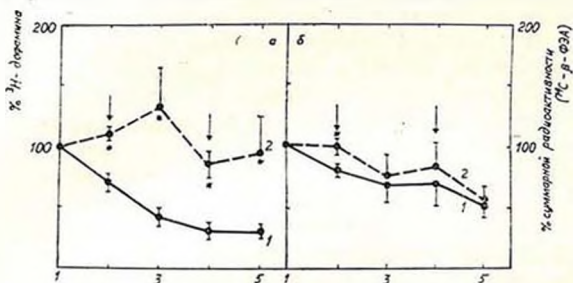


Рис. Влияние электрической стимуляции (частота 5 Гц) компактной зоны черной субстанции головного мозга крыс на высвобождение в перфузат предварительно апплицированных в неостриатум [^3H] ДА (а) и [^{14}C] β -ФЭА (б) 1, 2, 3, 4, 5—20-минутные фракции перфузата, собранные спустя 100 мин от начала перфузии неостриатума; электрическая стимуляция производилась в течение 2-го и 4-го 20-минутных периодов (указано стрелками); — достоверно различающиеся средние значения уровней высвобождения [^3H] ДА и [^{14}C] β -ФЭА в аналогичные периоды перфузии 2-х сравниваемых групп экспериментов (3—4 опыта, $M \pm m$; $p < 0.05$); прямой линией обозначено спонтанное высвобождение, пунктирной—индуцируемое электрической стимуляцией

чае с [^3H] ДА, наибольшее повышение высвобождения в перфузат [^{14}C] β -ФЭА обнаружено при вживлении электродов в ростромедиальную или центральную часть черной субстанции и погружении push-pull канюли в центральную часть головки хвостатого ядра. В том случае, если стимулирующие электроды находились в вентрокаудальной части черной субстанции, а push-pull канюля—в росто-центральной части хвостатого ядра, стимулированное высвобождение [^{14}C] β -ФЭА было меньше. Хотя предварительно апплицированный в неостриатум [^{14}C] β -ФЭА высвобождается в перфузат при тех же параметрах электрической стимуляции компактной зоны черной субстанции, что и [^3H] ДА, динамика высвобождения у них различна. В экспериментах с [^3H] ДА в последующий после электрической стимуляции 20-минутный период суперфузии происходит еще большее увеличение высвобождения в перфузат [^3H] ДА, тогда как для [^{14}C] β -ФЭА этого не наблюдается. Причины такого различия могут быть связаны как с разным механизмом поступления апплицированного [^{14}C] β -ФЭА внутрь

нервных окончаний, так и разными возможными механизмами высвобождения соединений из нервных окончаний. Согласно нашим данным [10], β -ФЭА накапливается в нервных окончаниях путем облегченной диффузии. Поэтому доля поступающего в окончания [^{14}C] β -ФЭА из общего количества апплицированного внутрь неостриатума [^{14}C] β -ФЭА невелика и зависит только от разности концентраций [^{14}C] β -ФЭА снаружи и внутри нервных окончаний. В свою очередь [^3H] ДА накапливается в нервных окончаниях с помощью Na^+ -зависимого активного транспорта, осуществляемого мембранным переносчиком [11]. Этот механизм транспорта позволяет апплицированному в неостриатум [^3H] ДА накапливаться в дофаминергических нервных окончаниях за короткий промежуток времени в больших количествах. Таким образом, разный исходный уровень [^{14}C] β -ФЭА и [^3H] ДА, аккумулированных в неостриатуме перед суперфузией, может объяснить различную динамику высвобождения [^{14}C] β -ФЭА и [^3H] ДА при одних и тех же параметрах электрической стимуляции. Кроме того, при длительной электрической стимуляции внутри нервных окончаний возрастает концентрация Na^+ , что может инициировать Na^+ -зависимое высвобождение ДА, опосредованное мембранным переносчиком. По-видимому, увеличение высвобождения [^3H] ДА в последующий после электрической стимуляции период суперфузии связано также с высвобождением [^3H] ДА посредством переносчика. В случае [^{14}C] β -ФЭА Na^+ -зависимый компонент высвобождения, вероятно, отсутствует; было установлено, что функционирование мембранного переносчика для β -ФЭА не зависит от Na^+ [10].

Таким образом, полученные нами данные показывают, что предварительно апплицированный в неостриатум [^{14}C] β -ФЭА высвобождается в перфузат при тех же параметрах электрической стимуляции компактной зоны черной субстанции, что и [^3H] ДА. Это подтверждает предположение о локализации эндогенного β -ФЭА в дофаминергических nigrostriatalных нейронах головного мозга крысы.

RELEASE OF ^{14}C - β -PHENYLETHYLAMINE DURING LOCAL SUPERFUSION OF RAT BRAIN NEOSTRIATUM

ZHARIKOVA A. D., GODUKHIN O. V., ZHARIKOV S. I.

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

Using local superfusion technique of rat brain neostriatum with push-pull cannulae it was demonstrated that preliminary applied [^{14}C]- β -phenylethylamine is released into perfusate under the same conditions of electric stimulation of substantia nigra (5 Hz) as [^3H] dopamine. Data obtained confirm the suggestion about localization of endogenous β -phenylethylamine in the dopaminergic nigro-striatal neurons of rat brain.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nakajima T., Kukimoto Y., Sano J. J. Pharmacol. and Exp. Ther., v. 143, № 3, p. 319—325, 1964.
2. Boulton A. A., Baker G. B. J. Neurochem., v. 25, № 2, p. 477—481, 1975.
3. Sabelli H. C., Borison R. L., Diamond B. J., May J., Hovdala H. S.—In: Norepinepholic phenylethylamines. Part I. Phenylethylamine: biological and clinical aspects (eds. A. D. Mosnaim, M. Wolf). p. 345—376. Dekker, New York, Basel, 1978.
4. Жарикова А. Д., Годухин О. В. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 10, с. 395—398, 1979.
5. Fuxe K., Grcebecker H., Jonsson J. Eur. J. Pharmacol., v. 2, № 3, p. 202—207, 1967.
6. Antelman S. M., Edwards D. J., Lin M. Brain Res., v. 127, № 2, p. 317—322, 1977.
7. Jackson D. M., Smythe D. B. Neuropharmacology, v. 12, № 7, p. 663—668, 1973.
8. Годухин О. В., Жарикова А. Д. Физиол. журн. СССР, т. 65, № 10, с. 141—143 1979.
9. Жарикова А. Д., Годухин О. В. Физиол. журн. СССР, т. 71, № 1, с. 105—112, 1985.
10. Жариков С. Н., Жарикова А. Д., Буланцева А. Ю. Докл. АН СССР, т. 292, № 6, с. 1494—1497, 1987.
11. Жариков С. Н., Жарикова А. Д., Юричская М. М. Нейрохимия, т. 6, № 3, с. 311—316, 1987.

Поступила 25. III 1987



УДК 612.821.7+612.822.1

СУЛЬФИДРИЛЬНЫЕ ГРУППЫ В ОТДЕЛЬНЫХ КЛЕТКАХ СИНЕГО ПЯТНА, СУПРАОПТИЧЕСКОГО ЯДРА И ДОРЗАЛЬНОГО ЯДРА ШВА ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ ЛИШЕНИИ ПАРАДОКСАЛЬНОЙ ФАЗЫ СНА

КРИВЕНКО Н. Е., КЛЕНИКОВА В. А., ДЕМИН Н. Н.

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

Ранее было установлено [1], что 24-часовое лишение крыс парадоксальной фазы сна (ПФС) приводит к повышению содержания «свободных» SH-групп в белках нерастворимой (мембранной) фракции гомогената стволовой части головного мозга; в белках растворимой фракции оно не изменялось, так же как и содержание низкомолекулярных SH-компонентов. При этом оказалось [2], что сдвиги содержания SH-групп в структурных белках были связаны лишь с синаптосомной и ядерной субфракциями. Такие изменения в структурных (мембранных) белках были расценены как показатель их сдвигов в сторону денатурации. При микрохимическом исследовании гомогенатов толстых срезов тех участков ствола мозга крыс, в которые входили имеющие отношение к процессам сна ядра шва (nn. raphe dorsalis et pontis), синее пятно и супраоптическое ядро, было показано [3], что лишение ПФС вызывало достоверное повышение содержания SH-групп лишь в дорзальном ядре шва.

В связи со всем сказанным для большего уточнения локализации денатурационных изменений в белках ствола мозга при лишении ПФС казалось желательным провести определения содержания SH-групп именно в отдельных клетках исследуемых ядер.

Крыс-самцов линии *Wistar* массой 180—210 г подвергали 24-часовому лишению ПФС путем помещения их на площадки размером 45×45 мм, расположенные на уровне 2 мм над водой [4, 5]. Контролем служили бодрствовавшие животные, находившиеся в условиях свободного поведения. У одной серии подопытных и контрольных крыс (по 4—5 в каждой группе) определяли содержание SH-групп в телах отдельных перинейрональных глиоцитов и в цитоплазме и клеточных ядрах отдельных нейронов. Эти определения производили на срезах, фиксированных по Бродскому [6], обезвоженных по общепринятой ги-

стологической схеме и залитых в парафин соответствующих проб ткани. Для выявления SH-групп использовали окислительно-восстановительную реакцию с 2,2'-диокси-6,6'-динафтилдисульфидом (ДДД) с последующим окрашиванием бис-дiazотированным о-дианизидином [7] в применении для нервной ткани. Величину оптической плотности объектов на окрашенных препаратах измеряли на микроцитометре МЦФ-VI при длинах волн 550 и 600 нм. С помощью таблиц Mendelsohn [8] находили средние величины оптической плотности, которые пропорциональны концентрации SH-групп в объекте (в усл. ед.). В нейронах исследовали отдельные участки цитоплазмы, а оптическую плотность в глиоцитах определяли в этих клетках целиком. После нахождения величины объема объектов, умножая эту величину на величину их оптической плотности, находили содержание SH-групп на 1 клетку [6]. На срезах, полученных от одной крысы, фотометрировали 10—15 клеток.

Результаты, полученные при определении объема цитоплазмы нейронов синего пятна, дорзального ядра шва и супраоптического ядра и количественные характеристики белковых SH-групп в ней после 24-часового лишения крыс ПФС, представлены в табл. 1. Они показывают, что единственным достоверным сдвигом, установленным в этих условиях, явилось небольшое снижение концентрации SH-групп в цитоплазме нейронов супраоптического ядра, что было обусловлено повышением ее объема при неизменном содержании SH-групп.

В белках митохондрий суммарного гомогената ствола мозга лишение ПФС не вызывало изменений количества SH-групп [2], так же как и в растворимых белках такого гомогената [1]. Поэтому и результаты настоящей работы можно рассматривать как подтверждение этих прежних данных—24-часовое лишение ПФС не сопровождается денатурационными сдвигами в цитоплазматических белках также в отдельных нейронах синего пятна, дорзального ядра шва и супраоптического ядра.

В табл. 2 представлены данные о содержании на 1 клетку SH-групп в ядрах нейронов и в цельных телах глиоцитов тех же исследованных нами структур ствола головного мозга крыс после 24-часового лишения их ПФС. Следует подчеркнуть, что, как показывают эти данные, лишение ПФС достоверно не влияло на содержание белковых SH-групп в глиоцитах ни одного из трех исследованных образований. В то же время при стабильности содержания SH-групп в ядрах нейронов синего пятна и супраоптического ядра оказалось, что лишение ПФС вызывало значительное повышение содержания SH-групп в белках ядер нейронов дорзального ядра шва.

Как было упомянуто выше, в результате лишения ПФС было неоднократно констатировано [1, 2, 9] существенное увеличение концентрации белковых SH-групп во фракции нерастворимых белков суммарных гомогенатов ствола головного мозга. В то же время и в отдельных клетках синего пятна, дорзального ядра шва и супраоптического ядра в настоящей работе (причем лишь в ядрах нейронов), и в гомогенатах

Таблица 1

Объем цитоплазмы нейронов синего пятна, дорзального ядра шва и супраоптического ядра головного мозга крыс, концентрация и содержание (на 1 клетку) в ней SH-группы после 24-часового лишения парадоксальной фазы сна (объем, в $\mu\text{м}^3$; концентрация, в усл. ед. оптической плотности; содержание, в усл. ед. оптической плотности · ед. объема · 100)

Группа животных	Синее пятно			Дорзальное ядро шва			Супраоптическое ядро		
	объем	концентрация	содержание	объем	концентрация	содержание	объем	концентрация	содержание
Контроль	551 $\pm$ 45	47 $\pm$ 1,5	259 $\pm$ 23	686 $\pm$ 31	99 $\pm$ 1,9	679 $\pm$ 34	1450 $\pm$ 41	58 $\pm$ 0,7	841 $\pm$ 27
Опыт	539 $\pm$ 25	48 $\pm$ 1,5	259 $\pm$ 15	610 $\pm$ 24	111 $\pm$ 2,1	677 $\pm$ 30	1594 $\pm$ 59	53 $\pm$ 1,0	845 $\pm$ 36
Разница, в %	-2	+2	+0	-11	+12	-2	+10*	-9*	+1

Примечание. * Здесь и в табл. 2 разница достоверна.

Таблица 2

Содержание (на 1 клетку) SH-группы в ядрах нейронов и в телах перинейрональных глиоцитов синего пятна, дорзального ядра шва и супраоптического ядра головного мозга крыс после 24-часового лишения парадоксальной фазы сна (в усл. ед.)

Группа животных	Синее пятно		Дорзальное ядро шва		Супраоптическое ядро	
	ядро нейрона	глиоцит	ядро нейрона	глиоцит	ядро нейрона	глиоцит
Контроль	39 $\pm$ 1,5	51 $\pm$ 1,5	75 $\pm$ 1,7	153 $\pm$ 3,5	76 $\pm$ 1,1	119 $\pm$ 1,3
Опыт	42 $\pm$ 1,3	51 $\pm$ 1,5	98 $\pm$ 2,0	162 $\pm$ 2,6	72 $\pm$ 1,0	119 $\pm$ 1,3
Разница, в %	+8	+0	+31*	+6	-5	+0

этих ядер [3] после лишения ПФС повышение содержания белковых SH-групп выявлялось только в ткани дорзального ядра шва. Видимо, остается в силе допущение [10, 11], что основной причиной накопления белковых SH-групп в стволовых структурах головного мозга при лишении ПФС служат денатурационные процессы именно в синаптических мембранах нейронов. При этом надо заметить, что изменения именно в этих структурах были недоступными для выявления тем методом, который был использован нами в данной работе. Этот весьма важный вопрос подлежит специальному изучению. Довольно высокое же повышение содержания (около 25%) белковых SH-групп в «ядерной» фракции суммарных гомогенатов ствола мозга при лишении ПФС [2], возможно, объясняется наличием в этой фракции, кроме ядер, также и обрывков других структур с измененным содержанием белковых SH-групп.

SULFHYDRYL GROUPS IN SINGLE CELLS OF LOCUS COERULEUS, NN. SUPRAOPTICUS ET RAPHE DORSALIS OF REM-SLEEP DEPRIVED RATS

KRIVENKO N. E., KLENIKOVA V. A., DOEMIN N. N.

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

It has been demonstrated that in 24 REM-sleep deprived rats free SH-group content (per cell) changes in the cytoplasm of *locus coeruleus*, *nn. supraopticus* et *raphe dorsalis* neurons. It was not changed in the perineuronal gliocytes, in the cell nuclei of the *n. supraopticus* and *locus coeruleus* neurons, while in the *n. raphe dorsalis* neuronal nuclei it increased by 31 per cent.

ЛИТЕРАТУРА

1. Рашиевская Д. А. Докл. АН СССР, т. 230, с. 989—991, 1976.
2. Демин Н. Н., Рашиевская Д. А. Физиол. журн. СССР, т. 63, с. 23—28, 1979.
3. Маликов У. М., Шелепина Е. П. Нейрохимия, т. 3, с. 168—171, 1984.
4. Pujol J.-F., Mouret J., Jouvett M., Glowatzki J. Science, v. 159, p. 112—114, 1968.
5. Демин Н. Н.—В кн.: Вопросы биохимии нервной и мышечной систем (под ред. В. Н. Чиквадзе), т. 3, с. 155—160. Тбилиси, Мицнереба, 1979.
6. Бродский В. Я. Трофика клетки, М., Наука, 1966.
7. Barnett R. J., Sellgman A. M. Science, v. 116, p. 323—327, 1952.
8. Азроскин А. С., Папаян Г. В. Цитофотометрия, А., Наука, 1977.
9. Демин Н. Н., Шелепина Е. П., Неробкова Л. Н., Крапивин С. В., Воронина Т. А. Физиол. журн. СССР, т. 72, с. 723—728, 1986.
10. Демин Н. Н.—В кн.: Цитохимические корреляты торможения нейронов (под ред. Л. Э. Певзнера), с. 18—39, Л., Наука, 1978.
11. Демин Н. Н. Нейрохимия, т. 1, с. 20—27, 1982.

Поступила 28. IV 1987



УДК 577.152.277+612.82+612.821.3

ПРОНИЦАЕМОСТЬ МЕМБРАН ЛИЗОСОМ ГОЛОВНОГО
МОЗГА ДЛЯ КИСЛОЙ РНКазы ПРИ ОБУЧЕНИИ
КРЫС РАЗЛИЧНЫХ ЛИНИЙ

НЕЧАЕВА Г. А., ЛОПАТИНА Н. Г.

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

Функциональная активность клеток головного мозга при обучении связана с изменением свойств их мембранных структур и внутриклеточным перемещением ряда высокомолекулярных соединений [1—3]. Одним из факторов, влияющих на состояние мембран, является действие основных белков—гистонов, которые увеличивают проницаемость клеточных мембран [4—6]. Гистоны головного мозга могут мигрировать из клеточных ядер [8, 9] и связываться с анионными группами эндоплазматического ретикулума [8]. Особенно ярко проявляется их действие на мембрану лизосом [6, 7, 10]. Гистоны слюнной железы телят в физиологической концентрации (0,5—50 мкг/мл) резко увеличивают проницаемость мембраны лизосом для лизосомных гидролаз, главным образом, для кислой РНКазы [6, 7]. Стимулирующий эффект гистонов на выход кислой РНКазы из лизосом головного мозга зависит от концентрации гистонов и уменьшается при исследовании лизосом животных, подвергающихся выработке условного рефлекса активного избегания (УРАИ) [11].

Целью настоящей работы было выяснить, наблюдается ли корреляция между степенью обученности крыс УРАИ и изменением проницаемости мембран лизосом головного мозга для кислой РНКазы. Для этого сопоставлены результаты, полученные при исследовании двух линий крыс, селекционированных из линии Крушинского-Молодкиной по высокому и низкому числу УРАИ. Проведено также сопоставление действия на выход кислой РНКазы из лизосом больших полушарий головного мозга крыс линии *Wistar* сочетанных (при обучении) и несочетанных (при псевдообучении) раздражителей, что позволило разграничить изменения, возникающие вследствие обучения от изменений, обусловленных воздействием стрессорных, сенсорных и двигательных влияний, сопровождающих выработку УРАИ.

В работе использованы крысы-самцы массой 160—170 г. Выработку УРАИ осуществляли в челночной камере двустороннего активного избегания. У крыс, селектированных из линии Крушинского-Молодкиной по высокой (линия ВЛ) и низкой (линия НЛ) способности к образованию УРАИ [12] выработку условного рефлекса проводили в течение 4 дней, во время 4 сеансов с промежутком в 24 ч. В каждом сеансе животные получали с интервалом в 30 с по 20 сочетаний условного раздражителя (свет) с безусловным (электрический ток силой 1,5 А). Всего животные получали 80 сочетаний условного раздражителя с безусловным. В каждом опыте обучали одновременно 2-х животных—одно линии ВЛ, другое—линии НЛ. Крыс линии *Wistar* обучали в течение одного дня. Животные получали все 80 сочетаний условного раздражителя с безусловным за один сеанс с теми же интервалами между раздражителями, что и при 4-дневном обучении. При этом исследовали одновременно 3-х животных: подвергнутое выработке условного рефлекса (массированное обучение); псевдообученное, которому предъявляли несочетанные условный и безусловный раздражители (активный контроль); интактное (пассивный контроль).

Через 30 мин после окончания обучения животных декапитировали в холодной комнате и все последующие операции проводили на холоду. Из больших полушарий головного мозга готовили гомогенаты (10%) в 0,32 М сахарозе с 0,001 М ЭДТА и 0,01 М трис-НСl буфером, pH 7,4, из которых получали обогащенные лизосомами фракции (ОЛФ) [6, 11]. Гомогенат центрифугировали 10 мин при 1100 g. Из надосадочной жидкости центрифугированием при 12000 g в течение 20 мин получали осадок ОЛФ и промывали его 0,32 М сахарозой с 0,01 М трис-НСl буфером, pH 7,4. В промытом осадке содержалось около 80% всей активности кислой РНКазы и кислой фосфатазы гомогенатов больших полушарий.

Для определения проницаемости мембраны лизосом для кислой РНКазы свежевыделенные осадки ОЛФ из больших полушарий головного мозга подопытных и контрольных крыс суспендировали в 0,25 М сахарозе с pH 7,4. Пробы (1 мг белка в 1 мл) инкубировали в водяном термостате при 25° в течение 30 мин в 0,25 М сахарозе с 0,01 М трис-НСl буфером, pH 7,4, с добавлением ядерного гистона тимуса H_{2a} и без добавления. Затем пробы охлаждали и центрифугированием при 12000 g в течение 20 мин отделяли осадок (ОЛФ). В надосадочной жидкости определяли активность кислой РНКазы, как описано ранее [6, 11], по величине которой судили о выходе фермента из лизосом. Активность РНКазы выражали в ΔA_{260} /мг белка. Величину выхода кислой РНКазы из лизосом рассчитывали также в % от суммарной активности латентной кислой РНКазы, взятой для инкубации суспензии ОЛФ. Латентную РНКазу в осадке ОЛФ определяли с добавлением 0,1%-ного тритона X-100 [6, 11]. Белок определяли методом Lowry и соавт. [13].

Результаты определения величины выхода кислой РНКазы из ли-

зосом, выделенных из больших полушарий головного мозга обученных, псевдообученных и интактных крыс линии *Wistar*, приведены в табл. 1. Из таблицы видно, что ОЛФ интактных крыс (пассивный контроль) устойчивы в 0,25 М сахарозе, рН 7,4: при их инкубации (25°, 30 мин) наблюдается лишь незначительный (около 6% от всей активности фермента в суспензии ОЛФ) спонтанный выход кислой РНКазы из лизосом. При добавлении в инкубируемую суспензию ОЛФ ядерных гистонов (H_{2a} 20 мкг/мл) проницаемость лизосомных мембран для кислой РНКазы повышалась примерно на 100%. Из таблицы видно также, что спонтанный выход кислой РНКазы из лизосом у крыс, подвергав-

Таблица 1

Влияние 1-дневного обучения (80 сочетаний, 10—15 условных рефлексов) и псевдообучения на выход кислой РНКазы (1— A_{260} мкг белка, 2—в % от общей активности кислой РНКазы ОЛФ) из лизосом больших полушарий головного мозга крыс линии *Wistar* при инкубации суспензии ОЛФ в 0,25 М сахарозе с добавлением 20 мкг/мл гистона H_{2a} и без него (n=8)

Состояние животных	Активность РНКазы	Спонтанный выход в 0,25 М сахарозе I	Выход в 0,25 М сахарозе с гистонам II	Стимулируемый гистонам выход II—I
Пассивный контроль	1	0,726±0,008	1,594±0,090	0,714±0,082
	2	6,49±0,14	13,30±0,01	6,91±0,65
Активный контроль (псевдообучение)	1	1,186±0,089 $p_1 < 0,01$	1,352±0,085 $p_1 < 0,05$	0,135±0,110 $p_1 < 0,01$
	2	10,15±0,76 $p_1 < 0,001$	12,53±0,75 $p_1 < 0,05$	1,11±1,02 $p_1 < 0,01$
Обучение	1	1,002±0,099 $p_2 > 0,05$	1,366±0,085 $p_2 > 0,05$	0,350±0,125 $p_2 > 0,05$
	2	9,28±0,72 $p_2 > 0,05$	12,07±0,72 $p_2 > 0,05$	3,48±1,91 $p_2 > 0,05$

Примечание. Приведена достоверность изменений при сопоставлении рядов: p_1 —активный контроль/пассивный контроль, p_2 —обучение/псевдообучение (активный контроль).

шихся массированному обучению и псевдообучению, был выше, чем у интактных животных, а стимулирующий эффект гистона у этих животных, по сравнению с интактными, уменьшался. При этом у обученных животных, по сравнению с псевдообученными, достоверных изменений спонтанного и стимулированного гистонами выхода не обнаружено. Результаты опытов с исследованием выхода кислой РНКазы из лизосом после 4-дневного обучения крыс линии ВЛ (80 сочетаний, 30—40 УР) и линии НЛ (80 сочетаний, 1—10 УР) представлены в табл. 2. Из этих данных видно, что величина спонтанного выхода кислой РНКазы из лизосом у крыс НЛ была выше, чем у крыс ВЛ, и примерно такой же, как у псевдообученных крыс линии *Wistar*. В то же время выход кислой РНКазы из лизосом в присутствии гистона у крыс с высокой способностью к образованию УРАИ (ВЛ) был меньше, чем у крыс с низкой способностью к образованию УР (НЛ) (табл. 2, II).

Таблица 2

Влияние 4-дневного обучения (80 сочетаний) на выход кислой РНКазы из лизосом больших полушарий головного мозга крыс 2-х линий с высокой (линия ВЛ) и низкой (линия НЛ) способностью к выработке УРАИ при инкубации суспензии ОЛФ в 0,25 М сахарозе с добавлением гистона (H_{22} 20 мкг/мл) и без него. Активность РНКазы: 1— A_{260} /мг белка, 2—в % от активности РНКазы в ОЛФ ($n=5$)

Линия крыс	Активность РНКазы	Спонтанный выход в 0,25 М сахарозе I	Выход с гистонами II	Стимулируемый гистонами выход II—I
Крысы ВЛ	1	$0,861 \pm 0,028$	$1,306 \pm 0,012$	$0,445 \pm 0,019$
80 сочетаний, 30—40 условных рефлексов	2	$6,93 \pm 0,15$	$10,52 \pm 0,31$	$3,41 \pm 0,38$
Крысы НЛ	1	$1,131 \pm 0,052$ $p < 0,01$	$1,690 \pm 0,025$ $p < 0,01$	$0,561 \pm 0,115$ $p > 0,05$
80 сочетаний, 1—10 условных рефлексов	2	$9,51 \pm 0,15$ $p < 0,01$	$14,24 \pm 0,14$ $p < 0,01$	$4,74 \pm 0,11$ $p > 0,05$

При выработке условного рефлекса активного избегания в течение 4 дней, как и при массированном 1-дневном обучении, животные получали одинаковое число (80) сочетаний условного раздражителя с безусловным. При этом выявлялась различная способность к выработке условного рефлекса у крыс линий ВЛ и НЛ. Число условных рефлексов за весь период обучения у крыс линии ВЛ достигало 30—40, а у крыс линии НЛ только 1—10. Во время массированного обучения у крыс линии *Wistar* наблюдалось от 10 до 15 условных реакций. После массированного обучения и псевдообучения, а также 4-дневного обучения крыс линии НЛ отмечалось увеличение спонтанного выхода кислой РНКазы из лизосом больших полушарий при инкубации суспензии ОЛФ в 0,25 М сахарозе, которое не зависело от степени обученности крыс и было обусловлено, вероятно, воздействием стрессорных факторов, сопровождающих выработку УРАИ. Такое предположение подтверждается результатами, полученными нами при исследовании проницаемости мембраны лизосом коры головного мозга после частичного и полного лишения крыс сна. Под влиянием 6 и 48 ч лишения крыс парадоксальной фазы сна и после полного лишения сна имело место увеличение спонтанного, а также достоверное уменьшение стимулируемого гистонами H_{22} выхода кислой РНКазы по сравнению с контрольным уровнем выхода этого фермента из лизосом [14].

При рассмотрении данных, полученных при изучении влияния гистона на проницаемость мембраны лизосом обращает внимание то обстоятельство, что у животных линии ВЛ наблюдается некоторое уменьшение, по сравнению с крысами линии НЛ, чувствительности мембраны лизосом к действию гистона (табл. 2. II) и снижение стимулирующего эффекта гистона.

В заключение необходимо отметить, что ситуация псевдообусловливания, несмотря на все отличие от ситуации выработки условного реф-

лекса, в той или иной мере может включать элементы выработки условной связи [1]. Эту возможность нельзя исключить. С другой стороны, исследование анионных групп липидов и фосфатных групп белков, с которыми могут взаимодействовать гистоны, могло бы представить количественную оценку изменения состояния мембраны лизосом при обучении и псевдообучении. Известно, что обучение может сопровождаться увеличением фосфорилирования белков ионных каналов [15], что приводит к изменению проницаемости мембраны.

PERMEABILITY OF BRAIN LYSOSOMAL MEMBRANES FOR ACID RNAse IN RATS OF DIFFERENT LINES UNDER TRAINING AND PSEUDOTRAINING

NECHAEVA G. A., LOPATINA N. G.

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

Massive one-day training of animals (80 matchings 5--10 conditional reflexes of active avoidance) and pseudotraining lead to 1.5--2 fold increase in a spontaneous release of acid RNAse from big cerebral hemispheres' lysosomes, whereas histone H_{2u} -stimulated release of this enzyme from lysosomes decreases. After 4-day long elaboration of conditioned reflex (80 matchings) in rats with low ability to training the spontaneous release of acid RNAse from lysosomes was higher for 30% than in animals with high ability to training. Data obtained indicate that both functional load in training and unmatched irritations in pseudotraining induce changes in lysosomal membrane that lead to an increase in spontaneous release of acid RNAse in vitro conditions but are not coupled with the process of training per se.

ЛИТЕРАТУРА

1. Крузиков Р. И. Нейрохимические механизмы обучения и памяти, М., Наука, 1981.
2. Matthies H., Pohle W., Popov N., Lössner B., Ruthrich H. L., Jork R., Ott T.—In: Neural and neurohumoral organization of motivated behavior (ed. K. Lisak), p. 85—105. Вр: Akad. Kiado, 1978.
3. Mark R.—In: Brain mechanisms in memory and learning: From the single neuron to man (ed. M. A. B. Brazier), p. 217—225, N.-Y. Raven Press, 1979.
4. Ryser H. J. P. Proc. of the Fourth intern. Congress in Pharmacology, v. 8, p. 95, Basel, 1970.
5. Boses R., Mendez F., Mendez L., Anigsten R. Exp. Cell Res., v. 76, p. 441, 1973.
6. Нечасова Г. А., Демин Н. Н., Ашмарин И. П. Докл. АН СССР, т. 202, № 1, с. 232—234, 1972.
7. Ашмарин И. П., Гойло Т. А., Гончарова В. П., Нечасова Г. А., Степанова Н. С. Биохимия, т. 40, в. 2, с. 331—337, 1975.
8. McIlwain H. Chemical exploration of the brain, N.-Y., 1963.

9. Браун А. Д. Тез. докл. научн. конф. Институт цитологии АН СССР, с. 16, Л., 1972.
10. Демин Н. Н., Нечасова Г. А. Вопросы биохимии мозга, т. 9, с. 171—176, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1974.
11. Ашмарин И. П., Демин Н. Н., Лопатина Н. Г., Нечасова Г. А. Физиол. журн. СССР, т. 38, № 4, с. 489—494, 1977.
12. Рыжова А. Ю., Кулакин Д. А., Лопатина Н. Г. Генетика, т. 19, с. 121—125, 1983.
13. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., v. 193, № 1, p. 265—275.
14. Демин Н. Н., Нечасова Г. А. VII Всесоюзн. нейрохимическая конф., тезисы научн. сообщений, с. 100—101, Л., 1976.
15. Neary J. T., Acosta-Urquidí J., Alkon D. L. J. Neurochem., v. 44, suppl. s. 13, 1985.

Поступила 17.XII 1986

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР» ПРЕДЛАГАЕТ:

Иммунологические методы исследования (под ред. И. Лефковитса, Б. Перниса), перевод с англ., 1988, 38 л.

Книга представляет собой перевод III тома серии «Иммунологические методы». Переводы двух первых томов выпущены издательством «Мир» в 1981 и 1983 гг. В данный том вошли последние, наиболее актуальные методические разработки в области молекулярной и клеточной иммунологии.

Для иммунологов, специалистов по молекулярной биологии, цитологов, врачей, лаборантов научно-исследовательских институтов, аспирантов и студентов биологических специальностей.

Иммобилизованные клетки и ферменты (под ред. Дж. Вудворда), перевод с англ., 1988, 14 л.

Книга международного коллектива авторов (главным образом английских) представляет собой сборник современных методов, рекомендуемых для получения стабилизированных препаратов клеток и ферментов и их использования в практических целях. Подробно описаны приемы адсорбционной и ковалентной иммобилизации ферментов, иммобилизация включением в гель, комплексообразованием с металлами, микрокапсулированием, а также применение стабилизированных биологических препаратов для создания электродов и датчиков, проведения электрохимических процессов, модификации стероидов, анализа гормонов и других целей.

Для специалистов в области биотехнологии, биохимиков, химиков.



УДК 612.822 1.017.1

ОЧИСТКА И НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА
АМИНОПЕПТИДАЗЫ МИЕЛИНА

ХРУСТАЛЕВА Н. А., БАСКАЕВА Т. С., ХОХЛОВ А. П.

I Московский ордена Ленина и ордена Трудового Красного Знамени
медицинский институт им. И. М. Сеченова

Работа посвящена выделению аминопептидазы миеллина и изучению ее некоторых физико-химических характеристик.

Установлено, что аминопептидаза находится в миеллине в связанном состоянии и проявляет активность только после предварительной обработки. Активность фермента колеблется от 10 до 24 ед./мг белка.

Показано, что аминопептидаза миеллина имеет величину $M_r 62,3 \pm 3,7$ кД, оптимум рН 9,6—9,8, ИЭТ при $pI 8,92$.

Спектр ферментов миеллина до настоящего времени не выяснен и является предметом обсуждения [1]. Что касается протеолитических энзимов, то сведения о них крайне ограничены и зачастую противоречивы. Исследованиями D'Monte и соавт. [2] показано присутствие в миеллине кислых и нейтральных протеаз с низкой величиной У. А. 0,1 до 0,62 ммоль/ч на 1 г белка и аминопептидазы с У. А. 24 ммоль/ч на 1 г белка, что соответствует прежнему представлению о миеллине как инертной биологической структуре. Однако полученные в дальнейшем данные [3] о высокой скорости обновления белков миеллина (период полужизни основного белка миеллина мозга крысы составил 20—30 дней) позволили предположить присутствие в миеллине протеолитических ферментов с высокой величиной У. А.

Целью настоящей работы явилась очистка и изучение некоторых свойств обнаруженной нами высокоактивной аминопептидазы миеллина мозга.

В работе были использованы кролики породы шиншилла. После декапитации головной мозг немедленно извлекали и обрабатывали. Миелин выделяли по методу Norton, Poduslo [4] в некоторой модификации, 1,5 г ткани мозга гомогенизировали в 10 мл 0,32 М раствора сахарозы (I стадия). Гомогенат насливали в равном объеме на 0,85 М раствор сахарозы в 0,1 М трис-буфере рН 7,4 и центрифуги-

ровали в центрифуге VAC-602 на бакет-роторе 30 мин при 75000g (II стадия). Промежуточный слой, содержащий миелин, осторожно отсасывали, смешивали с 15 мл дистиллированной воды и центрифугировали 15 мин при 75000 g (III стадия). Осадок суспендировали в 8 мл дистиллированной воды и вновь насливали на 0,85 М раствор сахарозы. Пробу центрифугировали 30 мин при 75000g на бакет-роторе (IV стадия). Промежуточный слой суспендировали в 8 мл физиологического раствора и центрифугировали при 20000 g (V стадия). Осадок, суспендированный в физиологическом растворе в соотношении 1:7, использовали для выделения фермента.

Активность фермента определяли по методу Hashen, Farr [5]. Белок определяли по Lowry и соавт. [6]. Величину У. А. выражали в мкмоль гидразина, образующегося в мин/мг белка. Для выявления субстратной специфичности использовали другие субстраты L-лейцинамид [7], L-лейцин-л-нитроанилид. В последнем случае определение активности фермента проводили по методу Nagel и соавт. [8]

Гомогенность выделенного фермента и величину M_r определяли методом электрофореза в ПААГ. В качестве маркеров применяли набор стандартных белков («Pharmacia», Швеция).

Оптимальный для фермента диапазон pH выявляли с помощью 0,1 М глицинового буферного раствора (pH от 8,0 до 10,0).

Изоэлектрическую точку определяли методом изохроматофокусирования, предложенного Slyterman и соавт. [9]. В качестве ионообменной твердой фазы использовали гель PBE 118 («Pharmacia», Швеция), уравновешенный 0,025 М триэтиламинным буфером, pH 11,0. Элюцию пробы проводили фармалитом в разведении 1:45, pH 8,0—10,5. Фракцию собирали, используя коллектор Ultrarak («LKB», Швеция). Проверку образцов проводили спектроскопически, применяя проточный спектрофотометр Uvicord III («LKB», Швеция). Одновременно в пробах проводили определение активности фермента. Образцы, имеющие активность фермента, отбирали и измеряли pH при помощи прецизионного pH-метра («Orion», США) с микроэлектродами («LKB», Швеция), соответствующими их изоэлектрической точке.

Ранее в биологических жидкостях больных демиелинизирующими заболеваниями нами обнаружен протеолитический фермент миелина в комплексе с ингибитором, имеющим высокое сродство к декстранам [10]. Последнее обстоятельство значительно облегчает процесс выделения фермента. Для этого исследуемую биологическую жидкость пропускают через колонку с сефадексом G-75 и многократно промывают сорбированный фермент физиологическим раствором. Сефадекс на колонке слегка подсушивают кратковременным центрифугированием и оставляют при температуре 0—5° на 4—5 дней. За это время (видимо вследствие аутоокисления) разрушается химическая связь между ферментом и связывающим агентом и становится возможным элюирование растворами слабой ионной силы. Однако при использовании в качестве источника фермента суспензии миелина метод оказался недостаточен

эффективным (активность фермента колебалась в пределах 2—6 ед/мг белка) и вследствие этого был модифицирован.

Выделение фермента из миелина проводили следующим образом: на колонку размером $10 \times 1,5$ см с приспособлением для центрифугирования, наполненную набухшим сефадексом G-75, наносили суспензию миелина (6—8 мг белка) и центрифугировали при 700 g 1 мин. Балластные белки смывали сначала 20—25 мл физиологического раствора, затем 10 мл 3%-ного раствора формальдегида, содержимое колонки центрифугировали при 700 g 1 мин, после чего фермент элюировали 5 мл 7%-ного раствора формальдегида в 0.01 М трис-HCl буфере pH 7,4 с повторным центрифугированием в тех же условиях.

Вся процедура выделения занимала не более 1,5 ч и была проведена при комнатной температуре. Лиофилизированный препарат фермента накапливали (в течение месяца фермент терял не более 5% активности) и использовали для исследования.

Величина У. А. выделенного фермента находилась в пределах 10—24 ед/мг белка, тогда как исходная активность аминопептидазы миелина колебалась от 0,01 до 0,03 ед/мг белка.

Сравнительное исследование величины У. А. фермента на различных стадиях очистки миелина показало, что ферментативная активность не является примесью других фракций мозга. В то же время попытка выделить фермент из неочищенных гомогенатов мозга вышеописанным способом была неудачной.

Электрофоретическое исследование препарата в присутствии ДДС-Na показало, что фермент очищен до состояния, близкого к гомогенному (рисунок). Изучение его электрофоретической подвижности в сравнении со стандартными белками позволило установить M_r основной белковой полосы, равную $62,3 \pm 3,7$ кД, и минорной полосы, равную, $14,4 \pm 1,2$ кД.

Для проверки специфической активности обнаруженных фракций столбик геля извлекали из трубочек, разрезали в поперечном направлении по 2 мм и каждый кусочек элюировали 0.05 М веронал-мединаловым буфером pH 8,6, содержащим 2,5%-ный KCl, в присутствии которого ДДС-Na осаждается. Надосадочную жидкость анализировали на наличие активности. Установлено, что 95% аминопептидазной активности (субстрат лейцингидразид) обладал участок геля, соответствующий фракции с M_r $62,3 \pm 3,7$ кД и лишь 5% активности фермента было обнаружено в зоне, соответствующей M_r $14,4 \pm 1,2$ кД.

В опытах с использованием различных субстратов установлено, что очищенный фермент имеет определенную субстратную специфичность и с одинаковой скоростью гидролизует лейцингидразид, лейцинамид и совершенно не расщепляет классический ариламидазный субстрат лейцин- β -нитроанилид, который исследователи часто используют для определения протеазной активности миелина [11].

Оптимальная область pH выделенного фермента соответствует значениям 9,6—9,8, тогда как другие протеолитические ферменты миелина проявляли наибольшую активность при нейтральных значениях pH. [12].

Анализ препарата фермента методом изохроматофокусирования показал присутствие 2 белков с различными изоточками (рисунок). Точки рН изофокусирования обнаруженных пиков соответствуют рI 8,92 и рI 7,76, при этом активность фермента с изоточкой рI 8,92 в три раза превосходила активность другой фракции фермента.

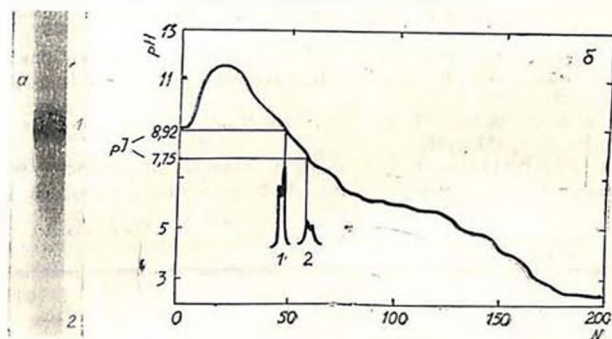


Рис. Электрофорез в ПААГ (а) и изофокусирование (б) препарата фермента, выделенного из миелина: 1—фракция с M_r 62,3 кД; 2—фракция с M_r 14,4 кД

Таким образом, в миелине ЦНС животных впервые обнаружен протеолитический фермент с высокой активностью, который обладает определенной субстратной специфичностью и имеет рН в щелочной среде с изоточкой рН 8,92.

PURIFICATION AND PROPERTIES OF AMINOPEPTIDASE FROM MYELIN

KHRYSTALYEVA N. A., BASKAEVA T. S., KHOKHLOV A. P.

I. M. Sechenov 1st Medical School, Moscow

Purification scheme and some physico-chemical properties of aminopeptidase from myelin are reported. It has been established that enzyme exists in myeline in a membrane bound form and is released only after pretreatment. The specific activity of enzyme is 10–24 U/mg of protein, M_r is $62,3 \pm 3,7$ kDa, pH optimum—9,6, pl value—8,92.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lees M. B., Sapirstein V. S. Myelin-associated enzymes Dept. Biochem. Eunice Kennedy Shriver Center Mental Retardation, Waltman. Handbook Neurochem. New-York, v. 4, p. 435–460, 1983.
2. D'Monte B., Mela P., Parks N. Eur. J. Biochem. v. 23, № 2, p. 355–365, 1971.
3. Agrawal H. C., Fujimoto K., Eurlon R. M. Trans Amer. Soc. Neurochem., v. 6, p. 127, 1975.

4. Norton W. T., Poduslo S. E. J. Neurochem., v. 21, p. 749—759, 1973.
5. Hashen R. J., Farr D. Z. Klin. Chem. and Klin. Biochem., v. 6, p. 11—12, 1968.
6. Lowry O. H., Rosengrough N. J., Farr A. L., Randal R. J. J. Biol. Chem. v. 193, p. 265—275, 1951.
7. Spackman D. H., Smith E. L., Brown D. M. J. Biol. Chem., v. 212, p. 255—269, 1955.
8. Nagel W. F., Willing F., Schmidt F. H. Klin. Wochenschrift, v. 42, p. 447, 1964.
9. Slyterman L. A. E., Wijdenes J.—In: Proc. Int. Symp. Electrofocusing and Iso-tachopheresis, (eds. B. J. Radola, D. Graesslin.), p. 463—466, de Gruyter, Berlin, 1977.
10. Хохлов А. П., Баскаева Т. С., Хрусталева Н. А. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 10, с. 430—432, 1986.
11. Rinne U. K., Riekkinen P. J. Acta neurol. scand., v. 44, p. 156—167, 1968.
12. Riekkinen P. J., Clausen J., Arstila A. U. Brain Res. v. 19, p. 213—227, 1970.

Поступила 30. VII 1987

В ИЗДАТЕЛЬСТВЕ «НАУКА»

готовится к печати в 1988 г. (II квартал) монография Тарановой Н. П. «Липиды центральной системы при повреждающих воздействиях» 12 а. л.

Настоящая работа является первой попыткой систематического изучения закономерностей повреждающего действия различных патогенных факторов на мембранные структуры ЦНС путем всестороннего исследования состава и обмена различных липидов головного и спинного мозга. Специально разработанный методический подход позволил получить новые факты, раскрывающие некоторые, ранее неизвестные стороны патогенеза поражений ЦНС при острой и хронической интоксикации фосфорорганическими соединениями, при аллергической демиелинизации и при остром лучевом поражении. Впервые показано, что при действии различных повреждающих факторов в ЦНС развиваются как специфические, так и неспецифические изменения в составе и обмене липидов. Получен экспериментальный материал, вскрывающий ряд особенностей состава и обмена липидов спинного мозга, заслуживающих дальнейшего исследования. На основе всестороннего анализа экспериментальных данных и сведений литературы впервые выдвигается и обосновывается положение о том, что в основе различных повреждений структуры и функций нервной системы лежат нарушения в составе и обмене липидных компонентов и/или глиальных мембран. В книге представлены данные, характеризующие направленность и глубину нарушений обмена различных липидов при указанных повреждениях, а также общие закономерности метаболического ответа нервной ткани на ряд повреждающих воздействий, независимо от природы патогенного фактора.

Книга представляет интерес для специалистов, работающих в области нейробиологии, невропатологии, токсикологии.



УДК 577.1:591.481:615.221

ПОВЫШЕНИЕ АНТИОКИСЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЛИПИДОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ФЕНАЗЕПАМА

(к вопросу о механизме антистрессорного действия бензодиазепинов)

МОЛОЧКИНА Е. М., ПАПИН А. А., КАИПОВА Г. Д., КОРОТКИНА Р. Н.,
БУРЛАКОВА Е. Б., КАРЕЛИН А. А.

*Институт химической физики АН СССР, Институт хирургии
им. А. В. Вишневского АМН СССР, Москва

В последнее время в клинике широко применяют отечественный транквилизатор 1,4-бензодиазепинового ряда феназепам [1]. Основной целью его назначения в предоперационном периоде хирургическим больным является обеспечение адекватного антистрессорного эффекта, то есть подавление (устранение) психоэмоционального напряжения.

Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о важной роли интенсификации перекисного окисления липидов (ПОЛ) клеточных мембран в механизме развития эмоционально-болевого и эмоционального стресса у животных и человека [2—10]. В плане изучения механизма антистрессорного действия феназепама важно установить, как влияет этот препарат на интенсивность ПОЛ в головном мозгу у животных. Постановка такой задачи является необходимой и потому, что ранее были получены данные, казалось бы, противоречащие проявляющемуся по клиническим показателям антистрессорному действию феназепама, то есть было обнаружено его прооксидантное действие в модельной системе и усиление ПОЛ в печени крыс после внутрибрюшинного введения препарата [11].

Объектом исследования были 90 самцов белых крыс со средней массой тела 200 г, содержащихся на обычном рационе вивария. Раствор феназепама готовили из сухого порошка путем солюбилизации его в 0,9%-ном растворе NaCl с помощью твина-80. Препарат вводили внутрибрюшинно в количествах 0,5 и 5,0 мг на кг массы тела животного. Крысам контрольной группы вводили 3%-ный раствор твина-80 в 0,9%-ном растворе NaCl. Одной из групп животных одновременно с феназепамом внутрибрюшинно вводили таламонал (2,0 мл/кг), содержащий 2,5 мг дроперидола и 0,05 мг фентанила. Крыс забивали через 1, 4, 6, 24, 48 и 72 ч после введения феназепама или 0,9%-ного раствора NaCl. Мозг

после этого быстро извлекали, промывали холодным 0,9%-ным раствором NaCl, измельчали в микроизмельчителе ткани. Экстракцию липидов из ткани мозга проводили смесью хлороформа и метанола по методике Кейтса [12]. Об уровне ПОЛ судили по антиокислительной активности (АОА) липидов, которую определяли на метилолеатной модели [3]. На рисунке каждая точка на кривых соответствует 2—4 определениям АОА. У каждой точки обозначены границы доверительного интервала величины Δ АОА (в % от АОА_{контр.}, $p=0,05$). Число групп контрольных животных, у которых определяли АОА липидов мозга, было 16. На рисунке заштрихована область значений Δ АОА (в %), значимо не отличающихся от 0 (в пределах $p=0,05$).

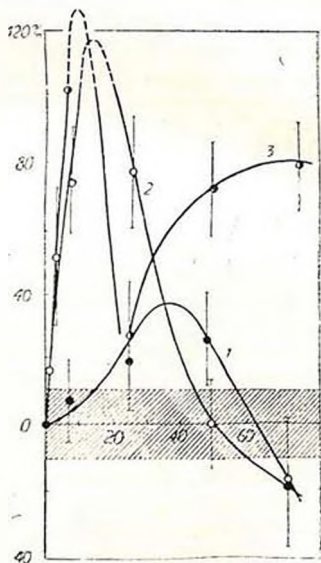


Рис. Изменение антиокислительной активности (АОА) липидов головного мозга крыс после введения феназепама. По оси абсцисс—время после внутрибрюшинного введения препаратов животным (ч); по оси ординат—изменение АОА в % $\left(\frac{\Delta \text{АОА (опыт-контр.)}}{\text{АОА}_{\text{контр.}}} \right)$ после введения 5 мг/кг (1), 0,5 мг/кг (2) феназепама и совместного введения (3) феназепама (5 мг/кг) с таламоном (2 мл/кг)

На рисунке представлены изменения АОА липидов головного мозга крыс (в % по отношению к абсолютной величине исходной АОА) после однократного введения феназепама в дозах 0,5 и 5,0 мг/кг. Видно, что феназепам существенно повышает АОА липидов мозга, то есть подавляет ПОЛ. В обоих случаях (как при высокой, так и при низкой дозах) после

введения феназепама характер кривых изменения АОА липидов аналогичен, то есть сначала отмечается подъем, затем возвращение к исходному уровню, за которым следует небольшое понижение АОА по сравнению с нормой. Выраженное и продолжительное увеличение АОА липидов головного мозга под действием феназепама позволяет предположить, что способность феназепама повышать АОА липидов мозга вносит значимый вклад в защитный антистрессорный эффект, оказываемый этим веществом на животных и человека.

Поскольку в схему премедикации хирургических больных помимо феназепама (основного компонента) входит также таламонал, представлялось важным изучить совместное влияние феназепама и таламонала на АОА липидов мозга. Кривая 3 на рисунке демонстрирует изменения АОА липидов мозга крыс после одновременного введения феназепама и таламонала. Во все сроки наблюдения АОА существенно повышена по сравнению с исходным уровнем, и намного выше (кроме срока 24 ч), чем АОА липидов при введении одного феназепама. Если понижение АОА через 72 ч после введения феназепама связано с некоторым его повреждающим действием (как это показано для гепатоцитов [11]), можно предположить, что таламонал способствует снятию этого повреждающего эффекта. Более выраженное увеличение АОА липидов мозга после совместного введения феназепама и таламонала является, на наш взгляд, обоснованием целесообразности включения последнего в комбинации с бензодиазепинами при введении их в организм с антистрессорной целью.

Возвращаясь к действию феназепама, хочется отметить тот факт, что прирост АОА при введении малой дозы феназепама существенно больше такового, вызванного высокой дозой. Этот, на первый взгляд, парадоксальный результат можно, по нашему мнению, объяснить двойственным влиянием препарата на клеточный метаболизм: с одной стороны, его проокислительным действием при включении в липиды [11], с другой — повышение АОА вследствие рецепторного связывания феназепама нервными окончаниями [13]. Учитывая, что в печени или нет бензодиазепиновых рецепторов или их очень мало по сравнению с мозгом, с этих же позиций можно объяснить и разницу в действии феназепама (5 мг/кг) на АОА липидов мозга и печени (повышение в первом и понижение [11] во втором случае). Разумеется, мы не исключаем и другие возможности объяснения описанных экспериментальных фактов.

INCREASED RAT BRAIN LIPID ANTIOXIDATIVE ACTIVITY AFTER PHENAZEPAM INJECTION

(concerning the mechanism of stressprotective action of Lenzodiazepines)

MOLOCHKINA Ye. M., PAPIN A. A., KAYIPOVA G. D., KOROTKINA R. N.,
*BURLAKOVA Ye. B., KARELIN A. A.

*Institute of Chemical Physics, USSR Academy of Sciences, Moscow
A. V. Vishnevsky Institute of Surgery, USSR Academy of Medical
Sciences, Moscow

Intraperitoneal injections of phenazepam have been found to result in a marked and prolonged increase in rat brain lipid antioxidative activity (AOA).

Since lipid peroxidation intensification (and AOA decrease) are one of the essential features of stress injuries, it is quite reasonable to believe that it is the phenazepam capacity to raise rat brain lipid AOA that contributes markedly to the stressprotective effect of the drug in human beings and animals. A more pronounced AOA increase after joint administration of phenazepam and thalamonal indicates the expediency of tandem administration of thalamonal with benzodiazepines in stress conditions.

ЛИТЕРАТУРА

1. Феназепам (под ред. А. В. Богатского). Киев, Наукова думка, 1982.
2. Бозданова Е. Д., Казан В. Е., Кулиев И. Я. и др. Иммунология, № 2, с. 65—66, 1981.
3. Бурлакова Е. Б., Алесенко А. В., Молочкина Е. М. и др. Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте. М., Наука, 1975.
4. Месерсон Ф. З., Казан В. Е., Прилипко Л. А., Рожницкая И. И. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 87, № 1, с. 404—406, 1979.
5. Прилипко Л. А. Роль процессов перекисного окисления липидов в повреждении мембранных структур мозга при стрессе и гипероксии. Автореф. докт. дисс., М., 1983.
6. Прилипко Л. А., Орлов О. М., Иванова Е. М. Докл. АН СССР, т. 265, № 4, с. 1010—1014, 1982.
7. Шведова А. А., Казан В. Е., Кулиев И. М. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 93, № 4, с. 24—26, 1982.
8. Месерсон Ф. З., Казан В. Е., Прилипко Л. А., Рожницкая И. И. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 90, № 12, с. 661—663, 1980.
9. Месерсон Ф. З., Павлова В. И., Коробейникова Э. Н. Вопр. мед. химии, т. 26, № 6, с. 827—832, 1980.
10. Молодавкин Т. Н., Пожоровский М. В. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 100, № 7, с. 36—38, 1985.
11. Молочкина Е. М., Каипова Г. Д., Короткина Р. Н., Карелин А. А., Папин А. А. Вопр. мед. химии, т. 31, № 3, с. 17—21, 1985.
12. Кейтс М. Техника липидологии. М., Мир, 1975.
13. Каипова Г. Д. Влияние модификаторов ГАМК-ергической системы на липиды клеточных мембран. Автореф. канд. дисс., М., 1986.

Поступила 23. IV 1987



ПИСЬМА В РЕДАКЦИЮ

УДК 547.95

НЕПРИМЕНИМОСТЬ ХИНУКЛИДИНИЛБЕНЗИЛАТА ДЛЯ
ЭКСПЕРИМЕНТОВ С МУСКАРИНОВЫМ РЕЦЕПТОРОМ В
РАВНОВЕСНЫХ УСЛОВИЯХ

ЭЛЛЕР М. Х., КЫИВ А. Х., ЛАНГЕЛ Ю. А., РИНКЕН А. А.

Тартуский государственный университет

Исследованием равновесного связывания нерадиоактивного и меченного тритием препарата хинуклидинилбензилата с мембранным мускариновым холинорецептором коры больших полушарий мозга крыс (25° , $0,05$ М фосфатный буфер, pH 7,4) показано, что истинная величина K_d рецептор-лигандного комплекса так мала, что не может быть точно определена обыкновенными методами радиолигандного анализа. Получаемые же этим методом зависимости специфического связывания от концентрации лиганда являются, по существу, кривыми титрования рецептора, что объясняет зависимость определяемых по этим данным величин K_d от концентрации рецептора в реакционной системе. Сделан вывод, что [^3H]хинуклидинилбензилат не может быть применен в качестве радиоактивного лиганда при исследовании взаимодействия нерадиоактивных лигандов с мускариновым рецептором в равновесных условиях.

Биохимическое исследование мускаринового холинорецептора центральной и периферической нервной системы стало возможным в связи с появлением специфических радиоактивных лигандов, позволяющих определить низкие концентрации этого белка. Одним из первых среди таких веществ был хинуклидинилбензилат [1], который остался до настоящего времени наиболее широко применимым мускариновым лигандом. Это объясняется высокой эффективностью связывания [^3H]хинуклидинилбензилата с рецептором, что обеспечивает низкий уровень неспецифического связывания [1]. Немаловажное значение имеет также коммерческая доступность меченного тритием до высокой удельной радиоактивности препаратов этого вещества [2].

Обратимость связывания [^3H]хинуклидинилбензилата с мускариновым рецептором подтверждается вытеснением этого радиоактивного лиганда из комплекса избытком других мускариновых лигандов [1, 3, 4]. Кроме того, экспериментальные данные по связыванию [^3H]хинуклидинилбензилата описываются, как правило, уравнением изотермы связывания для одноцентровой модели рецептора. Тем не менее, полученные из этих кривых связывания лиганда значения K_d рецептор-лигандного комплекса оказались неодинаковыми. Так, например, для мускари-

нового рецептора мозга крыс были получены значения K_d в интервале от $9,1 \cdot 10^{-12}$ М [5] до $5,7 \cdot 10^{-10}$ М [6], хотя эксперименты в этих работах проводились в близких условиях. Кроме того, кажущиеся величины K_d в значительной степени зависят от концентрации рецепторного белка в реакционной смеси [7, 8], что невозможно объяснить, исходя из простых равновесных схем связывания. Все это заставляло нас вновь обратиться к вопросу определения «истинной» K_d комплекса хинуклидинилбензилата с мускариновым рецептором. С этой целью нами применены подходы с определением в условиях равновесного комплексобразования как свободного рецептора, так и рецептор-лигандного комплекса.

Материалы и методы

Мембранный препарат мускаринового холинорецептора коры больших полушарий мозга крыс в 0,05 М K^+ -фосфатном буфере (рН 7,4) получен, как описано раньше [9]. В качестве радиолганда использовали препарат L-[3H] хинуклидинилбензилата («Amersham», Англия) с удельной радиоактивностью 38 Ки/ммоль. D, L-хинуклидинилбензилат был синтезирован в лаборатории проф. Н. Н. Годовикова (Институт элементоорганических соединений АН СССР) и любезно был предоставлен для проведения измерений. Концентрацию активного компонента в растворах этого препарата рассчитывали из навески, учитывая, что в условиях изучения его связывания с холинорецептором активным является только один из изомеров в рацемической смеси [10, 11].

Определение рецептора по связыванию радиоактивного лиганда проводили методом фильтрации проб на стекловолокнистых фильтрах GF/B («Whatman», Англия). Используемые реактивы, методика обработки фильтров и измерения связанной с ними радиоактивности описаны раньше [9].

Хинуклидинилбензилат инкубировали с мембранным препаратом рецептора в зависимости от условий опыта от 3 до 24 ч (25°). Отдельно было показано, что этого достаточно для завершения реакции комплексобразования при всех использованных концентрациях рецептора и лиганда. В течение этого времени спонтанной инактивацией рецептора можно пренебречь [9].

Специфическое связывание L-[3H] хинуклидинилбензилата с мембранными препаратами холинорецептора определяли по разнице общего и неспецифического связывания лиганда. Последнюю величину определяли в присутствии 10 мкМ атропинсульфата («Merck», ФРГ); она не превышала 3% от общего связывания в использованном интервале концентрации L-[3H] хинуклидинилбензилата.

Радиохимическую чистоту препарата L-[3H] хинуклидинилбензилата определяли методом ТСХ на пластинках «Силуфол» (ЧССР), используя в качестве элюента смесь хлороформ-метанол-вода (10:7:1). В пике с $R_f=0,33$, соответствующей L-[3H] хинуклидинилбензилату, оказалось $85 \pm 2\%$ радиоактивности (среднее из 3-х определений).

Концентрацию L-[^3H] хинуклидинилбензилата определяли также титрованием мембранным препаратом рецептора. Количество рецепторных участков в мембранных препаратах было определено по специфическому связыванию большого избытка (10 нМ) L-[^3H] хинуклидинилбензилата.

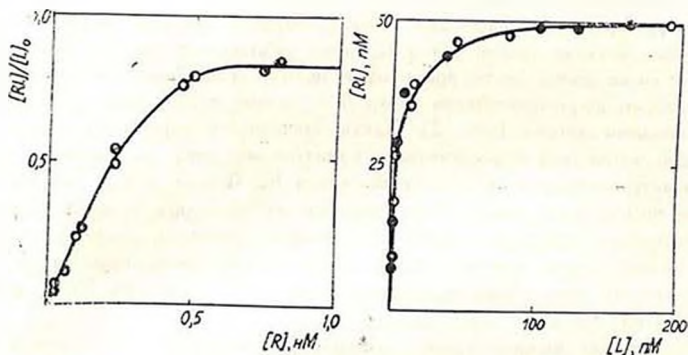


Рис. 1. Титрование препарата L-[^3H] хинуклидинилбензилата мускариновым рецептором в 0,05 М фосфатном буфере pH 7,4, 25°. Приведены средние значения трех определений

Рис. 2. Специфическое связывание препаратов L-[^3H] хинуклидинилбензилата (○) и D, L-[^3H] хинуклидинилбензилата (●) с мембранами мозга крысы в 0,05 М фосфатном буфере, pH 7,4, 25° в зависимости от концентрации L-изомера свободного лиганда. Приведены средние значения трех определений

Проводя затем реакцию комплексообразования при разных концентрациях рецептора и одинаковой концентрации радиолиганда (0,29 нМ), было найдено, что максимальное количество образующегося комплекса соответствует $84 \pm 4\%$ радиоактивного лиганда в реакционной среде (рис. 1). Полученное этим методом содержание активного вещества в препарате L-[^3H] хинуклидинилбензилата хорошо совпадает с данными хроматографического анализа.

Результаты и обсуждение

Зависимости концентрации рецептор-лигандного комплекса от концентрации свободного лиганда для хинуклидинилбензилата были получены двумя разными методами.

В первом случае определяли непосредственно специфическое связывание радиоактивного лиганда с мембранами (рис. 2). При этом была учтена концентрация активного лиганда в препарате, найденная методом ТСХ или титрования рецептором.

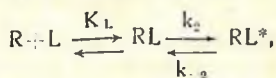
В случае нерадиоактивного лиганда определяли количество свободного рецептора после завершения реакции связывания, используя

10-кратный избыток радиоактивного лиганда (1.5 нМ). Применение такой методики возможно в связи с низкой скоростью диссоциации комплекса хинуклидинилбензилата с мускариновым рецептором [3]. Рассчитанная по результатам этих опытов зависимость концентрации RL-комплекса от концентрации свободного L-изомера лиганда в растворе также показана на рис. 2.

Данные, полученные для обоих препаратов хинуклидинилбензилата, свидетельствуют о том, что в условиях избытка рецептора в реакционной смеси имеет место практически полное связывание лиганда с рецептором до эквивалентной точки и в системе практически отсутствует свободный лиганд (рис. 2). Такая зависимость характерна для случаев, когда рецептор-лигандный комплекс является необратимым или характеризуется очень низким значением K_d . Факты о том, что хинуклидинилбензилат может быть вытеснен из комплекса с мускариновым рецептором избытком других мускариновых лигандов, свидетельствуют в пользу второй возможности. При этом данные, приведенные на рис. 2, позволяют дать только приблизительную оценку величины K_d в пределах 1 пМ или ниже.

Так как нижний предел концентрации рецептора, определяемый в опытах связывания радиоактивных веществ, зависит от удельной радиоактивности этих лигандов, можно заключить, что точную величину K_d невозможно определить коммерчески доступными препаратами L-[3H] хинуклидинилбензилата. Приведенные в то же время в литературе значения K_d не имеют присваиваемого им физического содержания, поскольку вместо кривой равновесного связывания хинуклидинилбензилата, очевидно, получают кривую «титрования» активных центров рецептора. В таком случае обнаруженная в нескольких работах зависимость K_d от концентрации рецепторного белка в реакционной среде [7, 8] приобретает конкретное содержание. Кроме того, можно понять, что тенденция понижения приведенных в литературе значений K_d по мере увеличения У.А. используемого препарата L-[3H] хинуклидинилбензилата определяется возможностью проведения экспериментов при более низкой концентрации рецептора.

Показано, что при низких и умеренных концентрациях хинуклидинилбензилата кинетику реакции образования комплекса с рецептором описывает двухстадийная реакционная схема [12]:



в которой за быстрым наступлением равновесия следует медленная стадия изомеризации комплекса RL в RL^* . Так как экспериментальному определению поддаются значения K_L , k_2 и k_{-2} , по этим величинам можно вычислить константу диссоциации K_d [12]:

$$K_d = K_L \cdot \frac{k_{-2}}{k_2}$$

Используя приведенные в работе Силларда и соавт. [3] результаты кинетического анализа ($K_L=1.3$ нМ, $k_{-2}=2 \cdot 10^{-3}$ с $^{-1}$, $k_2=1,2 \cdot 10^{-2}$ с $^{-1}$), получим $K_d=2,1$ нМ. Эта величина значительно ниже всех предложенных до сих пор значений K_d и согласуется с вышеприведенными представлениями об исключительно эффективном связывании хинуклидинилбензилата с мускариновым рецептором.

Таким образом, можно говорить о двух факторах, определяющих кажущуюся необратимость связывания хинуклидинилбензилата с мускариновым рецептором. Во-первых, этот комплекс характеризуется исключительно низкой K_d , вероятно, в пределах 1—2 нМ или ниже. Во-вторых, этот комплекс диссоциирует медленно, с временем полупревращения при 25° до 10 ч [3, 4], что уже сравнимо с временем полупревращения для процесса спонтанной инактивации свободного рецептора [9]. Оба эти фактора делают хинуклидинилбензилат удобным лигандом для определения концентрации рецепторных участков, но практически непригодным для проведения измерений в равновесных условиях. Этот вывод относится прежде всего к результатам определения K_d для нерадиоактивных агонистов и антагонистов методом вытеснения, хотя основная масса обсуждаемых в литературе данных по мускариновым лигандам получена именно таким путем.

QUINUCLIDINYL BENZILATE CAN'T BE USED AS A LIGAND IN EQUILIBRIUM BINDING STUDIES WITH MUSCARINIC RECEPTOR

ELLER M. H., KOIV A. H., LANGE U. L., RINKEN A. A.,
TAHEPOLD L. J., JARV J. L.

State University, Tartu

The binding of tritium-labelled and unlabelled quinuclidinyl benzilate to the muscarinic receptor of rat brain membranes (25°C; 0,05 M Na, K-phosphate buffer, pH 7,4) has been studied. It has been found that the real dissociation constant (K_d) of the receptor-ligand complex is very small and cannot be determined by the usual method of equilibrium radioligand analysis. For this reason the experimentally obtained dependences of the specific binding of the ligand upon its concentration are, in fact, the titration curves of the receptor. Taking them for the equilibrium binding curves one can observe dependences between the artificial K_d -value and the receptor concentration. A conclusion is made that [3 H]-quinuclidinyl benzilate cannot be used in equilibrium binding studies to get meaningful binding data for unlabelled ligands.

1. Yamamura H. I., Snyder S. H. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Biol. Sci., v. 71, p. 1725—1729, 1974.
1. Research products 1985/86, Amersham, London: Amersham International plc., p. 159, 1985.
3. Силлард Р. Г., Яра Я. А., Бартфай Т. Биологические мембраны, т. 3, с. 426—432, 1985.
4. Luthin G. R., Wolfe B. B. Mol. Pharmacol., v. 26, p. 164—169, 1984.
5. Hruska R. E., Ludmer L. M., Pert A., Bunney W. E. Jr., J. Neurosci. Res., v. 11, p. 171—177, 1984.
6. Moingeon Ph., Bidart J. M., Alberici G. F., Boudene C., Bohuon C. Toxicology, v. 31, p. 135—142, 1984.
7. Hedlund B., Bartfai T. Mol. Pharmacol., v. 15, p. 531—544, 1979.
8. Ludford J. M., Talamo B. R. J. Biol. Chem., v. 255, p. 4619—4627, 1980.
9. Лангел Ю. А., Ринкен А. А., Тягелыцкая Л. Я., Яра Я. А. Нейрохимия, т. 1, с. 343—351, 1982.
10. Gaginella T. S., Rimele T. J., O'Dorisio T. M., Dorff R. J. Life Sci., v. 26, p. 1599—1608, 1980.
11. Rimele T. J., O'Dorisio M. S., Gaginella T. S. J. Pharmacol. Exp. Ther., v. 218, p. 426—434, 1981.
12. Jarv J., Hedlund B., Bartfai T. J. Biol. Chem., v. 254, p. 5595—5598, 1979.

Поступила 11. VIII 1986

Психофармакология человека. т. Критерии и методы.

Human Psychopharmacology, v. 1. Measures and Methods (Eds. I. Hindmarch, P. D. Stonier), I. Wiley and Sons, Ltd., Baffins Lane, England, 256 p. 1987.

В книге обсуждаются проблемы использования и развития тест-систем, ключевых направлений исследований, практических вопросов экспериментов на человеке, применения экспериментальных достижений в терапии, соотношения между риском и пользой и принятия соответствующих критериев эффективности и безопасности современных психофармацевтических препаратов.

Авторами отдельных глав являются проф. M. Hamilton, A. G. P. Sims, D. M. Warburton (Великобритания), проф. S. R. Wittenborn (США), д-р R. Pinder (Голландия) и др.

Книга предназначена для психофармакологов, психиатров, неврологов, клинических фармакологов, исследователей-психологов.



ОБЗОРЫ

УДК 615.322:547.447.5

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ НЕЙРОМЕДИАТОРНЫХ
ЭФФЕКТОВ АЦЕТИЛХОЛИНА

ДОЛГО-САБУРОВ В. Б.

Институт токсикологии МЗ СССР, Ленинград

В обзоре приведены современные представления о молекулярных механизмах сопряжения мускариночувствительных холинорецепторов (м-ХР) с биохимическими системами эффекторных клеток. Обсуждена проблема гетерогенности м-ХР и связи их подтипов с циклическими и фосфоинозитидной системами генерации вторичных мессенджеров. Подробно рассмотрена роль GTP-связывающих белков (N-белки) в регуляции сродства м-ХР к холинэргическим лигандам и образования вторичных мессенджеров — циклических нуклеотидов, диацилглицерина и инозитолфосфатов.

Представления Langley [1, 2] о химической передаче нервного импульса явились выдающимся вкладом в развитие концепции регуляторно-трофической функции нервной системы. Постулированная им гипотеза о существовании на поверхности эффекторной клетки «рецептивной субстанции» и секретируемого нервными окончаниями специфического сигнального вещества послужила основой для последующего создания весьма плодотворной теории, объясняющей физиологические эффекты нейромедиаторов.

Следующим чрезвычайно важным шагом на пути, ведущем к пониманию механизмов воздействия нервной импульсации на эффекторные системы, явились исследования Dale [3], обнаружившего сходство эффектов стимуляции парасимпатических нервов с действием эфиров холина и мускарина, а затем и Loewi [4], который продемонстрировал медиаторную роль АХ.

К настоящему времени оказались достаточно хорошо изученными характер взаимодействия АХ с мускарино- и никотиночувствительными холинорецепторами, структура их активной поверхности, локализация в ЦНС и периферических органах. Подробно исследованы особенности метаболизма АХ, его энзимология, связь с передачей нервного импульса и физиологическими эффектами. Однако, если вклад АХ в регуляторные механизмы парасимпатического отдела вегетативной нервной системы в целом достаточно ясен, то события, разыгрывающиеся в процессе взаимодействия этого нейромедиатора с активной поверхностью

соответствующего рецептора. регуляция этого взаимодействия и его связь с системами, определяющими физиологический статус эффекторной клетки, требуют дальнейшего углубленного анализа.

Существенный прогресс в изучении холинорецепторов, в частности м-ХР, являющихся основным объектом нашего рассмотрения, был достигнут в 60—70 годы как результат разработки метода радиолигандного анализа, позволившего охарактеризовать кинетику взаимодействия с ними специфических агентов, меченных радиоактивными изотопами. С помощью этого подхода была получена информация о локализации м-ХР в отделах мозга и внутренних органах, о характере связывания с ними агонистов и антагонистов и влиянии на эти процессы различных по структуре и фармакологической активности лигандов [5—9].

Обращает на себя внимание то обстоятельство, что полученные с помощью радиолигандного анализа результаты, отражающие содержание м-ХР в определенных органах и их сродство к холинолитикам и холиномиметикам, наиболее четко согласуются с данными, полученными в физиологических экспериментах, в том случае, когда оценивалось связывание с м-ХР меченых антагонистов или их конкурентное вытеснение из комплекса с рецептором немечеными агонистами. Что же касается связывания с м-ХР *in vitro* меченых агонистов, то получаемая таким образом информация не полностью согласуется с тем, что удается наблюдать в экспериментах *in vivo*. Если взаимодействие антагонистов с м-ХР, оцениваемое с применением различных вариантов радиолигандного анализа, характеризуется относительной «кинетической простотой», то в случае агонистов оно не может быть корректно описано только лишь с помощью константы сродства одного типа. Сложность процесса связывания агонистов с м-ХР находит отражение в значительном многообразии взаимоотношений, выраженных в координатах доза—эффект, регистрируемых биохимическими и традиционными физиологическими методами на одном и том же биообъекте и представляющих собой спектр ответов эффекторной клетки на холинергическое возбуждение [10—12].

Изложенные факты и соображения послужили основанием гипотезы о существовании гетерогенных подтипов м-ХР, различающихся по сродству к лигандам и, вероятно, по вкладу в холинергическую регуляцию физиологических функций. В 70-е годы в связи с появлением широкого спектра новых и оригинальных по структуре соединений холинолитического и холиномиметического типов действия концепция гетерогенности м-ХР обогатилась новыми представлениями [13—16]. В настоящее время рассматриваются по крайней мере три возможных предположения неоднородности м-ХР:

1. Непосредственно взаимодействующий с нейромедиатором участок присутствует во всех типах м-ХР, однако различия в мембранном окружении обуславливают особенности связывания с ним холинергических лигандов.

2. Неоднородность обусловлена особенностями структуры отдельных типов м-ХР (различия в первичной структуре рецепторного белка и его посттрансляционной модификации и др.).

3. Гетерогенность м-ХР определяется связью с различными эффекторными биохимическими системами.

В последнее время показана возможность существования подтипов м-ХР в растворе детергентов (дигитонин, холат) после экстракции из клеточных мембран миокарда [17] и мозга [18] свиньи, коры больших полушарий мозга крысы [19] и кролика [20]. При этом изолированные рецепторные комплексы сохраняли, в целом, свойственные им особенности взаимодействия с лигандами. Это убедительно свидетельствует о том, что гетерогенность м-ХР не обусловлена исключительно влиянием мембранного окружения или иных факторов, а отражает реальность существования их подтипов. В пользу справедливости этих представлений свидетельствуют полученные в опытах *in vivo* и *in vitro* данные о том, что необратимый блокатор м-ХР N-этоксикарбонил-2-этокси-1, 1-дигидрохинолин (ЭДХ) преимущественно связывался с м₁-подтипом ХР мозга крысы [21, 22]. В связи с тем, что существенную роль в необратимом холиноблокирующем эффекте ЭДХ играет активация пептидных карбоксильных групп с образованием смешанного карбангидрола, способного к взаимодействию с прилегающими α-аминогруппами, избирательность по отношению к определенному подтипу м-ХР связана, по-видимому, с большей доступностью карбоксильных групп этого рецепторного белка. Не исключено также, что доступность некоторых нуклеофильных радикалов, способных к взаимодействию с активированными этим реагентом карбоксильными группами, у гетерогенных подтипов м-ХР различна. Так или иначе, эти данные вносят важный вклад в представление о существовании подтипов м-ХР как индивидуальных структур.

Принципиально важные данные относительно гетерогенности м-ХР были получены в экспериментах с использованием [³H]пирензепина — трициклического холинолитика, обладающего существенно большим сродством к м-ХР различных отделов мозга (кора больших полушарий, полосатое тело, гиппокамп), чем к м-ХР миокарда и гладких мышц [23—25]. Было обнаружено, что этот нетрадиционный лиганд связывается с высоким сродством с м₁-подтипом ХР (по терминологии Наттег и соавт. [23]), выявленных с помощью принятого метода связывания [³H] (—)-хиноклидинилбензилата. Существенно менее эффективно пирензепин взаимодействует с м-ХР, преобладающими в миокарде, мозжечке, подвздошной кишке и относимым к м₂-подтипу [24—26].

С использованием меченых лигандов, [³H] пирензепина, [³H] оксетреморина и [³H] (—)-хиноклидинилбензилата методом автордиографии в светооптическом варианте обнаружены существенные различия в локализации различных подтипов м-ХР в структурах мозга лабораторных животных. Так, у крыс м₁-ХР присутствуют главным образом в телэнцефалических образованиях (I и II слои коры больших полушарий), зубчатой извилине, базолатеральных ядрах миндалины и обонятельном бугорке, а м₂-ХР преобладают в холинергических ядрах ствола мозга, гипоталамуса, ядрах переднего мозга, III и V слоях коры больших полушарий [27—30]. В ходе постнатального развития соотношение

m_1 - и m_2 -ХР в отделах мозга определенным образом изменяется [31]. При исследовании локализации различных типов м-ХР в мозгу человека (секционный материал) было обнаружено присутствие m_1 -ХР в базальных ганглиях, гиппокампе, миндалевом и черной субстанции, а m_2 -ХР—в стволе мозга, мозжечке и зрительном бугре. В коре больших полушарий и гипоталамусе содержание обоих подтипов м-ХР было практически одинаковым. При ряде заболеваний ЦНС (паркинсонизм, болезнь Альцгеймера) соотношение подтипов м-ХР оставалось неизменным [32].

Разработка представлений о гетерогенности м-ХР явилась важным шагом на пути изучения механизмов нейромедиаторных эффектов АХ. Существенный вклад в понимание процессов взаимодействия АХ с м-ХР и их регуляции вносят представления о сопряжении рецепторных структур плазматических мембран с GTP-связывающими белками (G- или N-белки), во многом определяющими как характер взаимодействия лигандов с соответствующими рецепторами, так и с эффекторными системами клетки-мишени [33, 34]. Уместно кратко напомнить (более подробно этот вопрос будет рассмотрен далее), что N-белки играют чрезвычайно важную роль в реализации связи между рецепторами и биохимическими механизмами клетки и, будучи сопряженными с циклазами и фосфатидилинозитолфосфодиэстеразой (фосфолипаза C), преобразуют гормональные и нейромедиаторные сигналы. Функционируя в неразрывном единстве с гуаниловыми нуклеотидами, эти белки играют в клетке роль принципиально важной модулирующей системы—интегрального компонента механизма восприятия рецептором поступающей информации [35—40].

В середине 70-х годов в трех различных лабораториях практически независимо было продемонстрировано, что GTP или его негидролиземый GTPазой аналог Gpp(NH)p заметно снижают сродство м-ХР предсердия крысы к карбахолину, но не влияют на его взаимодействие с атропином [41—43]. Концентрация GTP и его аналога, при которой удавалось наблюдать полумаксимальный эффект ингибирования связывания агониста с м-ХР, составляла 200 и 5 мкМ соответственно. Обращает на себя внимание, что ионы 2-валентных металлов, главным образом Mn^{2+} и Co^{2+} , влияют на связывание холинергических агонистов противоположно тому, как это имеет место в присутствии GTP или его аналогов. По-видимому, взаимодействие АХ с м-ХР находится под двойным контролем—ионов металлов и GTP [44], возможность которого обусловлена существованием в м-ХР специализированных участков связывания этих лигандов.

Эффектам гуаниловых нуклеотидов свойственна достаточно выраженная тканевая специфичность. Так, максимальное торможение связывания $[^3H]AX$ с м-ХР коры больших полушарий, ствола мозга и миокарда крыс составляло в присутствии Gpp(NH)p 32, 67 и 90% соответственно [45]. В равной мере это относится и к действию ионов металлов—в концентрации 2 мМ Ni^{2+} , Co^{2+} и Mn^{2+} в среднем вдвое уве-

личивали связывание [^3H]АХ с мембранными препаратами гиппокампа, коры и полосатого тела и минимально влияли на его взаимодействие с м-ХР гипоталамуса, ствола мозга, мозжечка и предсердия [45, 46].

Проведенные в последние годы исследования свидетельствуют о том, что роль гуаниловых нуклеотидов, по-видимому, не ограничена влиянием на связывание агонистов, и их вклад в функционирование м-ХР более сложен. Удалось, в частности, показать, что в присутствии $\text{Gpp}(\text{HN})\text{p}$ происходит не только торможение связывания оксотреморина с м-ХР миокарда, но и усиление связывания холинблокатора [^3H] (—)-хишуклидинилбензилата [47]. Предполагается, что реципрокность эффектов гуаниловых нуклеотидов отражает гетерогенность м-ХР, различающихся средством к холинергическим лигандам и находящихся в состоянии равновесия. Роль же гуаниловых нуклеотидов сводится к переводу м-ХР с высоким средством к агонистам в форму, отличающуюся низким средством к ним [46].

Зависимость процесса взаимодействия АХ с м-ХР от гуаниловых нуклеотидов наиболее выражена в тканях, обогащенных высокоаффинными участками связывания (ствол мозга, мозжечок). Характерно, что торможение связывания АХ в присутствии этих агентов сопровождается минимальными изменениями величины равновесной константы K_d , отражающей средство м-ХР к лиганду [45]. Это хорошо согласуется с ранее обнаруженными фактами, полученными при анализе кривых, отражающих конкурентное взаимодействие [^3H] антагониста с меченым агонистом на активной поверхности м-ХР в присутствии гуаниловых нуклеотидов или без них [48, 49].

Таким образом, следует считать, что м-ХР, выявляемые в различных мембранных препаратах по связыванию [^3H]АХ, могут быть разделены на GTP-чувствительные и GTP-нечувствительные, первые из которых относятся к м-ХР, обратимо сопряженным с N-белками [45, 50].

Механизмы обратимого перехода высокоаффинных форм м-ХР в низкоаффинные, индуцируемого гуаниловыми нуклеотидами, остаются в значительной мере неясными. В настоящее время обсуждается роль тиолодисульфидных переходов в этих процессах. Так, обнаружена возможность превращения низкоаффинных м-ХР в нечувствительные к гуаниловым нуклеотидам высокоаффинные формы обработкой фракции мембран коры больших полушарий или ствола мозга Cu^{2+} , модифицирующими тиоловые группы [51] рецепторного белка или сопряженных с ним N-белков. Не исключено также, что существующие различия в эффектах гуаниловых нуклеотидов в отношении м-ХР различной локализации (например, величина I_{50} для ингибирования связывания АХ колеблется от 0,3 мкМ для м-ХР миокарда до 1—6 мкМ—для м-ХР различных областей мозга [45]) обусловлены гетерогенностью N-белков. В частности, G-нуклеотидсвязывающие белки м-ХР миокарда по ряду характеристик отличаются от N-белков группы G_0 , сопряженных с м-ХР мозга [52].

Совершенно очевидно, что взаимодействие АХ с м-ХР является лишь первым звеном в цепи событий, ведущих к изменению функционального состояния органа в ответ на нервный импульс. Большой интерес вызывает анализ механизмов, сопрягающих м-ХР с исполнительными биохимическими системами клетки-мишени. На рисунке приведена схема, отражающая современный уровень представлений о последовательности и взаимосвязи молекулярных процессов, инициируемых возбуждением м-ХР. Vicroy и соавт. [53], по-видимому, одними из первых обобщив имеющиеся собственные и литературные материалы, пришли к заключению, что м₁-ХР, локализованные преимущественно в головном мозгу и ганглиях и характеризующиеся высоким сродством к пирензепину и холиномиметикам McN-A-343 (4-[м-хлорфенилкарбамил]оксипи-2-бутилпириметиламмоний хлорид) и AHR-602, опосредуют гидролиз фосфолипазой С фосфоинозитидов («фосфоинозитидный ответ») и последующую мобилизацию Ca^{2+} . В то же время м₂-ХР, характеризующиеся низким сродством к пирензепину и локализованные главным образом в миокарде и гладкой мускулатуре кишечника, сопряжены со стимуляцией гуанилатциклазы и ингибированием аденилатциклазы.

По современным представлениям, стимуляцию ферментативного распада мембранных фосфатидилинозитолфосфатов с накоплением «вторичных мессенджеров» — инозитолтрифосфатов и диацилглицерина и последующим освобождением Ca^{2+} из внутриклеточных депо [54—59], а также изменения метаболизма циклических нуклеотидов [60—62] следует рассматривать как решающие для регуляции обмена веществ клетки биохимические события, обусловленные активацией м-ХР (рис.). Сложность и многостадийность процессов, возникающих при возбуждении м-ХР, объясняют более медленное развитие физиологического ответа, чем при стимуляции никотиночувствительных ХР [63, 64].

Удобной моделью для анализа механизмов сопряжения м-ХР с исполнительными системами является сердечная мышца. При взаимодействии АХ и других холинергических агонистов с м-ХР миокарда удается наблюдать накопление сGMP, снижение образования сAMP и распад фосфоинозитидов. Инкубация переживающих срезов сердца мыши в присутствии карбамилхолина вызывала резкое увеличение накопления инозитол-1-фосфата (по методическим причинам наиболее часто определяемого в качестве индикатора «фосфоинозитидного ответа» инозитолфосфата), предотвращаемое атропином [65, 66]. Аналогичные данные были получены на миокардиоцитах куриного эмбриона и фрагментах окологлоточной слюнной железы мыши. Обращает внимание то обстоятельство, что холиномиметики стимулировали распад фосфоинозитидов значительно медленнее, чем сопутствующее торможение синтеза сAMP, стимулированного изопротеренолом. Представляется важным, что значения ED_{50} для ингибирования стимулированного адреномиметиком синтеза сAMP и для накопления инозитолфосфатов различались в сред-

чем на 2 порядка, составляя 0,2 и 20 мкМ соответственно. По-видимому, обе эти реакции отражают оккупацию м-ХР, но не находятся в причинно-следственных отношениях.

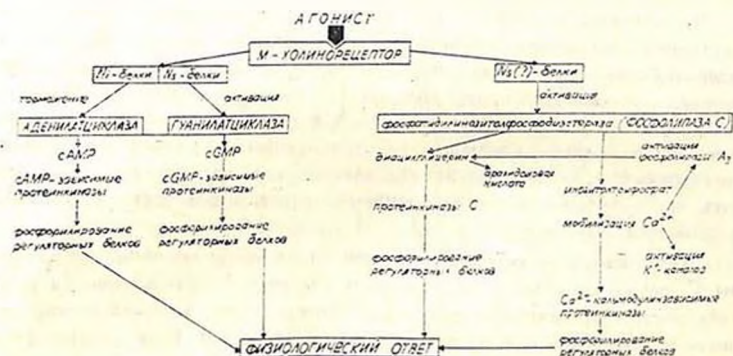


Рис. Основные пути реализации возбуждения м-ХР

Существенным следствием образования инозитолфосфатов, вызванного активацией м-ХР, служит накопление внутриклеточного Ca^{2+} (наиболее значимым в этом отношении является инозитол-1, 4, 5-трифосфат). Возникающие при этом сдвиги функционального состояния клетки имеют в основе не только активацию Ca^{2+} -кальмодулинзависимых протеинкиназ (рис.), но также и активацию K^{+} -каналов с последующим развитием гиперполяризации [67]. Мобилизация Ca^{2+} приводит кроме того и к повышению активности фосфолипазы A_2 , ведущей к освобождению арахидоновой кислоты из диацилглицерина (рис.) и появлению биологически активных продуктов ее метаболизма в циклооксигеназной и липоксигеназной системах [68, 59], однако эта проблема является предметом специального рассмотрения.

Вполне закономерен вопрос, существуют ли особенности в сопряжении отдельных типов м-ХР с «фосфоинозитидным ответом» и циклазными системами—основными генераторами «вторичных мессенджеров»? В экспериментах на миокардиоцитах куриного эмбриона было обнаружено, что карбамилхолин и окситренин равноэффективно ингибировали образование сАМР, но только первый из них вызывал распад фосфоинозитидов в сопоставимых концентрациях. Интересно отметить, что при конкурентном вытеснении $[^3\text{H}](\text{—})$ -хиноклидинилбензилата карбамилхолином в интактных клетках выявлялось 2 участка связывания лиганда—с высоким и низким сродством, в то время как окситренином удавалось продемонстрировать наличие только лишь участков с высоким сродством [69]. Эти факты позволили предположить существование особенностей связи выявляемых подтипов м-ХР с системами обмена фосфоинозитидов и сАМР. Близкие по смыслу результаты были получены при изучении влияния холинэргических агонистов на м-ХР синап-

тосом [70], подтверждающие существование высокоаффинного участка связывания, сопряженного с торможением аденилатциклазы, и низкоаффинного—с гидролизом фосфоинозитидов.

Чрезвычайно важный вклад в реализацию взаимодействия м-ХР с системами генерации «вторичных мессенджеров» вносят GTP-связывающие белки, участие которых в функционировании рецепторных механизмов обсуждено в ряде обзоров [71, 72]. О роли этих белков в реализации эффектов возбуждения м-ХР свидетельствует, в частности, способность токсина коклюша, катализирующего ADP-рибозилирование ингибиторного N_1 -белка аденилатциклазной системы миокарда, блокировать кардиотропное действие холиномиметиков и препятствовать торможению ими этого фермента [73—75].

В трансинаптической регуляции аденилатциклазы и фосфолипазы С, осуществляемой с неизменным участием N-белков, удается отметить достаточно много общих черт. Прежде всего, взаимодействие агониста с рецептором сопровождается диссоциацией этих регуляторных белков на функционально и структурно гетерогенные субъединицы, протекающей при участии GTP. В том случае, когда м-ХР сопряжен с аденилатциклазой, по-видимому, взаимодействие её каталитического участка с соответствующей субъединицей N_1 -белка приводит к торможению фермента. Однако уместно напомнить, что на некоторых линиях астроцитомы удалось показать, что определенное значение для снижения накопления cAMP после стимуляции м-ХР агонистами имеет сопутствующая активация фосфодиэстеразы cAMP [76]. Вклад определенного типа N-белков (по-видимому, N_2 -белка) показан также и для системы регуляции активности фосфолипазы С с участием м-ХР, но до сих пор они охарактеризованы недостаточно полно [77, 78]. Ясно лишь, что N_2 -белки, сопряженные со стимуляцией гуанилатциклазы, и N_1 -белки (рис.), вызывающие активацию фосфолипазы С, не идентичны. Важно еще раз подчеркнуть, что во всех случаях активация м-ХР приводит к GTP-зависимой диссоциации N-белков на субъединицы, модулирующие активность соответствующего эффектора, участвующего в образовании «вторичных мессенджеров»,—аденилатциклазы или фосфолипазы С. Одновременно с этим (и это также представляется чрезвычайно важным) сродство самого м-ХР к агонисту снижается, что следует рассматривать как проявление функционирования механизма обратной связи в трансинаптической регуляции биохимических систем клетки.

Исходя из представлений о гетерогенности м-ХР, можно предположить, что его подтипы с участием разных N-белков сопряжены с индивидуальными эффекторами—циклазами и фосфолипазой С. Результаты фармакологического анализа, проведенного на культуре нервных клеток NG-108-15 и 1321-N-1 [72, 79], подтверждают гипотезу о том, что m_1 -ХР связан с системой аденилатциклазы, а m_2 -ХР—с системами аденилатциклазы и фосфолипазы С. Естественно, что для признания её универсальности необходимы данные, полученные на целом ряде других

объектов. Однако уже сейчас можно утверждать, что характер и особенности взаимодействия подтипов м-ХР с различными N-белками в конечном счете и обуславливают природу их гетерогенности и играют определяющую роль в их вкладе в регуляцию функциональной активности клеток-мишеней.

Таким образом, к настоящему времени достаточно четко определена последовательность молекулярных событий, индуцируемых взаимодействием АХ с рецепторными структурами и направленных к изменению функционирования клетки. В этом отношении наиболее существенным представляется идентификация основных эффекторов, сопряженных с м-ХР—циклаз и фосфолипазы С. Углубление знаний молекулярных основ трансинаптического влияния АХ на физиологические системы дает основания рассчитывать на перспективность разработки принципиально новых и эффективных подходов к фармакологическому воздействию на них.

MOLECULAR MECHANISMS OF NEUROTRANSMITTER EFFECTS OF ACETYLCHOLINE

V. B. DOLGO-SABUROV

Institute of Toxicology, USSR Ministry of Health, Leningrad

Modern views on the molecular mechanisms of muscarinic cholinergic receptors (m-ChR) coupling with biochemical systems of effector cells are presented. Problems of heterogeneity of m-ChR and connections of their subtypes with cyclases and phosphoinositide systems of the second messenger generation are discussed. Special reference is made to the role of GTP-binding proteins (N-proteins) in the regulation of the affinity of m-ChR to cholinergic ligands and the formation of second messengers (cyclic nucleotides, diacylglycerol and inositol phosphates).

ЛИТЕРАТУРА

1. Langley J. N. J. *Physiol. (Gr. Brit.)*, v. 1, p. 339—369, 1878.
2. Langley J. N. J. *Physiol. (Gr. Brit.)*, v. 36, p. 347—384, 1907.
3. Dale H. H. J. *Pharmacol. and Exp. Ther.*, v. 6, p. 147—190, 1914.
4. Loewi O. *Pflügers Arch. ges. Physiol.*, v. 214, p. 678, 1921.
5. Farrow J. T., O'Brien R. D. *Mol. Pharmacol.*, v. 9, p. 33—40, 1973.
6. Schleifer L. I., Eldefrawi M. E. *Neuropharmacol.*, v. 13, p. 415—445, 1974.
7. Richelson E., El-Fakahany E. *Biochem. Pharmacol.*, v. 30, p. 2837—2891, 1981.
8. Dunlap J., Morrow L., Brown J. *Federat. Proc.*, v. 41, p. 6189, 1982.
9. Долго-Сабуров В. Б. *Фармакология и токсикология*, № 6, с. 5—10, 1985.
10. Bolton T. B. — In: *Drug Receptors*, p. 87—104, N.-Y., 1973.
11. Jafferji S. S., Michell R. H. *Biochem. J.*, v. 154, p. 653—658, 1976.
12. Burgen A. S., Spero L. *Brit. J. Pharmacol.*, v. 71, p. 362, 1980.
13. Caulfield M. P., Straughan D. W. *Trends Neurosci.*, v. 6, p. 73—75, 1983.
14. Birdsall N. J. M., Hulme E. C. *Trends Pharmacol. Sci.*, v. 4, p. 459—463, 1983.

15. Hammer R., Giachetti A. Trends Pharmacol. Sci., v. 5, p. 18—20, 1983.
16. Birdsall N. J. M., Hulme E. C., Stockton J. M. Trends Pharmacol. Sci., suppl., p. 4—8, 1984.
17. Peterson G. L., Herron B. S., Yamaki M., Fullerton D. S., Schmerlik M. I. Proc. Nat. Acad. Sci., USA. Biol. Sci., v. 81, p. 4993—4997, 1984.
18. Berrie C. P., Birdsall N. J. M., Dadi H. K., Hulme E. C., Morris R. J., Stockton J. M., Wheatley M. Trans. Biochem. Soc., v. 13, p. 1101—1103, 1985.
19. Haga K., Haga T. J. Biol. Chem., v. 260, p. 7927—7935, 1985.
20. Flynn D. D., Potter L. T. Trends Pharmacol. Sci., suppl., p. 78, 1986.
21. Chang K.-J., Moran J. F., Triggl D. J. Pharmacol. Res. Commun., v. 2, p. 63—66, 1976.
22. Norman A. B., Creese I. Mol. Pharmacol., v. 30, p. 96—103, 1986.
23. Hammer R., Berrie C. P., Birdsall N. J. M., Burgen A. S. V., Hulme E. C. Nature, v. 283, p. 90—92, 1980.
24. Watson M., Roesue W., Yamamura H. I. Life Sci., v. 31, p. 2019—2023, 1982.
25. Watson M., Yamamura H. I., Roesue W. R. Life Sci., v. 32, p. 3001—3011, 1983.
26. Watson M., Vickroy T. W., Roesue W. R., Yamamura H. I. Trends Pharmacol. Sci., suppl., p. 9—11, 1984.
27. Luthin G. R., Wolfe B. B. Mol. Pharmacol., v. 26, p. 164—169, 1984.
28. Watson M., Vickroy T. W., Roesue W. R., Yamamura H. I.—in: Progr. in Neuropsychopharm. Biol. Psychiatry, (ed. Hirst M.), Pergamon Press, Oxford, 1985.
29. Watson M., Roesue W. R., Vickroy T. W., Smith T. L., Akiyama K., Gulya K., Duckles S. P., Serra M., Adem A., Nordberg A., Gehlert D. R., Wamsley J. K., Yamamura H. I. Trends Pharmacol. Sci., suppl., p. 46—55, 1986.
30. Horvath E., Traber J., Spencer D. G. Trends Pharmacol. Sci., suppl., p. 93, 1986.
31. Nastuk M. A., Graybiel A. M. Trends Pharmacol. Sci., suppl., p. 92—93, 1986.
32. Palacios J. M., Cortes R., Probst A., Karobath M. Trends Pharmacol. Sci., suppl., p. 56—60, 1986.
33. Rodbell M., Birnbaum L., Pohl S. L., Krans S. H. J. Biol. Chem., v. 246, p. 1877—1882, 1971.
34. Воськов В. А.—В кн.: Сопряжение рецепторов гормонов и нейромедиаторов с аденилатциклазой, ВИНТИ, Итоги науки и техники, сер. Биорг. химия, т. 2, с. 14—17, 1984.
35. Cassel D., Selinger Z. Biochim. et biophys. acta, v. 452, p. 538—551, 1976.
36. Maguire M. E., Weklund R. A., Anderson H. J., Gilman A. G. J. Biol. Chem., v. 251, p. 1221—1231, 1976.
37. Cassel D., Selinger Z. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 75, p. 4155—4159, 1978.
38. Iyengar R., Birnbaum L. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci., v. 76, p. 3189—3193, 1979.
39. Воськов В. А. Тезисы докл. V Всесоюз. биохим. съезда, Киев, т. 1, с. 66—67, 1986.
40. Воськов В. А., Липкин В. М. Тезисы докл. V Всесоюз. биохим. съезда, Киев, т. 1, с. 166—167, 1986.
41. Berry C. P., Birdsall N. J. M., Burgen A. S. V., Hulme E. C. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 27, p. 1000—1004, 1979.
42. Rosenberg L. B., Roesue W. R., Yamamura H. I. Eur. J. Pharmacol., v. 56, p. 179—183, 1979.
43. Wei J.-W., Sulakhe P. V. Eur. J. Pharmacol., v. 58, p. 91—92, 1979.
44. Wei J.-W., Sulakhe P. V. Eur. J. Pharmacol., v. 62, p. 345—349, 1980.
45. Gurwitz D., Kloog Y., Sokolovsky M. Mol. Pharmacol., v. 28, p. 297—305, 1985.
46. Bevan P. Eur. J. Pharmacol., v. 101—110, 1984.
47. Burgisser E., De Lean A., Lefkowitz R. J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Biol. Sci., v. 79, p. 1732—1736, 1982.
48. Sokolovsky M. Int. Rev. Neurobiol., v. 25, p. 139—183, 1984.

49. Harden T. K. Trends Pharmacol. Sci., suppl. 2, p. 14—18, 1986.
50. Kurose H., Katada T., Amano T., Ut M. J. Biol. Chem., v. 258, p. 4870—4875 1983.
51. Gurwitz D., Baron B., Sokolovsky M. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 120, p. 271—277, 1984.
52. Florio V. A., Sternweis P. C. J. Biol. Chem., v. 26, p. 3477—3483, 1985.
53. Vickroy T., Watson M., Yamamura H. I., Roeser W. R. Federat. Proc., v. 43, p. 2785—2790, 1984.
54. Michell R. H. Biochim. et biophys. acta, v. 415, p. 81—147, 1975.
55. Berridge M. J. Mol. Cell. Endocrinol., v. 24, p. 115—140, 1981.
56. Michell R. H., Kirk C. J. Trends Pharmacol. Sci., v. 2, p. 86—89, 1981.
57. Голиков С. Н., Домо-Сабуров В. Б., Еласа Н. Р., Кулешов В. Н.—В кн.: Холин-ергическая регуляция биохимических систем клетки. М., Медицина, с. 116—124, 1985.
58. Домо-Сабуров В. Б. Нейрохимия, т. 5, с. 306—313, 1986.
59. Abdel-Latif A. A. Pharmacol., Rev., v. 38, p. 227—272, 1986.
60. Michell R. H., Kirk C. J., Jones L. M., Downes C. P., Creba J. A. Philos. Trans. R. Soc. Lond., Biol. Sci., v. 296, p. 123—137, 1981.
61. Richelson E., El-Fakahany E. Biochem. Pharmacol., v. 30, p. 2887—2891, 1981.
62. Masters S. B., Harden T. K., Brown J. H. Mol. Pharmacol., v. 26, p. 149—155, 1984.
63. Poll L., Pusch H. Pflugers Arch., v. 385, P. 75—77, 1979.
64. Purves R.—In: Cell membrane receptors for drugs and hormones (ed. L. Bolis), N.-Y., Raven Press, p. 69—79, 1978.
65. Brown S. L., Brown J. H. Mol. Pharmacol., v. 24, p. 351—356, 1983.
66. Brown J. H., Masters S. B. Federat. Proc., v. 43, p. 2613—2617, 1984.
67. Peterson O., Maruyama Y. Nature, v. 307, p. 693—696, 1984.
68. Lapetina E., Stess W. Life Sci., v. 33, p. 1011—1018, 1983.
69. Brown J. H., Brown S. L. J. Biol. Chem., v. 259, p. 3777—3781, 1984.
70. Fisher S. K., Klinger P. O., Agranoff B. W. J. Biol. Chem., v. 258, p. 7358—7363, 1983.
71. Taylor C. W., Merrill J. E. Trends Pharmacol. Sci., June, p. 238—242, 1986.
72. Harden T. K., Tanner M. W., Martin M. W., Nakahata N., Huges A. R., Hepler J. R., Evans T., Masters S. B., Brown J. H. Trends Pharmacol. Sci., Feb., p. 14—18, suppl., 1986.
73. Jacquemin C., Thibout H., Lambert B., Correze C. Nature, p. 182—184, 1986.
74. Boyer J. L., Martinez-Carcamo M., Monroy-Sanchez A., Juarez-Ayala J., Pastellin G., Posadas C., Garcia-Sainz J. A. Life Sci., v. 39, p. 603—610, 1986.
75. De Wildt D. J., De Jong J., Nijkamp F. P., Kreeftenberg J. G. Eur. J. Pharmacol., v. 127, p. 205—210, 1986.
76. Gross R. A., Clark R. B. Mol. Pharmacol., v. 13, p. 242—250, 1977.
77. Cockcroft S., Gomperts B. D. Nature, v. 314, p. 534—536, 1985.
78. Litosch I., Wallis C., Fain J. N. J. Biol. Chem., v. 260, p. 5464—5471, 1985.
79. Evans T., Smith M. Mol. Pharmacol., v. 26, p. 395—405, 1984.

Поступила 8. V 1987



ХРОНИКА

КОНСТАНТИН ГРИГОРЬЕВИЧ КАРАГЕЗЯН

(к 60-летию со дня рождения)

Исполнилось 60 лет со дня рождения и 35 лет научной, научно-организационной и общественной деятельности члена-корреспондента АН АрмССР, доктора биологических наук, профессора, директора Института экспериментальной биологии АН АрмССР, заведующего лабораторией биохимии липидов Карагезяна Константина Григорьевича.

Проф. К. Г. Карагезян родился 29 сентября 1927 года в Ереване в семье служащего. Еще со студенческой скамьи он проявлял живой интерес к биохимии и под руководством акад. Г. Х. Бунятыана активно участвовал в работе студенческого научного общества медицинского института.

В период становления К. Г. Карагезяна как молодого специалиста-биохимика им впервые был установлен факт условнорефлекторных изменений процесса гемокоагуляции, что и стало предметом его кандидатской диссертации, успешно защищенной в 1954 году. После окончания аспирантуры К. Г. Карагезян поступает на работу в Сектор биохимии Института физиологии АН АрмССР в качестве младшего научного сотрудника, а затем занимает должность ученого секретаря.

Развивая материалистическое учение И. П. Павлова о высшей нервной деятельности, биохимикам Армении под руководством акад. Г. Х. Бунятыана удалось выдвинуть концепцию о том, что условный рефлекс торможения является активным процессом, характеризующимся развитием противоположных сдвигов в динамике многочисленных биохимических показателей. Этот интересный феномен был продемонстрирован и в исследованиях К. Г. Карагезяна по свертыванию крови, что явилось основой для дальнейших поисков истинных механизмов регуляции этого процесса. Работа в этом направлении позволила ему показать регуляторную роль различных липидов в активности ферментов гемокоагуляции. Была выявлена про- и ингибирующая роль различных фосфолипидов на активность тромбопластинов, что представляет существенный интерес в объяснении многих нарушений процесса свертывания крови при ряде патологических состояний организма (инфаркт миокарда, сахарный диабет, стрессорные реакции). Результаты этих исследований были обобщены в докторской диссертации «Фосфолипиды головного мозга, церебральная...

ной жидкости, крови и печени при различных функциональных состояниях организма», защищенной в 1968 году, а в последующем—в монографии «Роль фосфолипидов в жизнедеятельности организма» (Издательство «Айастан», 1972). Исследования в области липидологии и мембранологии позволили К. Г. Карагезяну установить липидзависимость ряда ферментов: лактатдегидрогеназы, креатинкиназы, глицерокиназы и глицерофосфатдегидрогеназы. Вместе с тем, им продемонстрировано ингибирующее действие липидных перекисей на активность этих ферментов, что наглядно проявляется при таких патологиях, как инфаркт миокарда, острый панкреатит, сахарный диабет. На основании этих результатов К. Г. Карагезяном предложен метод комбинированной антиоксидантотерапии в виде сочетанных применений—токоферола и витамина С, характеризующийся эффективностью и перспективностью в клинике отмеченных патологий.

Проф. К. Г. Карагезян является автором более 300 печатных научных трудов, под его руководством защищены 24 кандидатские и 1 докторская диссертации.

Он входит в состав Секции нейрoхимии Научного совета АН СССР по проблемам биохимии животных и человека, Всесоюзного центра по проведению научно-исследовательских работ в области алкоголизма и наркомании Министерства здравоохранения СССР и республиканского межведомственного совета по физико-химической биологии и биотехнологии, а также является участником Всесоюзной программы «Антиоксидант» АН СССР. К. Г. Карагезян является также членом редакционных коллегий журнала «Нейрохимия» (АН СССР и АН АрмССР) и «Биологического журнала Армении» АН АрмССР.

Проф. К. Г. Карагезян—участник многих Всесоюзных и Международных научных собраний по биохимии, нейрoхимии, липидологии и мембранологии, активный пропагандист достижений советской биологической науки за рубежом.

Редколлегия сердечно поздравляет Константина Григорьевича Карагезяна со славным юбилеем и желает ему крепкого здоровья и новых творческих успехов.

РЕДКОЛЛЕГИЯ

УКАЗАТЕЛЬ АВТОРОВ СТАТЕЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ
В ТОМЕ 6, 1987 г.

- Абутидзе К. Д. 89 (1), 418 (3)
 Аврова Н. Ф. 347 (3)
 Агаджанян А. Х. 384 (3)
 Адамян М. Х. 552 (4)
 Азарян А. В. 125 (1), 284 (2)
 Ахолян А. Р. 227 (2)
 Аксентьева М. С. 471 (4)
 Алавердян А. А. 552 (4)
 Алексанян С. С. 544 (4)
 Андреев Б. В. 503 (4)
 Антонян А. А. 552 (4)
 Априкян Г. В. 325 (3), 71 (1)
 Аракелян Л. Н. 193 (2)
 Арменян А. Р. 193 (2)
 Артюнян А. В. 133 (1), 384 (3)
 Арутюнян А. А. 464 (3)
 Асина В. В. 322 (3)
 Ахвердян Э. С. 71 (1)
 Ашмарин И. П. 23 (1)
- Базян А. С. 488 (4)
 Балашов Е. К. 303 (2)
 Барам Г. И. 43 (1)
 Бархударян Н. А. 458 (3)
 Баснаева Т. С. 596 (4)
 Беленький М. А. 28 (1)
 Бодье Ж. 249 (2)
 Березин В. А. 77 (1), 442 (3)
 Березов Т. Т. 298 (2)
 Боровков А. А. 43 (1)
 Боултон А. А. 9 (1)
 Брусков О. С. 43 (1)
 Буданцев А. Ю. 263 (2)
 Бунятян Г. Г. 77 (1)
 Бурлакова Е. Б. 601 (4)
 Бурчинский С. Г. 269 (2)
- Ваградян А. Г. 552 (4)
 Вартанян А. А. 325 (3)
 Векшина Н. А. 510 (4)
 Венерандо Б. 102 (1)
 Вержкина И. В. 332 (3)
 Викторов И. В. 231 (2)
 Витвицкий В. Н. 231 (2)
- Галоян А. А. 3 (1), 125 (1), 193 (2), 206 (2), 227 (2), 544 (4),
 Галстян Г. Г. 552 (4)
 Гайдар Л. Н. 443 (3)
- Галфаян В. Т. 206 (2)
 Гамалая Н. Б. 510 (4)
 Гасанов Г. Г. 435 (3)
 Геворкян Э. С. 565 (4)
 Гегелашвили Г. К. 17 (1)
 Гекчян К. Г. 325 (3)
 Герштейн А. М. 51 (1)
 Глебов Р. Н. 317 (3), 517 (4)
 Глущенко Т. С. 254 (2)
 Годухин О. В. 581 (4)
 Головина Т. Н. 95 (1)
 Гомазков О. А. 368 (3)
 Горкин В. Э. 332 (3)
 Грачев М. А. 43 (1)
 Гуляева Н. В. 259 (2)
 Гурвиц Б. Я. 544 (4)
- Давыдов В. В. 214 (2)
 Данилова О. А. 28 (1)
 Демир Н. Н. 95 (1), 237 (2), 340 (3), 586 (4)
 Диш Т. Н. 199 (2)
 Доведова Е. А. 57 (1)
 Дубинский В. Э. 439 (3)
 Думлер И. А. 82 (1)
- Ероян А. Г. 565 (4)
 Ефимова М. Г. 406 (3)
- Жариков С. Н. 311 (3), 581 (4)
 Жарикова А. Д. 311 (3), 581 (4)
 Жулин В. В. 471 (4)
- Захарян Р. А. 431 (3)
 Зикаткин С. М. 304 (2)
- Ибрагимов Р. Ш. 435 (3)
 Инанов В. А. 390 (3)
 Игнатов Ю. Б. 503 (4)
- Каграманян М. С. 565 (4)
 Казарян Б. А. 431 (3), 565 (4)
 Казарян Т. И. 144 (1)
 Канипова Г. Д. 601 (4)
 Каламкаргов Г. Р. 413 (3)
 Калинин Е. В. 531 (4)
 Карагезян К. Г. 138 (1)
 Карапетян Р. О. 193, 227 (2)
 Карелин А. А. 601 (4)
 Карпова О. Б. 347 (3)
 Карпухина И. Ю. 422 (3)

Киракосова А. С. 206 (2)
 Клепикова В. А. 254 (2), 586 (4).
 Клименко А. П. 133 (1)
 Князян В. А. 71 (1)
 Кобзев В. Ф. 43 (1)
 Ковалев В. Ю. 234 (2), 340 (3)
 Ковач Г. 435 (3)
 Комиссарова Н. В. 368 (3)
 Короткина Р. Н. 601 (4)
 Коротков К. О. 471 (4).
 Кошоянц О. Х. 199 (2)
 Кривенко Н. Е. 426 (3), 586 (4)
 Кругликов Р. И. 199 (2), 488 (4)
 Крыжановский Г. Н. 317 (3)
 Кудрякова Т. Б. 43 (1)
 Кузнецова Т. В. 302 (2)
 Куликов А. В. 186 (2)
 Куликова О. Г. 350 (3)
 Кумарев В. П. 43 (1)
 Кучеровская Т. М. 133 (1), 495 (4)
 Кыйв А. Х. 605 (4)

Лангел Ю. А. 605 (4)
 Леонтьев В. Б. 360 (3)
 Липкин В. М. 82 (1)
 Лишко В. К. 17 (1)
 Лишневская Е. Б. 350 (3)
 Лопатина Н. Г. 590 (4)
 Лиходий Ст. С. 439 (3)
 Лиходий С. Ст. 439 (3)
 Лучаксва О. С. 219 (2)

Манукян И. П. 384 (3)
 Манукян К. А. 565 (4)
 Манукян К. Г. 144 (1)
 Маклецова М. Г. 422 (3)
 Маликов У. М. 426 (3)
 Маркарова М. Ю. 199 (2)
 Машковский М. Д. 332 (3)
 Мельник В. И. 317 (3), 517 (4)
 Менджерский А. М. 422 (3)
 Михеладзе Д. Г. 89 (1), 180 (2),
 418 (3)
 Минясянц Р. Т. 552 (4)
 Михалева И. И. 57 (1)
 Мкртчян М. Е. 138 (1)
 Мовсесян Н. О. 133 (1)
 Молочкина Е. М. 601 (4)
 Мурадов Х. Г. 82 (1)

Назарян К. Б. 431 (3), 565 (4)
 Недзвецкий В. С. 77 (1)
 Нечасова Г. А. 376 (3), 590 (4)

Обидин А. Б. 259 (2)
 Овкимян С. С. 133 (1)
 Орлов Н. Я. 531 (4)

Орлова Т. Г. 531 (4)
 Остапенко И. А. 406 (3)
 Островский М. А. 413 (3)

Панов А. Н. 426 (3)
 Панфилов А. Д. 368 (3)
 Панченко А. Ф. 298 (2)
 Пак Д. Ф. 186 (2)
 Папин А. А. 601 (4)
 Парсаданян Г. К. 288 (2), 295 (2)
 Парфенова Е. В. 173 (2)
 Пашенко А. Е. 465 (3)
 Пархомец П. К. 133 (1), 495 (4)
 Плотников В. В. 43 (1)
 Поленов А. А. 28 (1)
 Полетаев А. Б. 572 (4)
 Попова Н. К. 186 (2)
 Пузырева Т. Г. 199 (2)

Разумовская Н. И. 350 (3)
 Ребрик Т. И. 413 (3)
 Рейтарова Т. Е. 301 (2)
 Ринкен А. А. (4)
 Розанов В. А. 301 (2)
 Розенгарт В. И. 303 (2)
 Росток А. М. 465 (3)
 Роте Т. 481 (4)
 Рустамова Ф. Н. 360 (3)
 Ратвский К. С. 284 (2)

Сабо Дж. 435 (3)
 Саакян С. А. 193 (2)
 Саакян Ф. М. 193 (2)
 Садыков А. А. 360 (3)
 Сантмуратова О. Х. 360 (3)
 Сарибекян Г. А. 206 (2)
 Сартанян Н. А. 89 (1)
 Селифачова О. П. 572 (4)
 Семенова Н. А. 439 (3)
 Сибельдига Л. А. 439 (3)
 Симонян А. А. 249 (2), 464 (3)
 Симонян Р. А. 464 (3)
 Симс В. Э. 116 (1)
 Скобелева Н. А. 431 (3)
 Скурыгин В. П. 214 (2)
 Собчинская Н. М. 180 (2)
 Соломонян Р. О. 130 (2), 418 (3).
 Срапигонян Р. М. 109 (1), 193 (2).
 227 (2)
 Степанян А. А. 144 (1)

Таранова Н. П. 219 (2)
 Телегди Г. 435 (3)
 Тенчева Ц. 254 (2)
 Терлецкая Я. Т. 17 (1)

Теттаманти Г. 102 (1)
Тигранян Р. А. 63 (1), 237 (2),
340 (3)
Титов С. Ю. 317 (3)
Тоцкий В. Н. 301 (2)
Турияница Н. М. 465 (3)
Турияница С. М. 465 (3)
Тягепылд Л. Я. 605 (4)

Уларова Т. М. 302 (2)
Уиттакер В. П. 161 (2)

Федоров Н. А. 298 (2)
Федорович Т. М. 465 (3)
Фиорилли А. 102 (1)
Фрейдин А. А. 531 (4)
Фролькис М. В. 269 (2)

Хаглид К. Т. 249 (2)
Хайдарлиу С. Х. 293 (2)
Халанский А. С. 77 (1)
Халмурадов А. Г. 133 (1), 495 (4)
Хачатрян В. Г. 552 (4)
Хачатрян Г. С. 552 (4)
Хашим Дж. 33 (1)
Хватова Е. М. 57 (1)
Хедер Г. 116 (1)

Хоничева Н. М. 259 (2)
Хохлов А. П. (4)
Хрусталева Н. А. 596 (4)

Цинзерлинг В. А. 347 (3)

Шагинян В. А. 71 (1)
Шарова Н. П. 544 (4)
Шашкова Н. А. 231 (2)
Шевченко Г. М. 77 (1)
Шерстобитов О. Е. 303 (2)
Шлибс Р. 481(4)
Шортанова Т. Х. 95 (1)
Шукалова Т. Ф. 317 (3)
Шумайлов И. Н. 510 (4)

Эллер М. Х. 605 (4)
Эме П. 116 (1)
Эмирбеков Э. З. 244 (2)
Этингер Р. Н. 82 (1), 406 (3)

Юринская М. М. 311 (3)

Яковлев А. Г. 43 (1)
Якушев В. С. 214 (2)
Ярв Я. А. 605 (4)

СОДЕРЖАНИЕ

Советская нейрохимия—к 70-летию Великой Октябрьской социалистической революции	471
Коротков К. О., Аксентьева М. С., Жулин В. В. Изменение параметров связывания [³ H] диазепама с синаптическими мембранами коры больших полушарий мозга крыс при обучении	474
Шлибс Р., Роте Т. Постнатальное развитие рецепторов глутамата, бензодиазепина и ГАМК в зрительной системе крысы (сравнительное исследование)	481
Базян А. С., Кругликов Р. И. Зависимость активности аутоадренорецепторов от интенсивности секреции норадреналина	488
Халмуратов А. Г., Кучмеровская Т. М., Пархомец П. К. Действие NAD ⁺ на высвобождение дофамина и серотонина из синапсом головного мозга крыс	495
Игнатов Ю. Д., Андреев Б. В. О роли ГАМК в изменении болевой чувствительности при хроническом ноцицептивном воздействии	503
Гамалея Н. Б., Вскишина Н. А., Шумайлов И. Н. Влияние острого стрессорного воздействия на поведение и некоторые биохимические показатели у мышей гибридных линий C57BL/6 и DBA/2 с различным потреблением алкоголя в условиях свободного выбора	510
Мельник В. И., Глсбов Р. Н. Н ⁺ -АТРаза мембран синаптических пузырьков мозга: идентификация и характерные свойства системы транспорта Н ⁺	517
Калинин Е. В., Орлова Т. Г., Фрейлин А. А., Орлов Н. Я. Характеристики и содержание фосфодиэстеразы циклического 3',5'-гуанозинмонофосфата в наружных сегментах фоторецепторов сетчатки суслика	531
Галоян А. А., Гурвич Б. Я., Шарова Н. П., Александян С. С. Са ²⁺ -кальмодулин-зависимая 5'-нуклеотидаза гипоталамуса крупного рогатого скота и ее регуляция С-модулином	544
Хачатрян Г. С., Галстян Г. Г., Антонян А. А., Алавердян А. А., Хачатрян В. Г., Минасянц Р. Т., Ваградян А. Г., Адамян М. Х. Содержание различных классов РНК в головном мозгу при действии пиримидиновых циклических нуклеотидов и нуклеозидов	552
Назарян К. Б., Геворкян Э. С., Каграманян М. С., Ероян А. Г., Манукян К. А., Казарян Б. А. Особенности регуляции активности некоторых гликолитических ферментов при воздействии астрадиола в культуре клеток нейробластомы	565
Полетасю А. Б., Селифанова О. П. Физико-химическая характеристика виднеспецифических белковых антигенов мозга, являющихся мишенями аутоантител при некоторых нервно-психических заболеваниях человека	572
Краткие сообщения	
Жарикова А. Д., Годухин О. В., Жариков С. И. Высвобождение [¹⁴ C] β-фенилэтиламина при локальной суперфузии неостриатума головного мозга крыс	581
Кривенко Н. Е., Кленникова В. А., Демин Н. Н. Сульфгидрильные группы в одесельных клетках синего пятна, супраолигического ядра и дорзального ядра шва головного мозга крыс при лишении парадоксальной фазы сна	586
Насчава Г. А., Долатина Н. Г. Проницаемость мембран лиасом головного мозга для кислот РНКазы при обучении крыс различных линий	590
Хрусталев Н. А., Баскаева Т. С., Хохлов А. П. Очистка и некоторые свойства аминопептидазы миелина	596

Молочкина Е. М., Папин А. А., Каипова Г. Д., Короткина Р. Н., Бурлакова Е. Б., Карелин А. А. Повышение антиокислительной активности липидов голов- ного мозга крыс после введения феназепама (к вопросу о механизме анти- стрессорного действия бензодиазепинов)	601
---	-----

Письма в редакцию

Эллер М. Х., Кыйв А. Х., Лангел Ю. А., Ринкен А. А., Тяхепылд Л. Я., Ярв Я. Л. Неприменимость хинуклидинилбензилата для экспериментов с мускариновым рецептором в равновесных условиях	605
--	-----

Обзоры

Долго-Сабуров В. Б. Молекулярные механизмы нейромедиаторных эффектов ацетилхолина	611
--	-----

Хроника

Константин Григорьевич Карагезян (к 60-летию со дня рождения)	622
---	-----

C O N T E N T S

oviet Neurochemistry—to the 70th anniversary of Great October Revolution	471
<i>Korotkov K. O., Aksent'eva M. S., Zhulin V. V.</i> Learning alters [³ H] diazepam binding to the synaptosomal membranes of the rat neocortex	474
<i>Schliebs R., Rothe T.</i> Development of glutamate, benzodiazepine, and GABA binding sites in rat visual system. A comparative study	481
<i>Buzyan A. S., Kruglikov R. I.</i> Dependence of autoadrenoreceptors activity from the intensity of noradrenaline secretion	488
<i>Khalmuradov A. G., Kuchmerovskaya T. M., Parkhomets P. K.</i> Effect of NAD on dopamine and 5-hydroxytryptamine release from rat brain synaptosomes	495
<i>Ignatov Yu. D., Andreev B. V.</i> GABA participation in modulation of pain sensitivity under the conditions of prolonged nociceptive influences	503
<i>Gumaleya N. B., Vekshina N. L., Shumaylov I. N.</i> The influence of acute stress on behavior and biochemical parameters in inbred lines of mice C57 BL/6 and DBA/2 with different free choice alcohol consumption . .	510
<i>Melnik V. I., Glebov R. N.</i> H ⁺ -ATPase of brain synaptic vesicle membranes. Identification and characterization of an H ⁺ transport system	517
<i>Kulinin E. V., Orlova T. G., Freidin A. A., Orlov N. J.</i> Cyclic 3', 5'-guanosinemonophosphate phosphodiesterase content in the ground squirrel retinal photoreceptors outer segments	531
<i>Galoyan A. A., Gurvits B. Y., Sharova N. P., Alexanyan S. S.</i> Ca ²⁺ , calmodulin-dependent 5-nucleotidase from bovine hypothalamus and its regulation by C-modulin	544
<i>Khachatryan G. S., Galstian H. G., Antonian A. A., Alaverdian A. A., Khachatryan V. G., Minasians R. T., Vahradian H. G., Adamian M. K.</i> Possible role of pyrimidine-containing cyclic nucleotides and nucleosides in the gene expression of brain cells	552
<i>Nazaryan K. B., Gevorgian E. S., Kagramanyan M. S., Eroyan L. G., Manukyan K. L., Kazaryan B. A.</i> Peculiarities of estradiol effect on the activity of some glycolytic enzymes in neuroblastoma cell culture	565
<i>Poletayev A. B., Selifanova O. P.</i> Physico-chemical properties of species-non-specific brain protein antigens targets for autoantibodies in some neurological disorders	572
Short communications	
<i>Zharikova A. A. D., Godukhin O. V., Zarikov S. I.</i> Release of ¹⁴ C-3-phenylethylamine during local superfusion of rat brain neostriatum	581
<i>Krivenko N. E., Klenikova V. A., Doemin N. N.</i> Sulfhydryl groups in single cells of locus coeruleus, nn. supraopticus et raphe dorsalis of REM-sleep deprived rats	586
<i>Nechaeva G. A., Lopatina N. G.</i> Permeability of brain lysosomal membranes for acid RNase in rats of different lines under training and pseudotraining	590
<i>Khrustalyeva N. A., Baskaeva T. S., Khokhlov A. P.</i> Purification and properties of aminopeptidase from myelin	596
<i>Molochkina Ye. M., Papin A. A., Kayipova G. D., Korotkina R. N., Burdakova Ye. B., Karelin A. A.</i> Increased rat brain lipid antioxidative activity after phenazepam injection	601

Letters to Editor

- Eller M. H., Koiv A. H., Langel U. L., Rinke A. A., Tahepold L. J., Jarv J. L.* Quinuclidinyl benzilate can't be used as a ligand in equilibrium binding studies with muscarinic receptor 605

Reviews

- Dolgo-Saburov V. B.* Molecular mechanisms of neurotransmitter effects of acetylcholine 611

Chronicles

- Karagoezyan K. G. (On his 60 th Birthday) 612

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

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

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

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

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

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

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

4. Рисунки, отчетливо выполненные тушью на плотной белой бумаге или кальке, представляются в конверте в двух, а фотографии в трех экземплярах. На обороте каждого рисунка карандашом следует указать фамилии авторов, сокращенное название статьи и порядковый номер, для фотографий (на 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 сплошной нумерации страниц тома номер выпуска не указывать. При цитировании книги указывается также, под чьей редакцией она издана, название издательства и место издания.

СОДЕРЖАНИЕ

журнала «Нейрохимия», том 6, 1987 год

Выпуск 1

Галоян А. А. Гликопептидные гормоны гипоталамуса в регуляции метаболизма Ca^{2+} , циклических нуклеотидов и катехоламинов	3
Боултон А. А. Следовые амины как нейротрансмиттеры и нейромодуляторы	9
Лишко В. К., Терлецкая Я. Т., Гегелашвили Г. К. Бесклеточная модель нейросекреции	17
Ашмарин И. П. Гипотеза о существовании новой высшей категории в иерархии регуляторных пептидов	23
Полнов А. А., Бельский М. А., Данилова О. А. Иммуноцитохимическое исследование локализации некоторых пептидных нейрогормонов в гипоталамо-гипофизарном комплексе позвоночных	28
Хашим Дж. А. Белки, пептиды и аутоиммунные поражения миелина	33
Брусов О. С., Яковлев А. Г., Плотников В. В., Баран Г. И., Грачев М. А., Кумарев В. П., Кудрякова Т. Б., Боровков А. А., Кобзев В. Ф. Поиск эндотенных пептидных лигандов бензодиазепиновых рецепторов: выделение и молекулярно-генетические исследования	43
Герштейн А. М. Нейрохимические и нейрофизиологические перестройки в структурах мозга при воздействии некоторых нейропептидов	51
Хаватова Е. М., Доведова Е. А., Михалева И. И. Метаболическая эффективность пептида дельта-сна при стрессорных состояниях организма	57
Тигранян Р. А. Реакция опиоидной системы головного мозга на стресс и ее зависимость от состояния катехоламинергической системы	63
Априкин Г. В., Князян В. А., Шагинян Э. А., Ахвердян Э. С. Роль N-ацетил-L-аспарагиновой кислоты в механизме действия нейромедиаторных аминокислот	71
Березин В. А., Шваченко Г. М., Бунятян Г. Г., Халанский А. С., Нездвездкий В. С. Специфический белок промежуточных филаментов в нервной ткани и опухолях	77
Липкин В. М., Муралов Х. Г., Думлер И. А., Эттингер Р. Н. Структура и функция специфического белка сетчатки быка—ингибитора $3',5'$ -сСМР-фосфодиэстеразы	82
Микаеладзе Д. Г., Абутидзе К. Д., Саргания Н. А. Рецепторы нейролептиков и их связь с протеникиназными реакциями	89
Демин Н. Н., Шортанова Т. Х., Головина Т. Н. Количественные сдвиги белков и РНК в клетках ядер ствола головного мозга в динамике зимней спячки сусликов	95
Тетсаманти Г., Фиорилли А., Венсрандо Б. Взаимодействие ганглиозидов с ферментами головного мозга на примере цитозольной аденилатциклазы	102
Срапционян Р. М. Специфические гликопротеины гипоталамуса	109
Симс В. Э., Хелдер Г., Эме П. Взаимодействие вещества Р и ангиотензинпревращающего фермента	116
Азарян А. В., Галоян А. А. Изучение аксопептидазной активности катепсина В и специфичности катепсина D и высокомолекулярной аспартильной протеазы головного мозга с помощью хромофорных и вазоактивных пептидов	125

Халмуратов А. Г., Кучерова Т. М., Пархомов П. К., Клишченко А. П., Арутюнян А. В., Мовсисян Н. О. Влияние аналогов NAD на его связывание синаптическими мембранами коры больших полушарий головного мозга крыс	133
Каратезян К. Г., Мкртчян М. Е., Овакимян С. С. Липидзависимость тромбопластинов головного мозга, регулирующих гемостаз	138
Манукян К. Г., Степанян А. А., Казарян Т. И. О белковом и липидном компоненте протеолипидов разных субклеточных образований головного мозга крысы	144

Выпуск 2

Уиттакер В. П. Модельная холинергическая система: прошлые достижения и перспективы в будущем	161
Парфенова Е. В. ГАМК-рецепторы синаптических мембран и их эндогенные регуляторы в онтогенезе коры мозга крыс	172
Соломония Р. О., Собчинская Н. М., Миксладас Д. Г. Изменение состояния холинорецептора мускаринового типа мозга при импринтинге у цыплят	180
Пак Д. Ф., Куликов А. В., Попова Н. К. Серотониновые рецепторы головного мозга во время зимней спячки	186
Арменян А. Р., Аракелян А. Н., Срапцонян Р. М., Карапетян Р. О., Саакян Ф. М., Саакян С. А., Галоян А. А. Влияние кардиоактивных нейрогормонов «Г» и «К» на высвобождение и захват $[^3H]$ норадреналина в синаптических гипоталамуса	193
Криуликов Р. И., Диш Т. Н., Коштыню О. Х., Маркарова М. Ю., Пузырева Т. Г. О некоторых механизмах действия нейропептидов и их аналогов на процессы обучения и памяти	199
Сарибская Г. А., Киракосова А. С., Галфаян В. Т., Галоян А. А. О природных ингибиторах и активаторах фосфодиэстераз циклических нуклеотидов из гипоталамуса крупного рогатого скота	206
Давылов В. В., Скурыгин В. П., Якушев В. С. Транспорт Ca^{2+} в синаптических мембранах крысы с некрозом миокарда	214
Таранова Н. П., Лучакова О. С. Иммунологическая реактивность антител к галактоцереброзидам миелина с различными по липидному составу антигенами	219

Краткие сообщения

Акопян А. Р., Срапцонян Р. М., Карапетян Р. О., Галоян А. А. Влияние кардиотропных нейрогормонов гипоталамуса на Ca^{2+} -токи в нейрональной мембране	227
Витвицкий В. Н., Викторова И. В., Шапкова Н. А. Влияние пептидных факторов мозга на включение предшественников в ДНК и белок культивируемой нервной ткани	231
Тигранян Р. А., Демин Н. Н., Ковалев В. Ю. Содержание полиаминов и специфических компонентов в различных отделах головного мозга крыс при стрессорных воздействиях. I. Иммобилизационный стресс	237
Эмирбеков Э. Э. Нейромедиаторные аминокислоты и пептиды и метаболизм белков при гипотермии и зимней спячке	244
Симомян А. А., Бодьс Ж., Халлид К. Т. Влияние неспецифического белка S-100 на АТФазную активность мозга	249
Клишченко В. А., Глушченко Т. С., Темисова Ц. Влияние пирамета на метаболизм ядерных белков нейронов и глиоцитов некоторых структур головного мозга крысы в норме и при лишении парадоксальной фазы сна	254
Гуляева Н. В., Хоничева Н. М., Обидин А. Б. Супероксиддисмутазная активность и уровень малоновой диальдегиды в мозгу крыс «способной» и «неспособной» линий Троймана: связь с устойчивостью к стрессу	259

Будинцев А. Ю. Использование додецилсульфата натрия для солюбилизации пер- реживающих срезов мозга	263
---	-----

Обзоры

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

Хроника

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

Рецензии

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

Рефераты статей, направленных
на депонирование в ВИННИТИ

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

Выпуск 3

Жариков С. И., Жарикова А. Д., Юринская М. М. Транспорт [3 H] дофамина через синаптическую мембрану: влияние β -фенилэтиламина	311
Мельник В. И., Крыжановский Г. Н., Шукалова Т. Ф., Титов С. Ю., Гле- бов Р. Н. Торможение конвульсантами активного транспорта протонов в мембранах синаптических пузырьков мозга: блокада анионного канала	317
Априян Г. В., Геклян К. Г., Варганян А. А. Ca^{2+} -зависимое высвобождение нейромедиаторных аминокислот из нервных окончаний головного мозга бе- лых крыс при старении	325
Веревакина И. В., Аснина В. В., Горхин В. З., Машковский М. Д. Избирательное ингибирование пиразидолом моноаминоксидазы типа А в головном мозгу крысы и человека	332
Тигранян Р. А., Демин Н. Н., Ковалев В. Ю. Содержание полиаминов и специ- фических компонентов в различных отделах головного мозга крыс при стрессорных воздействиях. II. Вращение в барбане и эмоциональный стресс, коррекция стрессорных явлений феназепамом	340
Алишевская Е. Б., Куликова О. Г., Ралуновская Н. И. Действие антифенов на систему сАМР в мозгу крыс	350

Саитмуратова О. Х., Рустамова Ф. Н., Садыков А. А., Лсонтъев В. Б. Действие некоторых психо- и нейротропных препаратов на кинетику биосинтеза ядерных гликопротеинов нейронов	360
Панфилов А. Д., Гомазков О. А., Комиссарова Н. В. Влияние ангиотензина II и ангиотензинпревращающего фермента на агрессивное поведение у крыс	368
Насчаев Г. А. Очистка связанной щелочной РНКазы цитозоля и ее специфического белкового ингибитора из растворимой фракции головного мозга крыс	376
Манукян И. П., Агаджанян 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., Аврора Н. Ф., Цинзерлинг В. А. Изучение ганглиозидов головного мозга и сосудистых сплетений при менингоэнцефалитах различной этиологии	397
Ефимова М. Г., Остапенко И. А., Этингер Р. Н. Особенности процесса перекисного окисления липидов в тканях сетчатки и мозга крыс с наследственной дегенерацией сетчатки	406
Резрик Т. И., Каламкаргов Г. Р., Островский М. А. Влияние перекисного окисления липидов на проводимость фоторецепторной мембраны диска	413

Краткие сообщения

Абутидзе К. Д., Соломонов Р. О., Мисаиладзе Д. Г. Изучение опиатной рецепторной системы в обогащенных фракциях глины и нейронов	418
Менджерицкий А. М., Маклецова М. Г., Карпухина И. Ю. Влияние дельта-синапс-индуцирующего пептида на содержание ГАМК, глутамата и активность глутаматдекарбоксилазы в отделах мозга крыс	422
Кривенко Н. Е., Маликов У. М., Попов А. Н. Белки и РНК в нейронах и глиоцитах дорзального ядра шва головного мозга крысы при сн и длительном его лишении в цилиндрическом третиане	426
Скобелева Н. А., Захарян Р. А., Назарян К. Б., Казарян Б. А. Получение клонок рекомбинантных ДНК (банка клонов), содержащих нуклеотидные последовательности мРНК, специфичные к белкуNSE из мозга крысы	431
Гасанов Г. Г., Ибрагимов Р. Ш., Ковач Г., Сабо Дж., Телсиди Г. Эффект окситоцина, микроинъекции в гиппокамп при формировании плечения к героину	435

Методы исследований

Лиходий С. Ст., Семёнова Н. А., Дубинский В. З., Лиходий Ст. С., Сибельдина 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. Бунятяна)	456
Бархударян Н. А. О заседании Секции нейробиологии (17—18 февраля 1987 г., Ленинград)	458

Рефераты статей, направленных на депонирование в ВИННИТИ

Арутюнян А. А., Симонян Р. А., Симонян А. А. Нуклеотидный контроль активности NAD-зависимой изоцитратдегидрогеназы в митохондриях мозга кур	464
Турыничан Н. М., Пашенко А. Е., Федорович Т. М., Турыничан С. М., Ростова Л. М. Адаптивная перестройка резервов свободных аминокислот в ткани головного мозга белых крыс после парентерального введения отдельных аминокислот и смеси альвезина «новый»	465

Советская нейрохимия—к 70-летию Великой Октябрьской социалистической революции	471
Коротков К. О., Аксентьева М. С., Жулин В. В. Изменение параметров связывания [^3H] диазепама с синаптическими мембранами коры больших полушарий мозга крыс при обучении	474
Шлибс Р., Роте Т. Постнатальное развитие рецепторов глутамата, бензодиазепина и ГАМК в зрительной системе крысы (сравнительное исследование)	481
Базян А. С., Круликов Р. И. Зависимость активности аутоадренорецепторов от интенсивности секреции норадреналина	488
Халмуратов А. Г., Кучмеровская Т. М., Пархомец П. К. Действие NAD^+ на высвобождение дофамина и серотонина из синапсом головного мозга крыс	495
Игнатов Ю. Д., Андреев Б. В. О роли ГАМК в изменении болевой чувствительности при хроническом ноцицептивном воздействии	503
Гамался Н. Б., Векшина Н. А., Шумайлов И. Н. Влияние острого стрессорного воздействия на поведение и некоторые биохимические показатели у мышей инбредных линий C57BL/6 и DBA/2 с различным потреблением алкоголя в условиях свободного выбора	510
Мельник В. И., Глебов Р. Н. H^+ -АТРаза мембран синаптических пузырьков мозга: идентификация и характерные свойства системы транспорта H^+	517
Калинин Е. В., Орлова Т. Г., Фрейдин А. А., Орлов Н. Я. Характеристики и содержание фосфодиэстеразы циклического 3',5'-гуанозинмонофосфата в наружных сегментах фоторецепторов сетчатки суслика	531
Галоян А. А., Гурвиц Б. Я., Шарова Н. П., Алексанян С. С. Ca^{2+} -кальмодулин-зависимая 5'-нуклеотидаза гипоталамуса крупного рогатого скота и ее регуляция С-модулином	544
Хачатрян Г. С., Галстян Г. Г., Антонян А. А., Алавердян А. А., Хачатрян В. Г., Минасянц Р. Т., Вагралян А. Г., Адамян М. Х. Содержание различных классов РНК в головном мозгу при действии пиримидиновых циклических нуклеотидов и нуклеозидов	552
Назарян К. Б., Геворкян Э. С., Каграманян М. С., Ероян А. Г., Манукян К. А., Казарян К. А. Особенности регуляции активности некоторых гликолитических ферментов при воздействии эстрадиола в культуре клеток нейробластомы	565
Полетаев А. Б., Селифанова О. П. Физико-химическая характеристика видоспецифических белковых антигенов мозга, являющихся мишенями аутоантител при некоторых первично-психических заболеваниях человека	572
Краткие сообщения	
Жарикова А. Д., Голухин О. В., Жариков С. И. Высвобождение [^{14}C] β -фенилэтиламина при локальной суперфузии неостриатума головного мозга крыс	581
Кривенко Н. Е., Кленикова В. А., Демин Н. Н. Сульфгидрильные группы в отдельных клетках синего пятна, супраоптического ядра и дорзального ядра шва головного мозга крыс при лишении парадоксальной фазы сна	586
Нечасова Г. А., Лопатина Н. Г. Проницаемость мембран лизосом головного мозга для кислой РНКазы при обучении крыс различных линий	590
Хрусталева Н. А., Баскаева Т. С., Хохлова А. П. Очистка и некоторые свойства аминоксептидазы миеллина	596
Молочкина Е. М., Папин А. А., Каипова Г. Д., Короткина Р. Н., Бурлакова Е. Б., Карелин А. А. Повышение антиокислительной активности липидов головного мозга крыс после введения феназепама (к вопросу о механизме антистрессорного действия бензодиазепинов)	601

Письма в редакцию

- Эллер М. Х., Кыйв А. Х., Ланге Ю. А., Ринкен А. А., Тяхеппид А. Я.,
Яров Я. А. Неприменимость хинукандилбензилата для экспериментов
с мужкариновым рецептором в равновесных условиях 605

Обзоры

- Долно-Сабуров В. Б. Молекулярные механизмы нейромедиаторных эффектов
ацетилхолина 611

Хроника

- Константин Григорьевич Карагезян (к 60-летию со дня рождения) 622

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

Сдано в набор 6. 10. 1987 г. Подписано к печати 7. 12. 1987 г. ВФ 03904.
Бумага № 1,70×108¹/₁₆. Высшая печать, п. л. 10,0. Усл. печ. лист. 14,0.
Учет.-изд. 12,74. Тираж: 590. Заказ 694. Издат. 7252.
Адрес редакции: 375014, Ереван-44, ул. П. Савака 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.