

ТОМ 5, № 4, 1986

ISSN 0203-493X

# НЕЙРОХИМИЯ

## ՆԵՅՆՈՒՄԻԱ



АКАДЕМИЯ НАУК СССР  
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

АКАДЕМИЯ НАУК СССР  
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

# НЕЙРОХИМИЯ ՆԵՅՐՈՔԻՄԻԱ

Октябрь—декабрь  
ТОМ 5, ВЫП. 4

Журнал основан в 1982 году  
Выходит 4 раза в год

ИЗДАТЕЛЬСТВО АН АРМЯНСКОЙ ССР  
ЕРЕВАН 1986

Ст. редактор Э. А. ХАЧАТУРОВА

Лит. сотрудник Г. Р. ГРИГОРЯН

Сдано в набор 4. 10. 1986 г. Подписано к печати 23. 12. 1986 г. ВФ 12115  
Бумага № 1,70×108<sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Высокая печать. Печ. лист. 7,0+1вкл. Усл.-печ. лист. 9,98  
Учет.-изд. 8,03. Тираж 620. Заказ 1009. Издат. , 11.

Адрес редакции: 375044, Ереван-44, ул. П. Севака 5/1, т. 28-17-70, 28-16-52.

Издательство АН АрмССР, Ереван, 375019, пр. Маршала Баграмяна, 24 г.

Типография Издательства Академии наук АрмССР, Ереван-19,

пр. Маршала Баграмяна, 24.

**Редакционная коллегия**

**А. А. ГАЛОЯН**—главный редактор

Г. В. АПРИКЯН, А. В. АРУТЮНЯН (зам. главного редактора),  
Л. С. АРУТЮНЯН (отв. секретарь), Я. В. БЕЛИК, Н. Н. ДЕМНИ (зам.  
главного редактора), К. Г. ҚАРАГЕЗЯН, П. Г. КОСТЮК, А. А. КРИ-  
ЧЕВСКАЯ, В. К. ЛИШКО, Р. М. НАЛБАНДЯН, М. Ш. ПРОМЫС-  
ЛОВ, В. Н. 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, Д. А. САХАРОВ, А. А. СИМОНЯН, А. М. УТЕВ-  
СКИП, Е. М. ХВАТОВА, Л. С. ЧЕРКАСОВА, Р. Н. ЭТИНГОФ

УДК 615.787

## АУТО- И ГЕТЕРОРЕЦЕПТОРНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ НЕЙРОПЕРЕДАТЧИКА ИЗ ГЛУТАМАТ/ АСПАРТАТЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ КОРЫ МОЗГА КРЫС

ПРИХОЖАН А. В., КОВАЛЕВ Г. П., РАЕВСКИЙ К. С.

Институт фармакологии АМН СССР, Москва

В опытах с регистрацией  $K^+$  (30 мМ)-стимулируемого высвобождения 3Н-D-аспарагиновой кислоты из перфузируемых синапсом коры мозга крысы показано, что метиласпаргат ( $10^{-6}$ – $10^{-3}$  М) не изменяет параметров изучаемого процесса, а клиноватая ( $10^{-4}$  и  $10^{-3}$  М) и квинкваловая ( $10^{-3}$  М) кислоты снижают его, причем эффект последней антагонизируется диэтиловым эфиром глутаминовой кислоты (ДЭЭГ) ( $10^{-4}$  М). Фенпазепам ( $10^{-4}$  М) также снижал высвобождение D-аспарагиновой кислоты, его эффект устранялся в присутствии Ro 15-1788 ( $10^{-4}$  М), но не ДЭЭГ, и усиливался мусцимолом ( $10^{-4}$  М), но не баклофеном ( $10^{-5}$  М). Потенцирующее действие мусцимола было биккуллин- и пикротокенинчувствительным. В использованных концентрациях антагонисты, мусцимол и баклофен сами по себе не оказывали заметного влияния на изучаемый процесс. На основании полученных данных постулируется возможность существования ауто- и гетерорецепторной регуляции процесса высвобождения возбуждающих аминокислотных нейротрансмиттеров.

Пресинаптические рецепторы в последнее время привлекают к себе внимание в качестве возможных регуляторов процесса высвобождения нейротрансмиттеров. Принято деление этих рецепторов на ауто- и гетерорецепторы. К первым относят рецепторы, которые локализованы на первичных окончаниях и обладают чувствительностью к выделяемому этим окончанием нейротрансмиттеру. Соответственно термином «гетерорецепторы» обозначают образования той же локализации, но чувствительные к нейротрансмиттеру, который высвобождается терминалями других нейронов [1]. В последние годы начато изучение рецепторной регуляции высвобождения нейротрансмиттеров из глутамат- и аспартатергических нейронов, широко представленных в мозгу млекопитающих, где они составляют основную массу возбуждающих нервных клеток [2]. Гетерогенность рецепторов возбуждающих аминокислотных нейротрансмиттеров можно считать в настоящее время доказанной. Наиболее обоснованным представляется выделение трех типов рецепторов возбуждающих аминокислот: 1) чувствительных к

квискваловой кислоте, антагонист—диэтиловый эфир глутаминовой кислоты (ДЭЭГ); 2) чувствительных к N-метил-аспарагиновой кислоте, антагонисты—аминоадипиновая кислота, фосфоновые кислоты и др.; 3) чувствительных к каннновой кислоте, для которых пока не обнаружено специфического антагониста [2]. Эндogenous передатчики—глутаминовая и аспарагиновая кислоты связываются со всеми тремя типами рецепторов, поэтому широкое распространение получил термин «глутамат/аспаратные рецепторы». По аналогии стал применяться термин «глутамат/аспаратергические нейроны», так как современные методические подходы, как правило, не позволяют дифференцировать эти две медиаторные системы.

Имеются отдельные сообщения об изучении глутамат/аспаратных ауторецепторов в различных структурах мозга [3—5]. Эти работы, выполненные на срезах мозга, не доказывают пресинаптической (связанной с нервными окончаниями) локализации выявленных рецепторов. Из гетерорецепторов, модулирующих высвобождение возбуждающих аминокислот, наиболее подробно изучены рецепторы типа ГАМК<sub>A</sub> в мозжечке [6, 7]. Что касается коры мозга, то одни авторы обнаруживают опосредуемую ГАМК регуляцию высвобождения глутаминовой кислоты [8], другие сообщают о ее отсутствии [9].

В свете этих данных целью настоящей работы явилось изучение механизмов регуляции процесса  $K^+$ -стимулируемого высвобождения нейротрансмиттера из глутамат/аспаратергических нейронов, в частности, возможного участия в этих процессах глутаматных (аспаратных) ауторецепторов, ГАМК<sub>A</sub>, ГАМК<sub>B</sub> и безводноазепиновых рецепторов. Для анализа использовали типичные агонисты указанных рецепторов. В качестве «маркера» процесса высвобождения использовали <sup>3</sup>H-D-аспарагиновую кислоту—нemetабализирующийся субстрат системы захвата L-форм глутаминовой и аспарагиновой кислот [10].

### Материалы и методы

Опыты проводили на крысах-самцах линии *Wistar* массой 180—220 г. Фракцию неочищенных синапсом ( $P_2$ ) коры мозга выделяли по методике, подробно описанной ранее [11]. Использовали оксигенированный Krebs-бикарбонатный буфер следующего состава (в mM): NaCl—118; KCl—4,75; CaCl<sub>2</sub>—2,54; MgSO<sub>4</sub>—2,2; NaHCO<sub>3</sub>—25,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>—1,19; глюкоза—11,0; pH 7,4. Для получения буфера с повышенным содержанием  $K^+$  (30 mM) NaCl замещали на соответствующее количество KCl. 50 мкл суспензии синапсом (концентрация белка 7—9 мг/мл) инкубировали в 1 мл буфера при 37°. Через 5 мин добавляли 2,3-<sup>3</sup>H-D-аспарагиновую кислоту («Изотоп», СССР; величина У.Л. 33 Ки/ммоль) до конечной концентрации  $10^{-7}$  M. Инкубацию продолжали 10 мин при легком встряхивании, после чего взвесь синапсом наносили на стеклянно-волоконистый фильтр GF/C «Whatman» (диаметр 20 мм), закрепленный в термостатируемой камере. Среду инкубации удаляли при скорости 4 мл/мин при помощи перистальтического насоса «ЛКВ Мультитрекс» (Швеция), затем синапсомы промывали дважды 2 мл буфера. Дальнейшую перфузию проводили при скорости 1 мл/мин. Через 6 мин перфузии исходным буфером в камеру вносили буфер с повышенным содержанием калия (30 mM) с используемым веществом или без него (контроль). Количественную оценку высвобождения прово-

дили, измеряя радиоактивность следующих фракций суперфузата: фракция I—последние 2 мин перфузии исходным буфером, фракция II и фракция III—соответственно 2 первые и 2 последующие мин после внесения буфера с повышенным содержанием калия (с веществом или без него). Фракции растворяли в сцинтилляционной жидкости Брея, величины радиоактивности в дпм определяли на жидкостно-сцинтилляционном счетчике «Intertechnique SL-4000». Далее для каждой суперфузии находили отношение радиоактивностей фракции II к фракции I (А) и фракции III к фракции I (Б). Данные обрабатывали с использованным t-критерия Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

Результаты экспериментов по изучению влияния агонистов глутамат/аспартатных рецепторов на  $K^+$ -стимулируемое высвобождение  $^3H$ -D-аспарагиновой кислоты представлены в табл. 1. В диапазоне исследованных концентраций N-метиласпартат не изменял высвобождения метки из синапсом, канновая ( $10^{-4}$  и  $10^{-3}$  М) и квискваловая ( $10^{-3}$  М) кислоты снижали выход D-аспарагиновой кислоты, причем

Таблица 1

Влияние агонистов глутамат/аспартатных рецепторов и диэтилового эфира глутаминовой кислоты на  $K^+$ -стимулируемое высвобождение  $^3H$ -D-аспарагиновой кислоты из синапсом коры мозга крыс

Соединения, (М)	Количество опытов n	Высвобождение $^3H$ -D-аспарагиновой кислоты (% от контроля*)	
		A	B
Контроль	50	100,0±2,5	100,0±2,8
N-метил-DL-аспарагиновая кислота			
$10^{-6}$	4	98,6±5,6	99,6±6,2
$10^{-5}$	4	96,8±3,6	93,6±3,0
$10^{-4}$	5	102,6±3,5	93,6±4,0
$10^{-3}$	7	95,1±2,9	100,4±3,7
Канновая кислота			
$10^{-7}$	5	96,8±5,8	89,1±9,0
$10^{-6}$	10	95,8±4,3	100,1±4,5
$10^{-5}$	10	95,7±3,3	96,9±3,1
$10^{-4}$	8	73,6±6,4**	82,4±8,3
$10^{-3}$	6	58,2±2,9**	65,2±5,2**
Квискваловая кислота			
$10^{-6}$	4	104,9±3,6	104,1±7,5
$10^{-5}$	4	100,2±9,8	101,1±8,9
$10^{-4}$	6	96,3±3,1	105,6±3,1
$10^{-3}$	7	85,3±1,7**	98,1±2,2
Диэтиловый эфир глутаминовой кислоты			
$10^{-4}$	8	101,4±2,8	99,6±3,0
Квискваловая кислота $10^{-3}$ +диэтиловый эфир глутаминовой кислоты			
$10^{-4}$	6	100,0±2,2***	113,5±3,8***

Примечание. \* За 100% принято: для А—1,735±0,043, для В—1,335±0,038. \*\* — достоверность отличий от контроля ( $p < 0,01$ ), \*\*\* — достоверность отличий от эффекта 1 мМ квискваловой кислоты ( $p < 0,01$ ).

эффект квискваловой кислоты устраняли добавлением ДЭЭГ ( $10^{-4}$  М). В табл. 2 приведены результаты опытов с агонистами и антагонистами ГАМК- и бензодиазепиновых рецепторов. Эти опыты позволили, в

частности, выявить максимальные концентрации антагонистов, не оказывающие самостоятельного влияния на изучаемый процесс. Эти концентрации веществ использовали в дальнейших опытах. Как видно из приведенных данных, мусцимол и баклофен не оказывали прямого влияния на  $K^+$ -стимулируемое высвобождение D-аспарагиновой кислоты. Из данных, представленных в табл. 3, следует, что феназепам ( $10^{-1}$  M) снижает высвобождение; эффект частично устраняется Ro 15-1788 ( $10^{-1}$  M), но не изменяется в присутствии ДЭЭГ ( $10^{-1}$  M). Интересно, что мусцимол ( $10^{-1}$  M) заметно усиливал действие феназепама, причем этот эффект усиления оказался чувстви-

Таблица 2

Влияние агонистов и антагонистов ГАМК<sub>A</sub>- и бензодиазепиновых рецепторов на  $K^+$ -стимулируемое высвобождение 3H-D-аспарагиновой кислоты из синапсом коры мозга крысы

Соединения, (M)	Количество опытов	Высвобождение <sup>3</sup> H-D-аспарагиновой кислоты (% от контроля)	
		A <sup>1</sup>	B
Контроль	50	100,0±2,5	100,0±2,8
Мусцимол			
10 <sup>-5</sup>	6	99,7±4,6	107,1±3,5
10 <sup>-4</sup>	6	93,4±3,1	92,1±4,8
Бикикуллин			
10 <sup>-5</sup>	6	93,4±3,6	91,4±3,0
10 <sup>-4</sup>	7	88,2±4,6	89,5±6,9
Пикротоксин			
10 <sup>-5</sup>	5	104,0±4,4	102,9±4,2
10 <sup>-4</sup>	8	99,6±4,7	102,1±5,4
5·10 <sup>-4</sup>	4	105,4±9,6	116,0±10,1
Ro 15-1788			
10 <sup>-6</sup>	5	104,7±6,0	98,2±3,5
10 <sup>-4</sup>	5	97,4±4,4	97,4±5,9
Баклофен			
10 <sup>-5</sup>	7	108,6±4,4	100,0±4,2
1 <sup>-4</sup>	8	103,3±6,7	97,4±6,8

Примечание. A<sup>1</sup> и B—то же, что в табл. 1. \* $p < 0.05$  по сравнению с контролем.

тельным как к бикикуллину ( $10^{-5}$  M), так и к пикротоксину ( $10^{-4}$  M). Оба антагониста уменьшали эффект мусцимола приблизительно наполовину. Агонист ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов баклофен ( $10^{-5}$  M) на эффект феназепама заметного влияния не оказывал.

Полученные данные свидетельствуют о наличии ауторегуляторного механизма, контролирующего процесс высвобождения возбуждающих аминокислотных нейротрансмиттеров в коре головного мозга, что согласуется с данными, полученными Collins и соавт. [5] на срезах коры. В отличие от результатов цитируемой работы, где аутореперитор проявлял чувствительность к метиласпартату, в наших экспериментах не выявлено какого-либо эффекта этого вещества. Эти различия могут быть связаны с тем, что в опытах на срезах высвобождение нейротрансмиттера может модулироваться не только синаптическими, но и висинаптическими рецепторами. Collins и соавт. исследовали влияние квиквальной кислоты до концентрации  $5 \cdot 10^{-4}$  M и не об-

наружили эффекта [5]. Нами также не обнаружено действия этого вещества до концентрации  $10^{-4}$  М. Лишь при концентрации последнего  $10^{-3}$  М высвобождение D-аспарагиновой кислоты оказалось достоверно сниженным, причем эффект полностью устранялся ДЭЭГ, что свидетельствует о его рецепторной природе.

Имеются косвенные данные о наличии квисквалатных ауторецепторов и в других структурах мозга. Так, сообщается, что антагонист квисквалатных рецепторов ДЭЭГ способен устранять ингибирующее влияние L-глутаминовой кислоты на высвобождение  $^3\text{H}$ -D-аспарагиновой кислоты из срезов гиппокампа [3].

Таблица 3

Действие агонистов ГАМК<sub>A</sub>\*, ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов и антагонистов ГАМК<sub>A</sub>-, бензодиазепиновых и квисквалатных рецепторов на эффект феназема при К<sup>+</sup>-стимулируемом высвобождении  $^3\text{H}$ -D-аспарагиновой кислоты из синантосом коры мозга крысы

Соединения, (М)	Количество опытов	Высвобождение $^3\text{H}$ -D-аспарагиновой кислоты (% от контроля)		
		A <sup>1</sup>	I	B <sup>1</sup>
Контроль	50	100,0±2,5		100,0±2,5
Феназем				
$10^{-5}$	5	106,1±2,3		104,9±3,0
$10^{-1}$	9	87,6±3,7*		87,6±3,3*
Феназем, $10^{-1}$				
+Ro 15-1788, $10^{-1}$	8	78,7±3,5		100,0±7,0**
Феназем, $10^{-1}$				
баклофен, $10^{-5}$	7	81,9±2,7		87,3±5,0
Феназем, $10^{-1}$				
+мусцим л, $10^{-1}$	9	74,2±1,2**		91,8±2,9
Феназем, $10^{-1}$				
+мусцимол, $10^{-1}$				
-биккукулин, $10^{-5}$	12	80,1±2,7		86,9±3,2
Феназем, $10^{-1}$				
+мусцимол, $10^{-1}$				
-пикротоксин, $10^{-1}$	7	82,7±2,1		88,3±3,2
Феназем, $10^{-1}$				
+диэтиловый эфир глутаминовой кислоты, $10^{-1}$	12	84,1±1,8		90,3±3,3

Примечание. A<sup>1</sup> и B<sup>1</sup> то же, что в табл. 1; \* $p < 0,05$  по сравнению с контролем; \*\*—достоверное отличие от эффекта феназема (0,1 мМ) при  $p < 0,01$ .

Каншювая кислота, по данным большинства исследований, усиливала как спонтанное, так и стимулированное высвобождение D-аспарагиновой кислоты, а также эндогенных возбуждающих аминокислот [4, 5, 12, 13]. Этим отчасти объясняют нейротоксические свойства каншювой кислоты [2]. Однако отсутствие специфического антагониста каншюватных рецепторов не позволяет пока обосновать рецепторную природу полученного эффекта. С другой стороны, являясь агонистом одного из типов глутамат/аспаратных рецепторов, каншювая кислота, воздействуя на ауторецепторы, должна была бы, согласно принятым представлениям, тормозить высвобождение нейротрансмиттера. Наши данные подтверждают эту гипотезу. Каншювая кислота, так же как и другой агонист—квискваловая кислота, значительно снижала высвобождение D-аспарагиновой кислоты из синантосом, что согласуется с

общепринятой точкой зрения, согласно которой ауторецептор функционирует на нервном окончании по принципу отрицательной обратной связи. Трудность интерпретации результатов работ, цитированных выше, состоит, в частности, в том, что при использовании срезов нельзя исключить как внесинаптические эффекты каннтовой кислоты, так и прямое деполяризующее действие на глиальные клетки [14].

Типичный агонист ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов мусцимол в наших опытах не изменял К<sup>+</sup>-стимулируемое высвобождение D-аспарагиновой кислоты, что согласуется с данными, полученными на синапсоммах ранее [9]. Вместе с тем, в работе, выполненной на срезах коры мозга, эффект мусцимола отмечался, причем была показана его пикротоксичность [3]. Бензодиазепиновый транквилизатор феназепам, по нашим данным, уменьшал выход D-аспарагиновой кислоты, а антагонист бензодиазепиновых рецепторов Ro 15-1788 частично устранял этот эффект, что свидетельствует в пользу рецепторной природы обнаруженного явления. Имеются многочисленные данные, указывающие на функциональную связь бензодиазепиновых рецепторов с ГАМК<sub>A</sub>-, но не с ГАМК<sub>B</sub>-рецепторами [15]. Полученные нами данные по влиянию агонистов ГАМК<sub>A</sub>- и ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов (соответственно мусцимола и баклофена) на эффект феназепама, зависимость действия мусцимола от биккукуллина и пикротоксина вполне согласуются с этими представлениями и дают основание предположить существование ГАМК<sub>A</sub>-бензодиазепинового рецепторного комплекса на глутамат/аспартатергических пресинаптических терминалях коры мозга. Функциональная роль такого комплекса состоит, по всей вероятности, в модулировании высвобождения возбуждающих аминокислотных нейротрансмиттеров. Отметим, что в мозжечке ГАМК-ергическая регуляция высвобождения D-аспарагиновой кислоты осуществляется через ГАМК<sub>A</sub>-рецепторы, несвязанные с бензодиазепинчувствительными участками [16], а уменьшение высвобождения АХ из срезов коры мозга при активации ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов даже обращается диазепамом [17]. Отсюда следует, что постсинаптический ГАМК<sub>A</sub>-рецептор, являясь пресинаптическим гетерорецептором, может быть по-разному сопряжен с бензодиазепиновыми рецепторами в разных структурах мозга. Однонаправленность действия ауто- и гетеро (ГАМК)-рецепторов на высвобождение D-аспарагиновой кислоты, выявленная в наших опытах, позволяла предположить наличие их функциональной взаимосвязи, однако отсутствие эффекта ДЭЭГ на действие феназепама не подтвердило этого предположения.

Таким образом, результаты настоящей работы позволяют постулировать наличие квисквалатного и, возможно, каннтового ауторецептора, а также ГАМК<sub>A</sub>-бензодиазепинового рецепторного комплекса, функционирующих на терминалях глутамат/аспартатергических нейронов в качестве механизмов, модулирующих высвобождение возбуждающих аминокислотных нейротрансмиттеров.

# REGULATION OF NEUROTRANSMITTER RELEASE FROM GLUTAMATE/ASPARTATE NEURONS OF RAT BRAIN CORTEX BY AUTO AND HETERORECEPTORS

PRIKHOZHAN A. V., KOVALEV G. I., RAYEVSKY K. S.

Institute of Pharmacology, USSR Academy of Medical Sciences,  
Moscow

Both kainic ( $10^{-7}$  and  $10^{-8}$ ) and quisqualic ( $10^{-8}$  M) acids, but not N-methylaspartate ( $10^{-6}$ — $10^{-8}$  M) decreased  $K^{+}$  (30 mM)—stimulated release of  $^3H$ -D-aspartate from perfused rat cortex synaptosomes. GIDEE ( $10^{-1}$  M) antagonized the effect of quisqualic acid. Benzodiazepine, phenazepam ( $10^{-1}$  M) also attenuated the release, and this effect was blocked by RO 15—1788 (but not by GIDEE), and potentiated by muscimol ( $10^{-1}$  M). This latter effect was shown to be bicuculline- and picrotoxin-sensitive. The antagonists as well as muscimol and baclofen in the concentrations used exert no effect on D-aspartate release. Data are discussed in the terms of auto- and heteroregulation of the release of excitatory amino acid neurotransmitters.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Laduron P. M. *Biochem. Pharmacol.*, v. 34, p. 467—470, 1985.
2. Fonnum F. J. *Neurochem.*, v. 42, p. 1—11, 1984.
3. McBean G. J., Roberts P. J. *Nature*, v. 291, p. 593—594, 1981.
4. Ferkany J. W., Zaczek R., Coyle J. T. *Nature*, v. 298, p. 757—759, 1982.
5. Collins G. G. S., Anson J., Surtees L. *Brain Res.*, v. 265, p. 157—159, 1983.
6. Aloisi F., Gallo V., Levi G. J. *Neurosci. Res.*, v. 10, p. 141—149, 1983.
7. Schousboe A., Drejer J., Meier E. *Neuropharmacology*, v. 68, p. 369—372, 1984.
8. Collins G. G. S. *Brain Res.*, v. 190, p. 517—527, 1980.
9. Levi G., Gallo V., Raiteri M. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, v. 27, p. 127—137, 1981.
10. Davies L. P., Johnston G. A. R. *J. Neurochem.*, v. 26, p. 1007—1014, 1976.
11. Ковалев Г. И., Прихожан А. В., Раевский К. С. *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, № 11, с. 59—61, 1982.
12. Ferkany J. W., Coyle J. T. *J. Pharmacol. and Exp. Ther.*, v. 225, p. 399—406, 1983.
13. Ferkany J. W., Zaczek R., Coyle J. T. *Nature*, v. 308, p. 561, 1984.
14. Bowman C. L., Kimelberg H. K. *Nature*, v. 311, p. 656—659, 1984.
15. Haefely W. *Neurosci. Lett.*, v. 47, p. 201—206, 1984.
16. Rohde B. H., Harris R. A. *Neuropharmacology*, v. 22, p. 721—727, 1983.
17. Tanganelli S., Bianchi C., Beani L. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, v. 324, p. 34—37, 1983.

Поступила 17. V 1986

## ПРЕСНАПТИЧЕСКАЯ АУТОРЕГУЛЯЦИЯ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ГЛУТАМАТА В СТРИАТУМЕ КРЫС

ГОДУХИИ О. В., БУДАШЦЕВ А. Ю.

Институт биологической физики АН СССР, Пущино

В опытах с использованием методики локальной суперфузии мозга изучали влияние L-глутамата на высвобождение  $^3\text{H}$ -глутамата из неостриатума наркотизированных нембуталом крыс. L-глутамат в концентрациях  $10^{-8}$ — $10^{-7}$  М ингибировал вызванное  $\text{K}^+$ -деполяризацией  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимое высвобождение как предварительно захваченного  $^3\text{H}$ -глутамата, так и  $^3\text{H}$ -глутамата, образующегося из  $^3\text{H}$ -глутаминина. Тетродотоксин ( $10^{-6}$  М), а также антагонисты глутамата диэтиловый эфир глутаминовой кислоты ( $10^{-7}$  М) и D, L- $\alpha$ -аминодипиновая кислота ( $10^{-7}$  М) не устраняли ингибирующего действия L-глутамата. Результаты согласуются с представлениями о существовании в области пресинаптических глутаматергических окончаний механизма ауторегуляции высвобождения глутамата, функционирующего по принципу отрицательной обратной связи.

Регуляция нейротрансмиттером своего собственного высвобождения получила название пресинаптической ауторегуляции. Наиболее серьезно концепция пресинаптической ауторегуляции была разработана для норадренергических синапсов периферической ЦНС позвоночных [1, 2]. Были получены также данные в пользу существования ауторегуляции через пресинаптические рецепторы и в катехоламинных синапсах ЦНС позвоночных [3, 4]. Однако для синапсов ЦНС другой нейротрансмиттерной специфичности такие данные менее убедительны, а в случае глутаматных синапсов этот вопрос не исследован вообще. Тем не менее изучение возможности существования механизмов пресинаптической ауторегуляции в самых разных синапсах ЦНС имеет ключевое значение для ответа на вопрос, являются ли эти механизмы общим принципом функционирования всех синаптических образований или же это частный случай, присущий, к примеру, только катехоламинным синапсам. Изучение этого вопроса актуально сейчас еще и потому, что в некоторых последних исследованиях ставится под сомнение сам факт существования механизма регуляции процесса высвобождения, осуществляемого через пресинаптические ауторецепторы [5, 6].

В связи с изложенным, мы в своей работе попытались выяснить возможность существования механизма пресинаптической ауторегуляции высвобождения глутамата на примере кортикостриатных глутаматергических нейронов мозга крысы.

### Материалы и методы

В опытах была использована описанная нами ранее методика локальной суперфузии мозга с одновременной регистрацией электрической активности (вызванных потенциалов) из области суперфузии [7]. В ходе предварительной операции беспородным крысам-самцам массой 300—350 г стереотаксически по атласу Фифковой и

Маршалла вживляли в неостриатум направляющую трубку с регистрирующим электродом ( $AP = -1.5$ ;  $L = 3$ ;  $V = 4.5$ ), а во фронтальную кору биполярные стимулирующие электроды ( $AP = -2.5$ ;  $L = 1.5$ ). В опытах использовали только тех животных, у которых в ответ на электрическую стимуляцию фронтальной коры в области последующей суперфузии регистрировались вызванные потенциалы. В первой серии экспериментов животным предварительно в эту область через направляющую трубку вводили  $10^{-3}$  моль  $^3H$ -глутамата ( $M. A. 29 K_{II}$ /ммоль, «Amersham», Англия). Через 20 мин после введения начинали суперфузию данной области раствором Кребса-Рингера следующего состава (в мМ):  $NaCl - 126.5$ ;  $KCl - 2.4$ ;  $KH_2PO_4 - 0.5$ ;  $MgSO_4 - 1.1$ ;  $CaCl_2 - 1.1$ ;  $NaHCO_3 - 27.5$ ; глюкоза— $3.9$ . Перед суперфузией раствор насыщали карбогеном до  $pH 7.4$ . Скорость тока суперфузионной среды была равна  $50$  мкл/мин.

Во второй серии экспериментов у животных сразу начинали суперфузию неостриатума раствором Кребса-Рингера того же состава, но дополнительно содержащего  $^3H$ -глутамин ( $M. A. 20 K_{II}$ /ммоль, «Amersham», Англия), в концентрации  $10^{-6}$  М. Через 60 мин в обеих сериях экспериментов собирали 3—4 последовательные 20-минутные фракции суперфузата для последующего измерения в них уровней высвобождаемого  $^3H$ -глутамата. Уровень  $^3H$ -глутамата в первой 20-минутной фракции принимали за 100% и относительно его оценивали уровни во II—IV фракциях. Изменение концентрации  $K^+$  в среде, а также добавление фармакологических веществ проводили во время прохождения II 20-минутной фракции через мозг. При повышении концентрации  $K^+$  в среде до  $60$  мМ эквивалентно снижали концентрацию  $Na^+$ .

Измерение уровней  $^3H$ -глутамата во фракциях производили с помощью ПЖХ. Процедура разделения  $^3H$ -глутамата от продуктов его метаболизма в суперфузате и способ измерения его количества в первой серии экспериментов были описаны нами ранее [8—10]. Во второй серии экспериментов выделение и измерение  $^3H$ -глутамата, образующегося из  $^3H$ -глутаминна, проводили по методике, описанной ранее [11].

Достоверность различия уровней  $^3H$ -глутамата в собранных фракциях у сравниваемых групп животных оценивали по критерию Стьюдента. В конце экспериментов проводили морфоконтроль положения канюли и электродов.

## Результаты и обсуждение

Существующие в настоящее время данные указывают на то, что нейротрансмиттерный пул глутамата в пресинаптическом окончании пополняется как за счет его формирования из глутаминна, так и за счет обратного захвата глутамата этими окончаниями из внеклеточной среды [10]. В связи с этим мы в качестве предшественника высвобождаемого пула глутамата использовали  $^3H$ -глутамат и  $^3H$ -глутамин.

На рис. 1 показано, что добавление глутамата ( $10^{-6} - 10^{-7}$  М) к суперфузионной среде приводило к ингибированию высвобождения  $^3H$ -глутамата, вызванного высокой концентрацией калия в среде ( $K^+$ -деполяризация). Это наблюдалось как в случае высвобождения предварительно введенного экзогенного  $^3H$ -глутамата, так и высвобождения  $^3H$ -глутамата, образующегося из  $^3H$ -глутаминна. Вызванное  $K^+$ -деполяризацией высвобождение  $^3H$ -глутамата в обоих случаях зависело от наличия  $Ca^{2+}$  в суперфузионной среде. В случае предварительно введенного  $^3H$ -глутамата это было показано нами ранее [8], а данные высвобождения  $^3H$ -глутамата, образующегося из  $^3H$ -глутаминна приведены на рис. 2. С другой стороны, при спонтан-

ном высвобождении (когда отсутствуют деполяризующие стимулы, вызывающие  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимое высвобождение  $^3\text{H}$ -глутамата) экзогенный глутамат в тех же концентрациях усиливал высвобождение предварительно введенного  $^3\text{H}$ -глутамата в зависимости от концентрации глутамата в суперфузионной среде (рис. 3).

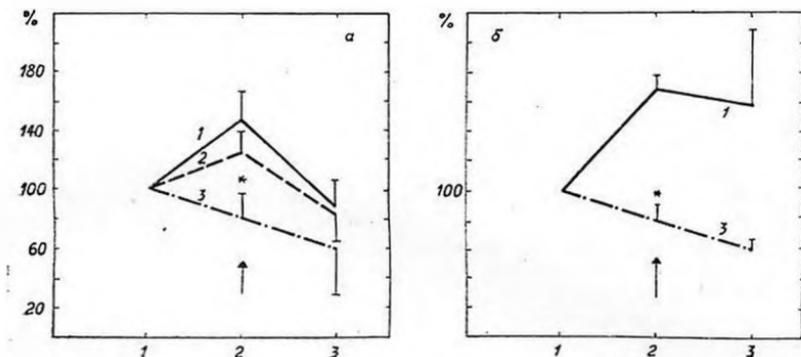


Рис. 1. Влияние глутамата на высвобождение  $^3\text{H}$ -глутамата, вызванное  $\text{K}^+$ -деполяризацией в стриатуме; а—в качестве предшественника использовали предварительно введенный  $^3\text{H}$ -глутамат, б—в качестве предшественника использовали  $^3\text{H}$ -глутамин. Здесь и далее на оси абсцисс отмечены фракции суперфузата; на оси ординат—уровень высвобождаемого  $^3\text{H}$ -глутамата (в% относительно уровня в I фракции). 1— $\text{K}^+$ -деполяризация; 2— $\text{K}^{\text{H}}$ -деполяризация+глутамат ( $10^{-8}$  М); 3— $\text{K}^+$ -деполяризация+глутамат ( $10^{-7}$  М); стрелкой отмечен уровень высвобождаемого  $^3\text{H}$ -глутамата во II фракции суперфузата. \*—различие между уровнями  $^3\text{H}$ -глутамата во II фракции суперфузата у сравниваемых групп животных достоверно ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, глутамат в концентрациях  $10^{-8}$ — $10^{-7}$  М, введенный во внеклеточную среду, ингибирует вызванное деполяризующими стимулами  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимое высвобождение как предварительно захваченного  $^3\text{H}$ -глутамата, так и  $^3\text{H}$ -глутамата, образующегося из  $^3\text{H}$ -глутаминна.

Для выяснения вопроса, оказывает ли введенный глутамат прямое действие на пресинаптические глутаматергические окончания или же он действует опосредованно через интернейроны неостриатума, в суперфузионную среду одновременно с глутаматом добавляли тетродотоксин в концентрации  $10^{-6}$  М. Как видно из табл. 1, тетродотоксин достоверно не влиял на ингибирующее действие глутамата. Известно, что это вещество в концентрации  $10^{-6}$  М блокирует проведение потенциала действия по электровозбудимой мембране и нарушает, таким образом, проведение импульса между нейронами. Поэтому сохранение ингибирующего действия глутамата при наличии тетродотоксина можно интерпретировать в пользу того факта, что экзогенный глута-

мат влияет непосредственно на пресинаптические окончания, которыми был предварительно поглощен  $^3\text{H}$ -глутамат. Таким образом, полученные данные согласуются с представлениями о том, что в глутаматных синапсах, также как и в других синапсах мозга млекопитаю-

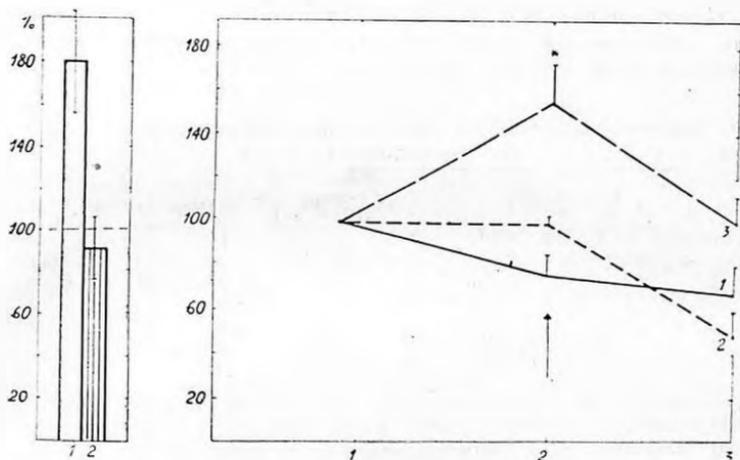


Рис. 2. Изменение высвобождаемого  $^3\text{H}$ -глутамата, образующегося из  $^3\text{H}$ -глутаминна (в%), под влиянием высокой концентрации  $\text{K}^+$  в среде (60 мМ) при прохождении II фракции через мозг. 1—при нормальной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в среде; 2—без  $\text{Ca}^{2+}$  в среде

Рис. 3. Влияние глутамата на спонтанное высвобождение предварительно введенного  $^3\text{H}$ -глутамата. 1—спонтанное высвобождение, 2—влияние глутамата в концентрации  $10^{-8}$  (показано стрелкой) на спонтанное высвобождение; 3—влияние глутамата в концентрации  $10^{-7}$  М. \*—различие между уровнями  $^3\text{H}$ -глутамата во II фракции суперфузата у сравниваемых групп достоверно ( $p < 0,05$ ).

Таблица 1

Влияние тетродотоксина на ингибирующее действие экзогенного глутамата

Воздействие	Фракция II ( $\text{K}^+$ -деполяризация, %)	Фракция III (отмывка, %)
Контроль	$153 \pm 23$	$81 \pm 17$
Глутамат ( $10^{-7}$ М)	$74^* \pm 21$	$51 \pm 28$
Глутамат ( $10^{-7}$ М) + тетродотоксин ( $10^{-7}$ М)	$102 \pm 1$	$69 \pm 20$

Примечание. \*—значение уровня высвобождаемого  $^3\text{H}$ -глутамата, достоверно ( $p < 0,05$ ) отличающееся от контрольного.

щих, существует механизм пресинаптической ауторегуляции высвобождения глутамата, функционирующий по принципу отрицательной обратной связи. Этот механизм, судя по полученным результатам, за-

висит от концентрации глутамата во внеклеточной среде и запускается достаточно низкими концентрациями внеклеточного глутамата (порядка  $10^{-8}$ — $10^{-7}$  М). Поскольку ингибированию подвергалось высвобождение как предварительно захваченного  $^3\text{H}$ -глутамата, так и  $^3\text{H}$ -глутамата, образующегося из  $^3\text{H}$ -глутамина, то это указывает на то, что мишенью действия глутамата является непосредственно процесс высвобождения нейротрансмиттера.

Таблица 2

Влияние блокаторов рецепторов глутамата на ингибирующее действие экзогенного глутамата

Воздействие	Фракция II ( $\text{K}^+$ -деполяризация, %)	Фракция III (отмывка, %)
Контроль	153±23	81±17
Глутамат ( $10^{-7}$ М)	74±21	51±28
Глутамат ( $10^{-7}$ М) + ДЭЭГ ( $10^{-7}$ М)	33±3	31±12
Глутамат ( $10^{-7}$ М) + ААК ( $10^{-7}$ М)	53±7	42±5

*Примечание.* ДЭЭГ—диэтиловый эфир глутаминовой кислоты, ААК—аминоадипиновая кислота; \*—значения уровней высвобождаемого  $^3\text{H}$ -глутамата, достоверно ( $p < 0,05$ ) отличающиеся от соответствующих контрольных.

С целью идентификации фармакологического типа рецепторов, через которые глутамат может опосредовать свое ингибирующее действие, в суперфузионную среду одновременно с глутаматом добавляли его антагонисты. Из табл. 2 видно, что ни диэтиловый эфир глутаминовой кислоты ( $10^{-7}$  М), ни D, L- $\alpha$ -аминоадипиновая кислота ( $10^{-7}$  М) не только не устраняли ингибирующее действие глутамата, но даже усиливали его. Можно предположить, что, по-видимому, ингибирующее действие глутамата не опосредовано рецепторами, чувствительными к этим антагонистам. Добавление в суперфузат одной D, L- $\alpha$ -аминоадипиновой кислоты в концентрации  $10^{-7}$  М достоверно не влияло ни на спонтанное, ни на вызванное  $\text{K}^+$ -деполяризацией высвобождение  $^3\text{H}$ -глутамата (данные не приведены). Этот факт также свидетельствует в пользу того, что ингибирующее действие глутамата опосредовано рецепторами, нечувствительными к этому антагонисту.

Таким образом, полученные результаты не позволили идентифицировать фармакологический тип рецепторов, через которые глутамат опосредует свое ингибирующее действие. Однако можно отметить, что эти рецепторы не относятся к N-метил-D-аспартичному типу, так как специфический блокатор этих рецепторов D, L- $\alpha$ -аминоадипиновая кислота [12, 13] не устраняла ингибирующего действия глутамата.

# PRESYNAPTIC AUTOREGULATION OF GLUTAMATE RELEASE IN RAT STRIATUM

GODUKHIN O. V., BUDANTZEV A. Yu.

Institute of Biophysics, USSR, Academy of Sciences, Poustchino

The effect of L-glutamate on  $^3\text{H}$ -glutamate release from neostriatum of nembuthalized rats has been studied, by means of local brain superfusion. L-glutamate ( $10^{-8}$ — $10^{-7}$ ) inhibits  $\text{K}^+$ -depolarization induced  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent release of both  $^3\text{H}$ -glutamate formed from  $^3\text{H}$ -glutamine and of applicated  $^3\text{H}$ -glutamate. Tetrodotoxin ( $10^{-6}$ ) and antagonists of glutamate: diethylester of glutamic acid ( $10^{-7}$  M) and D, L- $\alpha$ -aminoadi-  
pic acid ( $10^{-5}$  M) didn't abolish the inhibitory effect of L-glutamate. Data obtained are in agreement with the current concept of the autoregulation of glutamate release in presynaptic glutamatergic endings by feed back mechanism.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Ланжер С. Э.—В кн.: Нейротрансмиттерные системы (под ред. Н. Д. Легга), с. 38—59, М., Медицина, 1982.
2. Langer S. F. Trends Neuroscience, v. 3, № 5, p. 110—112, 1980.
3. Жарикова А. Д., Годухин О. В. Физиол. журн. СССР, т. 71, № 1, с. 105—111, 1985.
4. Старк К.—В кн.: Освобождение катехоламинов из адренергических нейронов (под ред. Д. М. Патона), с. 135—176, М., Медицина, 1982.
5. Katsner S. Fed. Proc., v. 43, p. 1358—1364, 1984.
6. Laduron P. M. Trends in Pharmac. Science, № 6, p. 459—461, 1984.
7. Годухин О. В., Жарикова А. Д. Физиол. журн. СССР, т. 65, № 1, с. 141—142, 1979.
8. Годухин О. В., Жарикова А. Д., Буданцев А. Ю. Физиол. журн. СССР, т. 68, № 6, с. 745—751, 1982.
9. Годухин О. В., Буданцев А. Ю., Селифонова О. В., Агапова В. И. Физиол. журн. СССР, т. 69, № 12, с. 1563—1568, 1983.
10. Годухин О. В., Жарикова А. Д., Буданцев А. Ю. Успехи соврем. биол., т. 95, вып. 3, с. 383—397, 1983.
11. Dolphin A. C. Brain Res., v. 252, p. 111—116, 1982.
12. Fagg G. E. Trends Neuroscience, № 3, p. 207—210, 1985.
13. Olney J. W.—In methods in Enzymology (ed. Conn P. M.), v. 103, part II. N. Y.—  
London, Acad. Press., p. 379—392, 1983.

Поступила 13. I 1986

## МНОЖЕСТВЕННЫЕ ФОРМЫ КАРДИОАКТИВНЫХ НЕЙРОГОРМОНОВ ГИПОТАЛАМУСА

ГАЛОЯН А. А., СРАПЦИОЯН Р. М., КАРАПЕТАН Р. О., АБЕЛЯН Ж. Г.,  
СААКЯН Ф. М., СААКЯН С. А., АБРАМЯН С. С., ГРИГОРЯН Л. А.,  
ОДАБАШЯН А. Б., БОЧКО И. Ф.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Ранее нами были выделены новые гормоны гипоталамо-нейрогипофизарной системы млекопитающих [1]. Первоначально было показано наличие в гипоталамической области мозга крупного рогатого скота трех коронарорасширяющих соединений, условно обозначенных «К», «С» и «Г» [2], а также их регулирующее влияние на сердечную деятельность и коронарное кровообращение [3]. Наиболее изученным является нейрогормон «С» — активный регулятор ряда метаболических процессов. Выявлено его участие в регуляции гликолитических процессов, в частности в сердечной мышце [4], и уровня циклических нуклеотидов посредством ингибирования ФДЭ сАМР [5]. Установлено ингибирующее действие нейрогормона «С» на аспарат-трансферазу [6], сАМР-зависимую протенинкиназу [7] мозга быка. Было показано, что это соединение является низкомолекулярным и, по данным масс-спектрального анализа, относится к гликопептидам [8], резистентно по отношению к денатурирующим агентам, температурным (110°) и ферментативным (протеазы) воздействиям, обнаруживает высокую стабильность к действию щелочей (1 н. NaOH) и кислот (6 н. HCl). При всех описанных условиях он сохраняет в значительной степени (до 70%) биологическую активность. Были обнаружены две молекулярные формы нейрогормона «С» [9].

Имеющиеся экспериментальные данные по изучению двух других нейрогормонов крайне ограничены и не позволяют сделать определенных выводов о биологической роли этой группы соединений.

В настоящем исследовании мы попытались изолировать в гомогенном виде множественные формы кардиоактивных нейрогормонов «К», «С» и «Г» и изучить некоторые их свойства.

### Материалы и методы

Кардиоактивные соединения выделяли двумя способами: 1) из уксуснокислого экстракта гипоталамической ткани по методу, описанному ранее [10]; 2) диссоциировали от своих белковых носителей [11].

Гель-фильтрацию низкомолекулярных соединений уксуснокислого экстракта гипоталамусов крупного рогатого скота проводили на колонках с модифицированным и немодифицированным сефадексом G-10. Глицинамидированную обработку сефадекса G-10 вели по методу Steig с некоторыми модификациями [12].

Ионообменную хроматографию проводили на колонках, заполненных ДЭАЭ-и, уравновешенных 0,005 М натрий-фосфатным буфером, pH 6,5. Применяли линейную градиентную элюцию по соответствующей схеме [13], где значительный градиент:

концентрации соли (0,02—0,5 М) сочетался с понижением рН буфера от 6,5 до 5,0. Скорость элюции составляла 20 мл/ч.

*Нисходящую хроматографию на бумаге* FN-II осуществляли в системе растворителей бутанол—уксусная кислота—вода (4:1:1,5).

*Ферментативный гидролиз* трипсином и химотрипсином проводили в аммоний-бикарбонатном буфере, рН 8, пепсином—в буферной смеси растворов муравьиной и уксусной кислот, рН 2 в течение 1—24 ч. Соотношение фермент/субстрат поддерживали 1:80.

*Кислотный и щелочной гидролиз* проводили 6 н. HCl при 110° и 1 н. NaOH при комнатной температуре в течение 1—24 ч.

*Активность ФДЭ сАМР* мозга крыс определяли по количеству гидролизованного субстрата при его инкубации с ферментом по методу Рёби [24], модифицированному применением радиоизотопного микрометода, предусматривающего разделение продуктов гидролиза с помощью входящей тонкослойной хроматографии на пластинках «Silufol UV-254» [15]. В качестве источника ФДЭ сАМР использовали супернатант гомогената (2000г, 20 мин) мозга крыс. Детально методика описана ранее [5]. Счет радиоактивности продуктов гидролиза сАМР производили на жидкостном сцинтилляционном спектрофотометре SFH—30 (Франция).

*Активность фосфоорилазы* (КФ 2.4.1.1) определяли в условиях *in vivo* по Shingworth, Cori [16]. В качестве подопытных животных использовали самцов нелинейных белых крыс массой 150—180 г, содержащихся на обычном пищевом рационе. Водные растворы препаратов кардиотропных нейрогормонов вводили животным в яремную вену в количестве 0,1 мл на животное, что соответствовало 0,05 Е биологической активности (условно за 1 единицу активности принимали то количество препарата, которое увеличивало объемную емкость крови, оттекающей из венозных сосудов сердца за единицу времени, на 100%). Через 30 мин животных декалтировали и обработку быстро извлеченных тканей и дальнейшие процедуры проводили по ранее описанной схеме [17]. Активность фосфоорилазы *б* (ФБ) вычисляли по разнице между тотальной фосфоорилазной активностью и активностью фосфоорилазы *а* (ФА). Количество неорганического фосфора определяли по методу Tausky, Shorr [18].

*Содержание гликогена* в гомогенатах ткани определяли по методу Morris [19].

*Биологическое тестирование* проводили в условиях *in situ* на кошках под уретановым наркозом по методу Morawitz, Zahn [20].

В работе были использованы следующие реактивы: трипсин («Sigma», США), сефадекс G-10 («Pharmacia», Швеция), диметилформамид («Merck», ФРГ), ДДС-Na, какодиловая кислота, водорастворимый карбонимид («Ferak», ГДР), ДЭАЭ-ц, («Whatman», Англия).

## Результаты и обсуждение

На рис. 1 приведена схема различных способов выделения множественных форм кардиотропных нейрогормонов из гипоталамуса крупного рогатого скота. Данные профиля элюции низкомолекулярных соединений уксуснокислого экстракта гипоталамуса, представленные на рис. 2, демонстрируют высокую селективность ДЭАЭ-целлюлозы. Одновременно проводимое биологическое тестирование выявило наличие нейрогормона «Г» (нГ) во фракции, элюируемой в I пике (160—180 мл). Фракция, элюируемая в IV пике, преимущественно содержала нейрогормон «С» (нС) (540—560 мл); последним элюировался нейрогормон «К» (нК)—в V пике (680—720 мл). Фракции, соответ-

ствующие пикам коронароактивности нейрогормонов, объединяли (8—9; 27—28 и 34—36) и лиофилизировали. При гель-фильтрации этих соединений на сефадексе G-25, в свою очередь, обнаруживается их гетерогенность (рис. 3) и, кроме того, отмечено появление второго пика активности в каждой из полученных коронароактивных фракций. Как видно из рис. 3, выявляются существенные различия между про-

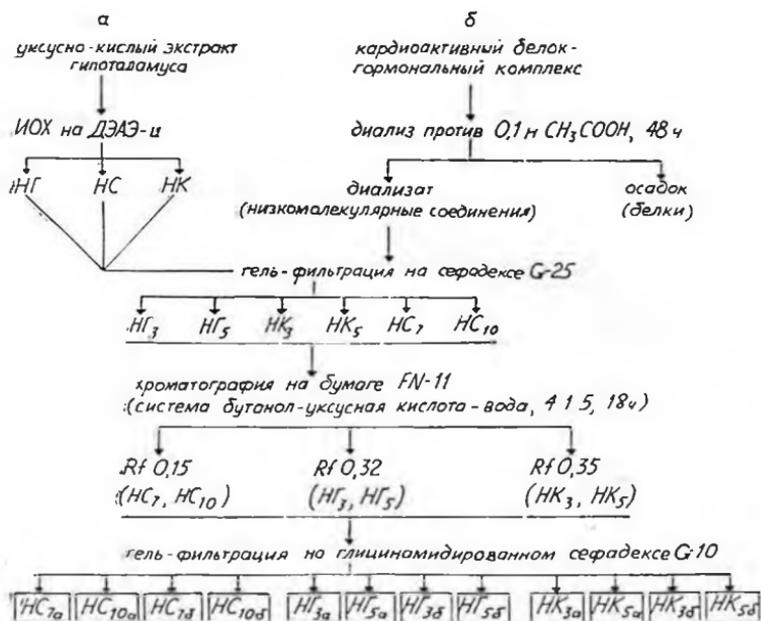


Рис. 1. Основные стадии очистки кардиоактивных нейрогормонов гипоталамуса, выделенных различными способами: а—низкомолекулярные соединения гипоталамуса, экстрагированные из ткани, б—диссоциированные от белковых носителей. В рамках обозначены конечные продукты.

цедиями фильтрации нейрогормональных фракций, проявляющиеся как в интенсивности, так и в количестве обнаруживаемых пептидных соединений (рис. 3, а и 3, б), наряду с ослаблением или исчезновением (рис. 3, а) характерного спектра поглощения при 206 нм. Уместно отметить, что замена фильтра обусловлена тем, что в случае детектирования при 280 нм элюатов, выходящих из колонки G-25 при гель-фильтрации даже концентрированных образцов NS, не обнаруживались характерные УФ-поглощающие соединения. Примечательно также, как отмечалось выше, появление II пика активности при гель-фильтрации всех кардиоактивных фракций. При разделении фракции NG, кроме характерного для него выхода в 3-м объеме элюата, отмечено наличие активности, выходящей в 5-м объеме, в случае гель-фильтрации NK, наоборот, появление, кроме соответствующей ему зоне

5-го объема, также и в 3-м объеме. При разделении фракции иС активные соединения выявлены в 7- и 10-м объемах элюата. Активные фракции условно обозначали по порядку выхода с колонки как иГ<sub>3</sub> и иГ<sub>5</sub>, иК<sub>3</sub> и иК<sub>5</sub>, иС<sub>7</sub> и иС<sub>10</sub> (рис. 1). Выявленные при детекции иС на 206 нм два спектральных пика не обладают биологической активностью. Пики активности иК, особенно одной из форм—иК<sub>5</sub>, совпада-

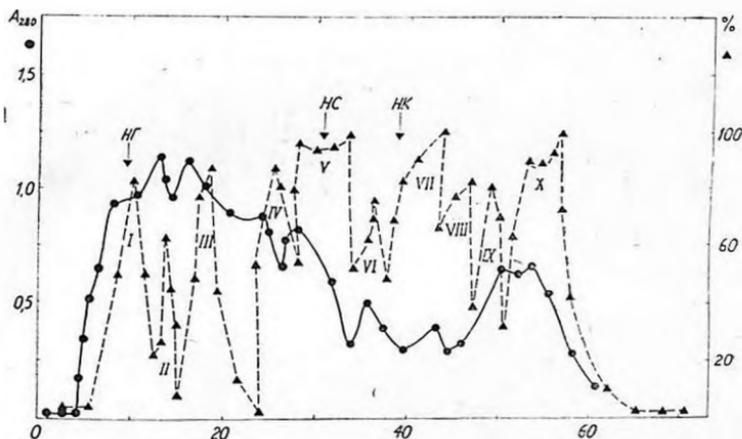


Рис. 2. Профиль элюции низкомолекулярных соединений уксуснокислого экстракта гипоталамуса крупного рогатого скота в ходе хроматографии на колонке с ДЭАЭ-ц (3×60 см). Элюцию проводили линейным градиентом 0,005 М фосфатного буфера, рН 5—6,5 со скоростью 20 мл/ч. Соединения идентифицированы измерением оптического поглощения при 280 нм (●), по степени ингибирования ФДЭ сАМР—нейрогормоном в % (▲), определением коронарорасширяющей активности (измеряли отток крови, оттекающей из венных сосудов сердца за единицу времени); стрелкой обозначены места выхода коронароактивных соединений. По оси абсцисс—номера фракций.

ют с УФ-поглощающим пиком. Аналогичный результат получен с препаратом иГ<sub>3</sub> (рис. 3, а), где отмечено полное совпадение пика активности с УФ-поглощающим соединением. Необходимо отметить, однако, что несмотря на значительную вариабельность как по количественному выходу, так и по относительному содержанию коронароактивных компонентов, описанные 6 фракций по распределительной хроматографии сгруппированы в трех зонах: для фракций иК в зоне с R<sub>f</sub>—0,35, иГ—0,32 и иС—0,15.

Исходя из полученных результатов, элюаты фракций, выявляющих коронарорасширяющую активность, были вновь подвергнуты гель-фильтрации на модифицированном сефадексе G-10, позволяющем, как было установлено ранее для иС [12], дифференцировать перекрывающиеся молекулярные кардиоактивные формы. Как видно из полученных данных, иС<sub>7</sub> дополнительно разделяется на иС<sub>7a</sub> и иС<sub>10a</sub>, а иС<sub>10</sub>—на иС<sub>7b</sub> и иС<sub>10b</sub> (рис. 1).

Изменение коронарорасширяющей активности нейрогормонов гипоталамуса под влиянием различных факторов. Исследования были проведены на препаратах, полученных на стадии гель-фильтрации ч бумажной хроматографии.

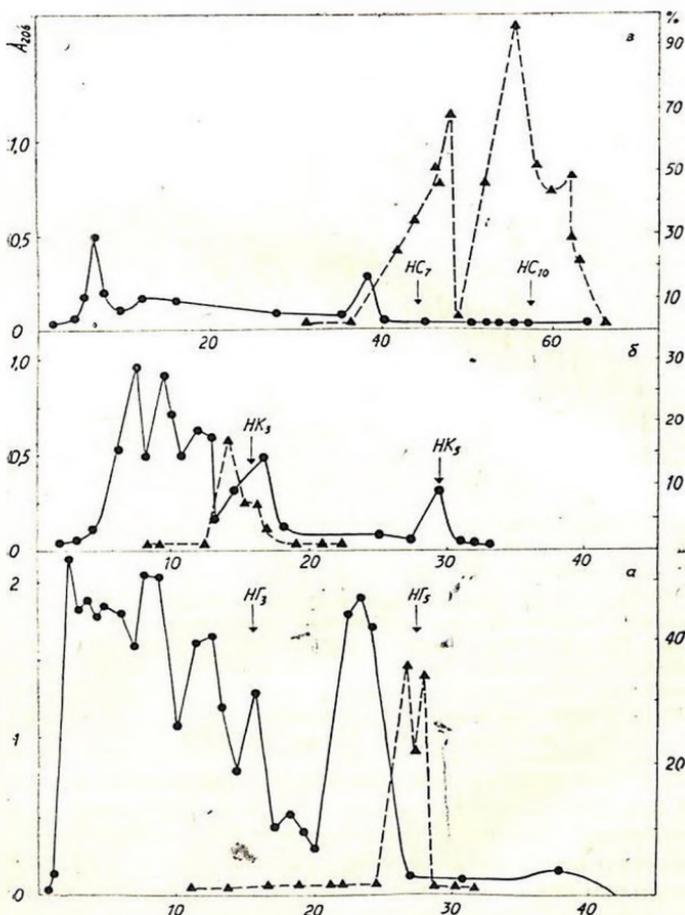


Рис. 3. Гель-фильтрация на колонке с сефадексом G-25 (3×60 см) нейрогормональных кардиоактивных соединений, полученных после ИОХ на ДЭАЭ-ц. Элюцию вели бидистиллированной водой со скоростью 40 мл/ч: а—профиль элюции нГ, б—пК, в—пС. Стрелки показывают места выхода коронарорасширяющих соединений. Обозначения те же, что на рис. 2.

Эксперименты, проведенные на кошках в условиях *in situ*, выявили различный характер воздействия внутривенно введенных нативных препаратов указанных нейрогормонов на изменение объемной емко-

сти крови, оттекающей из венозных сосудов сердца. В отличие от иС, имеющего достаточный латентный период, иГ и иК уже через 10 мин после введения увеличивают отток крови, максимум эффекта отмечается на 30- и 10-й мин соответственно и равен 150—200% по сравнению с нормой. Отсутствует характерное для иС динамичное нарастание эффекта и продолжительность действия сокращается от 4—5 до 2—3 ч.

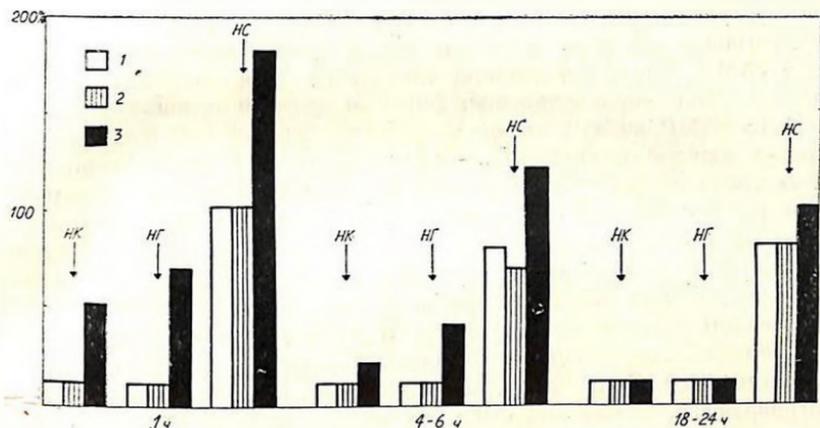


Рис. 4. Биологическая активность кардиоактивных соединений при воздействии различных факторов (%): 1—гидролиз 6 н. HCl при 110°, 2—гидролиз 1 н. NaOH при 37°, 3—протеолиз (трипсин, химотрипсин, проназа, пепсин), фермент-субстратное соотношение 1:80

В следующей серии экспериментов изучали зависимость изменения активности иГ и иК под воздействием различных факторов (температурный, кислотный, щелочной) и денатурирующих агентов. Как явствует из диаграммы, приведенной на рис. 4, иГ и иК оказались неустойчивыми к кислотным (6 н. HCl) и щелочным (1 н. NaOH) условиям, температурной обработке (до 100°), теряя полностью свою пативную активность. В зависимости от продолжительности действия ряда протеолитических ферментов (химотрипсин, трипсин, проназа) иГ и иК либо частично инактивируются (1 ч), либо полностью теряют способность расширять коронарные сосуды сердца (18—24 ч). Активность иС под действием этих факторов, как видно из диаграммы (рис. 4), не подвергается существенным изменениям.

При интерпретации полученных данных, по-видимому, прежде всего надо иметь в виду различную природу этих гормонов и важную роль углеводного компонента иС, достаточно резистентного к описанным воздействиям, в частности к протеолиту. Это объяснение допущается на основании ранее полученных данных масс-спектрального [8] и углеводного [2] анализа, свидетельствующих о гликопептидной

природе этого соединения и о гетерогенности олигосахаридной цепи углеводного компонента.

*Изменение активности фосфодиэстеразы (ФДЭ) сАМР под воздействием кардиоактивных нейрогормонов.* Исходным пунктом проведения исследований кардиотропных нейрогормонов «К» и «Г» на активность ФДЭ сАМР послужили полученные ранее данные об участии иС в регуляции внутриклеточного уровня циклических нуклеотидов путем ингибирования этого фермента [5]. Как показали результаты ИОХ уксуснокислого экстракта гипоталамической ткани на ДЭАЭ-и, этот регион мозга отличается высокой гетерогенностью ингибирующих ФДЭ сАМР (рис. 2) пептидных соединений. При этом, как видно из рисунка, пики коронарорасширяющей активности совпадают с пиками ФДЭ сАМР ингибирующей активности. Однако в ходе дальнейшей очистки каждой из нейрогормональных фракций гель-фильтрацией через сефадексе G-25 (рис. 3) пики коронарорасширяющей активности лишь в некоторых случаях совпадали с пиками ингибирующей активности (иГ<sub>5</sub>—рис. 3, а и иК—рис. 3, б), которая при этом снижалась до 38 и 17% соответственно. Ингибирующая способность иС<sub>7</sub> и иС<sub>13</sub>, наоборот, по мере очистки возрастала (рис. 3, а). Сопоставление данных свидетельствует о том, что в ряду кардиоактивных нейрогормонов иС занимает особое место по способности в значительной степени ингибировать ФДЭ сАМР мозга, за ним следует иГ, проявляющий слабее ингибирующую активность ФДЭ, что касается иК, то последний теряет указанную способность по мере очистки, присущей, по-видимому, примесным соединениям.

*Изменение активности фосфорилазы под действием кардиоактивных нейрогормонов.* Исходя из вышеописанных результатов, в частности действия кардиотропных нейрогормонов на активность ФДЭ сАМР, логично было ожидать также изменения активности фосфорилазы. Были изучены изменения в активности общей фосфорилазы и в соотношении двух форм гликогенфосфорилазы—фосфорилазы а (ФА) и б (ФБ), катализирующей распад гликогена до глюкозо-1-фосфата. Результаты исследований по изучению сдвигов в активности вышеуказанного фермента под действием некоторых форм нейрогормонов «К» и «Г» (иК<sub>5</sub> и иГ<sub>3</sub>) приведены в табл. 1, 2. Ранее были изучены данные в отношении иС [22]; мы не сочли нужным приводить их в данном сообщении. Как видно из табл. 1, внутривенная инъекция крысам иК<sub>5</sub> в количестве 0,1 мл, которая соответствует 0,05 Е биологической активности, приводила к увеличению тотальной фосфорилазной активности во всех исследуемых органах с разной интенсивностью. При этом, как показывают результаты изучения сдвигов в соотношении между ФА и ФБ, иК<sub>5</sub>, по-видимому, не оказывает влияния на переход ФА  $\rightleftharpoons$  ФБ в указанных органах, значительное же повышение активности тотальной фосфорилазы с одновременным увеличением двух форм активностей в общем балансе нуждается в дополнительном экспериментальном анализе.

Таблица 1

Влияние нейрого르몬а „К<sub>5</sub>“ на активность фосфориллазы (мкА Р<sub>i</sub> мин/г ткани), n=4

Исследуемая ткань	Общая фосфориллаза		Фосфориллаза а (ФА)		Фосфориллаза б (ФБ)		ФА ФБ	
	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
Мозг	4,25±0,8 0,05>	9,5±0,2 p > 0,01	1,0±0,2 p < 0,2	2,8±1,2	3,25±1,18 p < 0,05	6,7±1,8	0,30	0,42
Цепель	3,42±0,5 p < 0,01	10, ±0,8	1,9±0,5 p < 0,2	3,8±1,2	1,52±0,54 p < 0,01	6,7±1,1	1,25	1,52
Сердце	9,2±1,0 p > 0,01	19,8±1,3	1,0±0,2 p < 0,2	2,6±0,1	8,2±0,6 p ≤ 0,1	17,2±1,3	0,12	0,15
Мышца	5,9±1,1 p < 0,1	9,4±1,3	0,4±0,27 p < 0,1	0,7±0,3	5,5±1,3 p < 0,2	8,7±1,4	0,07	0,08
Почка	3,6±0,8 p < 0,02	7,2±0,5	1,3±0,4 p < 0,1	2,5±0,7	2,3±1,4 p ≤ 0,5	4,7±1,3	0,56	0,53

Таблица 2

Влияние нейrogормона „Г<sub>3</sub>“ на активность фосфорилазы (мка Р; мннг ткани), n=5

Исследуемая ткань	Общая фосфорилаза		Фосфорилаза а (ФА)		Фосфорилаза б (ФБ)		ФА ФБ	
	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
Мозг	4,2±0,8	6,6±0,5	1,0±0,2	2,9±0,6	3,2±1,1	3,7±0,8	0,30	0,78
	p>0,1		p>0,01		p>0,5			
Печень	3,4±0,5	6,3±1,4	1,9±0,5	2,3±1,0	1,5±0,5	4,6±0,5	1,25	0,57
	p>0,005		p>0,5		p>0,1			
Сердце	9,2±1,0	9,7±0,7	1,0±0,2	3,6±1,5	8,2±0,5	6,1±0,5	0,12	0,60
	p<0,5		p>0,1		p<0,5			
Мышца	5,9±1,1	7,2±0,8	0,1±0,2	5,2±3,0	5,5±1,3	2,0±1,1	0,07	2,60
	p≤0,1		p>0,1		p<0,5			
Почка	3,6±0,8	5,0±1,0	1,3±0,36	2,9±1,0	2,3±1,4	2,1±1,0	0,56	1,38
	p>0,05		p>0,2		p>0,2			

Под действием  $n\Gamma_3$  четкие изменения наблюдаются в мозгу и скелетной мышце (табл. 2), где на фоне значительного увеличения общего баланса фосфорилазной активности прослеживаются сдвиги в сторону нарастания активности ФА. Нарастание активности ФА, хотя и не столь интенсивное, отмечается также в почках. Известно существование нескольких путей регуляции этого фермента [23]; в данном случае, по-видимому, имеет место ковалентная модификация, проявляющаяся в изменении коэффициента ФА/ФБ. Значительное увеличение коэффициента ФА/ФБ отмечается также в сердечной мышце, где на фоне неизменяющейся общей активности фосфорилазы  $n\Gamma_3$  активирует фермент, переводя его из формы Б в форму А. Полученные результаты позволяют в известной степени судить об усилении гликогенолиза в этих органах. Подтверждением этого предположения, наряду с вышеописанными фактами, послужили данные по изучению изменения содержания гликогена в сердце и скелетной мышце, где отмечается его понижение с  $391,0 \pm 11,5$  до  $151,0 \pm 27,5$  (на 60%) и  $476 \pm 94$  до  $277 \pm 88$  (на 42%) соответственно.

Согласно полученным данным, последовательность процессов, происходящих в этих органах в результате действия  $n\Gamma_3$ , можно представить следующим образом. Увеличение коэффициента ФА/ФБ обуславливает гликогенолиз, приводящий к понижению запасов гликогена в этих тканях. С другой стороны, известно, что механизм адренергической стимуляции гликогенолиза *in vivo* включает повышение синтеза сАМР, который ускоряет активацию киназы фосфорилазы с последующим переходом ФА в ФБ. [24, 25]. Выявленное нами увеличение содержания сАМР в мозгу вследствие ингибирования активности ФДЭ, под действием  $n\Gamma_3$  хорошо коррелирует с увеличением коэффициента ФА/ФБ, происходящим под его же действием. В свете изложенного становится объяснимой также характерная связь между указанными метаболическими сдвигами и кардиотропным эффектом нейрогормона «Г».

Участие  $nK_3$  и  $n\Gamma_3$  в регуляции гликогенолиза в ряде висцеральных органов, судя по полученным данным, очевидно. Отмеченные же различия между действиями этих гормонов можно объяснить, по-видимому, их структурными особенностями.

Резюмируя приведенные данные, можно заключить о существовании множественных форм кардиоактивных нейрогормонов, предполагая их структурное, молекулярное и биологическое различия, исходя из полифункциональной значимости. Однако это допущение нуждается в дальнейшей экспериментальной аргументации, вплоть до расшифровки химической структуры.

# MULTIPLE FORMS OF CARDIOTROPIC NEUROHORMONES FROM HYPOTHALAMUS

GALOYAN A. A., SRAPIONYAN R. M., KARAPETYAN R. O., ABELYAN J. G.,  
SAAKYAN F. M., SAAKYAN C. A., ABRAMYAN S. S., GRIGORYAN L. A.,  
ODABASHYAN A. B., BOCHIKO I. F.

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

The multiple form of the earlier discovered cardiotropic neurohormones „K“, „C“ and „G“ have been purified from bovine hypothalamus. The multiple forms mentioned differ in molecular weight, biological activity and effect on the activity of cAMP PDE and on that of phosphorylase in brain and other organs.

The detection and identification of these compounds makes it possible to reevaluate their involvement in the regulation of metabolic processes in brain and visceral organs.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Галоян А. А. Докл. АН АрмССР, т. 34, с. 109—151, 1962.
2. Галоян А. А. Вопр. биохимии мозга, Изд-во АН АрмССР, т. 3, с. 291—311, 1967.
3. Галоян А. А. Вопр. биохимии мозга, Изд-во АН АрмССР, т. 13, с. 9—38, 1978.
4. Галоян А. А., Алексанян Р. А. Докл. АН АрмССР, т. 58, с. 183—186, 1974.
5. Галоян А. А., Гурвиц Б. Я., Погосян М. А. Вопр. биохимии мозга, Изд-во АН АрмССР, т. 11, с. 89—97, 1976.
6. Галоян А. А., Галстян Р. Г., Алексанян Р. А. Биол. журн. Армении, т. 28, с. 79—81, 1975.
7. Галоян А. А., Кирикосова А. С., Сарибекян Г. А., Марукян Т. Х. Докл. АН АрмССР, т. 64, с. 242—246, 1976.
8. Галоян А. А., Срапионян Р. М., Медведев Ф. А. Докл. АН АрмССР, т. 66, с. 302—305, 1978.
9. Галоян А. А., Срапионян Р. М., Карапетыан Р. О., Саакян Ф. М., Саакян С. А., Сарибекян Г. А. Докл. АН АрмССР, т. 67, с. 176—179, 1978.
10. Галоян А. А., Алексанян Р. А. Докл. АН АрмССР, т. 37, с. 157—160, 1963.
11. Срапионян Р. М., Джамбазян Т. А., Галоян А. А. Вопр. биохимии мозга, Изд-во АН АрмССР, т. 6, с. 157—160, 1970.
12. Chen M., Creig S., Stoner J. Biochemistry, v. 11, p. 3559—3563, 1972.
13. Срапионян Р. М., Саакян С. А., Галоян А. А. Вопр. биохимии мозга, Изд-во АН АрмССР, т. 11, с. 97—106, 1976.
14. Poch G., Kukowetz W. R. Life Sci., v. 10, p. 133—141, 1971.
15. Бериташвили Д. Р., Кафцани К. А. Вопр. мед. химии, т. 21, с. 322—329, 1975.
16. Pillingworth B., Cori C. T. Biochem. Preparations, v. 3, p. 1—9, 1953.
17. Срапионян Р. М., Саакян С. А., Абелян Ж. Г., Галоян А. А. Нейрохимия, т. 1, с. 36—42, 1982.
18. Tayssky H. K., Shorr E. J. Biol. Chem., v. 202, p. 672—683, 1953.
19. Morris D. E. Science, v. 107, p. 254—262, 1948.
20. Morawitz P. L., Zahn A. Deutsch. Klin. Med., v. 116, p. 364—397, 1914.
21. Срапионян Р. М., Саакян С. А., Галоян А. А. Нейрохимия, т. 2, с. 263—271, 1983.
22. Парсидинян Г. К., Абелян Ж. Г., Галоян А. А. Докл. АН АрмССР, т. 66, с. 164—167, 1978.

23. Lieve F., Glinsmann W. H. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 50, p. 872—878, 1973.
24. Posner J. B., Stern R., Krebs E. G. J. Biol. Chem., v. 210, p. 982—985, 1965.
25. Namik D. H., Mayer S. E. Mol. Pharmacol., v. 4, p. 61—69, 1968.

Поступила 25. II 1986

УДК 577.112.017.23:612.82+577.112.4

## О НАЛИЧИИ НЕЙРОСПЕЦИФИЧЕСКОГО БЕЛКА S-100 В ЛАМИННО-ПОРОВОМ КОМПЛЕКСЕ ЯДЕР КЛЕТОК МОЗГА И ЕГО ВЛИЯНИИ НА ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ ЯДЕРНОЙ МЕМБРАНЫ

КАПРАЛОВ А. А., ТЮЛЕНЕВ В. И., БЕЛНИК Я. В.

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

Показано, что белок S-100 входит в состав ламинно-порового комплекса ядер мозга. Под влиянием этого белка увеличивается фосфорилирование белков ядерных мембран мозга. Это происходит главным образом за счет белков с величиной  $M_r$  около 70 кД. Наряду с этим обнаружены белковые фракции, фосфорилирование которых в этих условиях уменьшается. Высказывается предположение, что действие белка S-100 на белки ядерных мембран и ламинно-порового комплекса обуславливает усиление ядерно-цитоплазматического транспорта РНК и увеличение активности АТРаза ядерных мембран в его присутствии.

В предыдущей работе [1] показано, что нейроспецифический белок S-100 усиливает ядерно-цитоплазматический транспорт РНК и увеличивает активность АТРаза ядерных мембран. Важную роль в процессе транспорта РНК играет ядерная оболочка. Ее особенностью является наличие ламинно-порового комплекса—слоя, прилежащего к внутренней ядерной мембране и морфологически отличающегося от нее [2]. Установлено, что ламинно-поровый комплекс принимает участие в процессах переноса РНК из ядра в цитоплазму [3]. В его состав входит АТРаза ядерных мембран, необходимая для транспорта РНК [4]. Добавление к ядрам антител против обогащенной поровым комплексом фракции ингибирует транспорт РНК и активность АТРаза ядер [5]. В связи с этим можно предположить, что, если белок S-100 участвует в регуляции транспорта РНК, он может входить в состав ламинно-порового комплекса.

Регуляция белком S-100 транспорта РНК и активности АТРаза может осуществляться посредством воздействия его на процесс фосфорилирования—дефосфорилирования. Так, имеются данные о том, что белок S-100 увеличивает уровень фосфорилирования ряда ядерных белков [6, 7].

Целью настоящей работы было выяснение возможности локализации белка S-100 в ламинно-поровом комплексе и изучение его влияния на фосфорилирование белков ядерных мембран.

### Материалы и методы

Белок S-100, клеточные ядра мозга и печени и ядерные мембраны клеток мозга крыс получали ранее описанными методами [1]. Ламинно-поровый комплекс из ядер печени крыс выделяли по методу Дуэга [8]. Для получения ламинно-порового комплекса мозга использовали серое вещество мозжечка быка. При этом применяли в основном тот же метод, однако для лучшей очистки растворы, применяемые для экстракции мембран, были взяты в объемах, превышающих в 2 раза те, которые указаны в литературе для ядер печени [8]. При получении ламинно-порового комплекса из мозга время обработки препарата ДНКазой увеличили до 45 мин, затем проводили по две экстракции растворами тритона X-100 и 1 М NaCl и дополнительно препарат обрабатывали 2 М NaCl.

Для изучения фосфорилирования белков мембран использовали фракции ядерных мембран. Фосфорилирование исследовали по методу Reginal, Rapport [6]. Инкубационная среда содержала 50 мМ трис-HCl (pH 7,5), 25 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мг белка ядерных мембран, 40 мкг белка S-100, 10 мкМ [<sup>32</sup>P] АТФ (2,2 · 10<sup>7</sup> имп/мин/пробу). Конечный объем инкубационной среды составлял 0,3 мл. Контролем служили пробы, содержащие, помимо указанных компонентов, 5% ТХУ. Реакцию начинали добавлением АТФ после 3-минутной преинкубации проб при 37°, с АТФ пробы инкубировали 10 мин при той же температуре. После остановки реакции и центрифугирования осадки промывали еще 3 раза раствором, содержащим 10% ТХУ и 3% пирофосфата натрия. Липиды экстрагировали, используя хлороформ-метанол [9]. Для определения радиоактивности использовали сцинтилляционную жидкость ЖС-1 и жидкостный сцинтилляционный счетчик «Intertechnique SL—30» (Франция). В части опытов аликвоты полученных фракций использовали для электрофореза. Электрофорез белков проводили по методу Laemmli [10]. В качестве разделяющего использовали гель, содержащий градиент концентрации акриламида 8—22%, а в качестве концентрирующего—3%-ный акриламид (длина геля 15—20 см). После окончания электрофореза гели фиксировали в течение 15 ч в растворе, содержащем 45%-ный метанол, 10%-ную уксусную кислоту и красили 1 ч в растворе, содержащем 0,25%-ный Кумасси бриллиантовый голубой G-250, 45%-ный метанол, 10%-ную уксусную кислоту, затем отмывали 7%-ной уксусной кислотой. Реакцию иммунодиффузии проводили по методу, описанному Гусевым, Цветковым [11]. В исследованиях использовали специфическую кроличью антисыворотку, полученную к бычьему белку S-100 [12]. Определение липидов проводили по методу Duce, Bessman [13]. белка—методом Lowry и соавт. [14], разделение РНК и ДНК проводили по методу Schmidt, Thannhauser [15], РНК определяли реакцией с орцином [15], ДНК—реакцией с дифениламинном [16].

### Результаты и обсуждение

Выделенные нами препараты ламинно-порового комплекса ядер мозга практически не содержали фосфолипидов, что свидетельствует об отсутствии в них мембранных загрязнений. О чистоте выделенных препаратов свидетельствует отсутствие на электрофореграммах полос, соответствующих гистонам (рис. 1). Необходимо, однако, отметить, что в составе наших препаратов обнаружено много белковых полос, хотя, по данным литературы, при электрофорезе ламинно-порового комплекса, полученного из других органов, найдено три белка с ве-

личной  $M_r$  около 68 кД и значительное число минорных белков, среди которых выделяется белок с  $M_r$  около 140 кД [8, 17, 18]. Использование для получения ламинно-порового комплекса мозга двух экстракций ядерных мембран тритоном X-100 и 1 М NaCl, а также одной экстракции 2 М NaCl не изменяет белкового спектра. В связи с этим можно предположить, что обнаруженные нами различия в белковом составе ламинно-порового комплекса печени и мозга обусловлены тканевой специфичностью (рис. 1). Следует отметить, что электрофореграммы ламинно-порового комплекса печени, полученного в наших условиях, соответствуют литературным данным [17, 18].

Таблица

Состав фракций, полученных при выделении ламинно-порового комплекса из мозга

Фракции	ДНК/белок	РНК/белок
Ядерная	$0,223 \pm 0,004$	$0,070 \pm 0,005$
Ядерные мембраны	$0,123 \pm 0,017$	$0,256 \pm 0,001$
Ламинно-поровый комплекс	$0,075 \pm 0,007$	$0,078 \pm 0,002$

Проведенные исследования показали, что отношения ДНК/белок и РНК/белок в выделенных нами из мозга препаратах выше, чем в ламинно-поровых комплексах из других тканей (таблица). По литературным данным, эти отношения для легких составляют 0,02 и 0,04, для эндометрия—0,02 и 0,01 [19]. В печени, по данным различных авторов, эти отношения равны 0,016 и 0,13 [19] и 0,04 и 0,02 [20]. Предположив, что отличия наших препаратов ламинно-порового комплекса могут быть обусловлены его недостаточной чистотой, мы выделили эту структуру из очищенного через градиент сахарозы препарата ядерных мембран мозга. При электрофорезе белков были обнаружены фракции, отсутствующие в ламинно-поровом комплексе печени. Отношения ДНК/белок и РНК/белок и в этом случае отличаются от подобных отношений для других тканей (0,069 и 0,073). Таким образом, можно сделать вывод, что по своей структурной организации и, возможно, по взаимодействию с другими компонентами ядра ламинно-поровый комплекс мозга отличается от подобных структур других тканей.

В выделенном нами препарате ламинно-порового комплекса мозга обнаружен белок S-100 (рис. 2), который, по-видимому, входит в состав этой структуры, хотя полностью исключить возможность загрязнения наших препаратов белками других компонентов ядра не представляется возможным в связи с отсутствием функциональных тестов: целостности ламинно-порового комплекса.

В следующей серии опытов было изучено влияние белка S-100 на фосфорилирование белков ядерных мембран. Используемый в наших опытах препарат мембран имел следующий состав: белки—79%, фосфолипиды—15%, РНК—5%, ДНК—1%, что в общем соответст-

вует данным литературы для мембран других тканей [21]. Из рис. 3 видно, что в отсутствие белка S-100 в ядерных мембранах имеется ряд белков, которые могут фосфорилироваться эндогенными протеинкиназами. Установлено, что в ядерных мембранах печени существует, по крайней мере, 13  $^{32}\text{P}$ -меченых продуктов с  $M_r$  от 3 до 120 кД [21]. В наших опытах при добавлении белка S-100 фосфорилирование белков ядерной мембраны стимулируется на 67% (с 3020 до 5057 имп/мин на 1 мг белка). Это происходит, главным образом, за счет белков с  $M_r$  около 70 кД (рис. 3). Показано, что фосфопротеины с по-

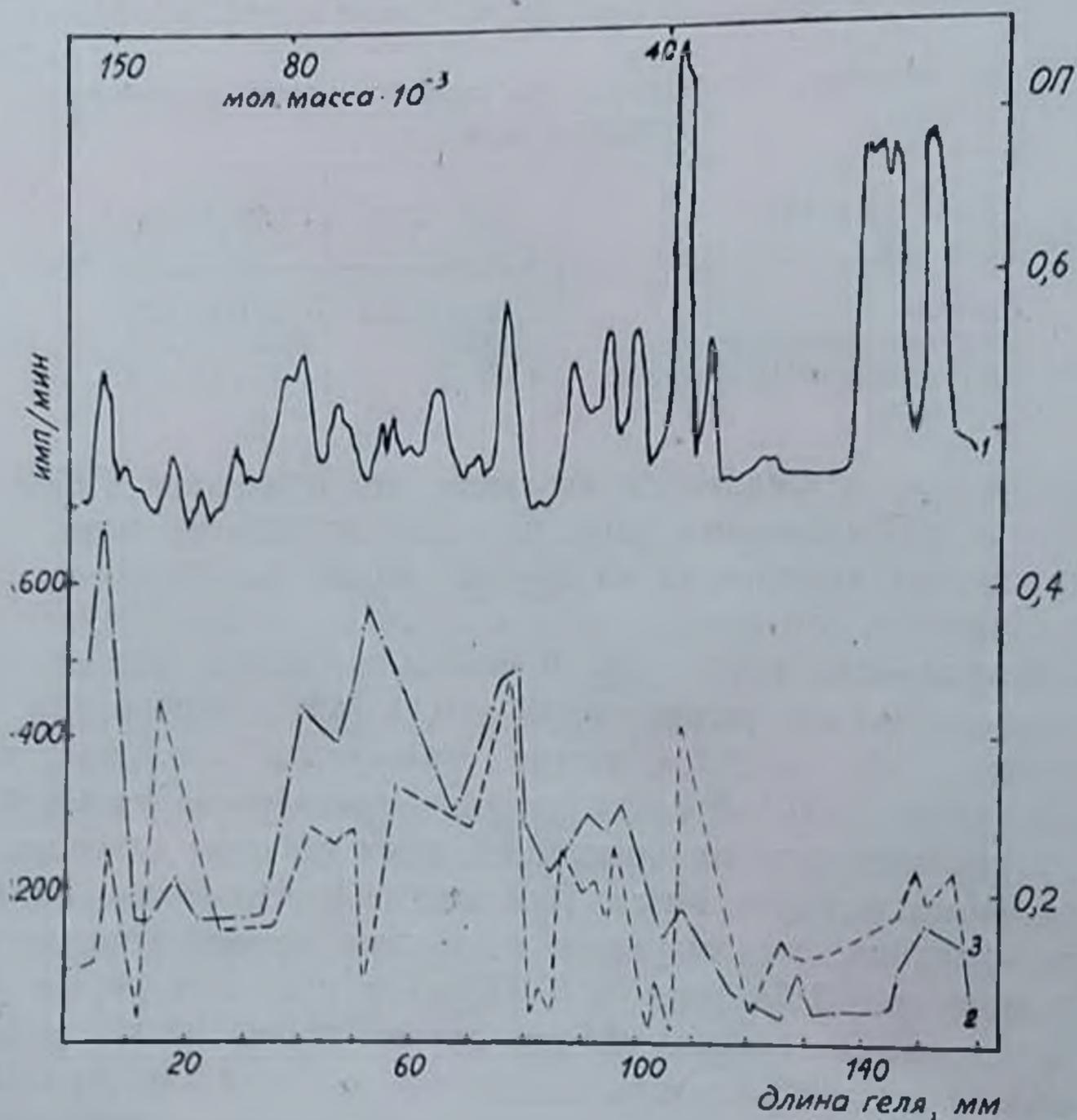


Рис. 3. Электрофореграмма белков ядерных мембран и их фосфорилирование. 1—денситограмма электрофореза; 2—фосфорилирование в отсутствие белка S-100; 3—фосфорилирование в присутствии белка S-100

добной величиной  $M_r$  входят в состав ламинно-порового комплекса ядер печени. При получении этой структуры из ядерных мембран печени в ней обнаруживаются фосфопротеины с  $M_r$  51, 59 и 70 кД [21]. В составе ламинно-порового комплекса печени крысы обнаружена также протеинкиназа [22]. Таким образом, можно предположить, что белок S-100 влияет на фосфорилирование белков этой структуры. Из рис. 3 видно, что существует фракция белков, фосфорилирование которых уменьшается в присутствии белка S-100. Вероятно, это можно объяс-

нить влиянием белка S-100 на фосфопротенифосфатазу, которая входит в состав ядерных мембран [23]. В то же время в составе ламинно-порового комплекса печени фосфопротенифосфатаза не обнаружена [22]. Надо отметить, что кальмодулин не влияет на фосфорилирование белков ядерных мембран, то есть действие белка S-100 на фосфорилирование белков этой структуры специфично. Данные литературы о том, что величина  $M_r$  главного компонента нуклеозидтрифосфатазы ядерной оболочки 46 кД [24] и наши результаты об увеличении в присутствии белка S-100 фосфорилирования белков ядерной мембраны с подобной  $M_r$  позволяют предположить, что существует определенная взаимосвязь между увеличением в присутствии белка S-100 активности АТФазы ядерных мембран и фосфорилированием белков.

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что нейроспецифический белок S-100 входит в состав ламинно-порового комплекса. Можно предположить, что его влиянием на белки этой структуры и обусловлено усиление ядерно-цитоплазматического транспорта РНК и увеличение активности АТФазы ядерной мембраны. Действие белка S-100 на функционирование ядерной мембраны может быть обусловлено изменением фосфорилирования белков этих мембран.

## LOCALIZATION OF A NEUROSPECIFIC S-100 PROTEIN IN BRAIN NUCLEAR PORE-LAMINA AND ITS ACTION ON PHOSPHORYLATION OF NUCLEAR MEMBRANE PROTEINS

KAPRALOV A. A., TYULENEV V. I., BELIK Ya. V.

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

S-100 protein was detected in brain nuclear pore-lamina. Application of this protein increased phosphorylation of brain nuclear membrane proteins—mainly of those with molecular weight of about 70 kDa. It was also discovered that phosphorylation of some protein fractions decreased. It was suggested that S-100 protein intensifies release of RNA from nucleus into cytosol and enhances ATPase activity in nuclear membrane.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Капралов А. А., Тюленев В. И., Назаренко В. И. Нейрохимия, т. 5, № 2, с. 219—220, 1986, (деп. в ВИНТИ, № 3112—1386).
2. Gerace L., Blobel G. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., v. 4, № 2, p. 967—978, 1982.
3. Purrelo F., Burnham D. B., Goldfine I. D. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Biol. Sci., v. 80, № 5, p. 1189—1193, 1983.
4. Agutter P. S., McGaldin B., McArdle H. J. Biochem. J., v. 182, № 3, p. 811—819, 1979.
5. Baglla F. A., Maul G. G. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Biol. Sci., v. 80, № 8, p. 2285—2289, 1983.

6. *Perumal A. S., Rapport M. M.* Life Sci., v. 22, № 9, p. 803—808, 1978.
7. *Тюленев В. Н., Капралов А. А., Смерчинская Л. С., Белик Я.-В.* Биохимия, т. 48, № 5, с. 827—831, 1983.
8. *Dwyer N., Blobel G. J.* Cell. Biol., v. 70, № 3, p. 581—591, 1976.
9. *Folch J., Lees M., Stanley G. N. S. J.* Biol. Chem., v. 226, № 1, p. 497—509, 1957.
10. *Laemmli U. K.* Nature, v. 227, № 5259, p. 680—685, 1970.
11. *Гусев А. А., Цветков В. С.* Лаб. дело, № 2, с. 43—45, 1961.
12. *Смерчинська Л. С., Белик Я. В., Сироватська Л. П., Бірнлло Т. М.* Укр. біохім. журн., т. 48, № 3, с. 609—614, 1976.
13. *Dyce B. S., Bessman S. P.* Environ. Health, v. 27, № 2, p. 205—207, 1973.
14. *Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* Biol. Chem., v. 193, № 2, p. 265—275, 1951.
15. *Георгиев Г. П.*—В кн.: Химия и биохимия нуклеиновых кислот, с. 74—120, Л., Медицина, 1968.
16. *Giles K. W., Miles A.* Nature, v. 206, № 4979, p. 93—94, 1965.
17. *Agutter P. S., Kathleen B.* Exp. Cell. Res., v. 124, № 2, p. 453—460, 1979.
18. *Krohne G., Franke W. W., Scheer U.* Exp. Cell. Res., v. 116, № 1, p. 85—102, 1978.
19. *Agutter P. S., Birchall K.* Exp. Cell. Res., v. 124, № 3, p. 754—760, 1979.
20. *Aaronson R. P., Blobel G.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Biol. Sci., v. 72, № 3, p. 1007—1011, 1975.
21. *Smith Ch. D., Wells W. W. J.* Biol. Chem., v. 258, № 15, p. 9360—9367, 1983.
22. *Steer R. C., Goueli S. A., Wilson M. J., Ahmed K.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 92, № 3, p. 919—925, 1980.
23. *Steer R. C., Wilson M. J., Ahmed K.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 89, № 4, p. 1082—1087, 1979.
24. *Clawson G. A., Woo Ch., Button J., Smuskler E. A.* Biochemistry, v. 23, № 15, p. 3501—3503, 1984.

Поступила 29. XII 1985

УДК 577.175.82:616—003.725

## ВЛИЯНИЕ ЭТАНОЛА НА ВОССТАНОВЛЕНИЕ ЯНТАРНОГО ПОЛУАЛЬДЕГИДА В НЕКОТОРЫХ СТРУКТУРАХ МОЗГА КРЫС

КАНУНИНЦОВА Н. П.

Институт биохимии АН БССР, Гродно

Изучено влияние этанола на восстановление янтарного полуальдегида (ЯПА), предшественника гамма-оксимасляной кислоты (ГОМК), в некоторых структурах мозга крыс. Показано, что через 30 мин после введения этанола (3,5 г/кг, внутрибрюшинно) активность редуктазы не изменяется при условии насыщения ее коферментом и субстратом. Однако изучение кинетических параметров этой реакции позволило выявить снижение  $K_m$  и для кофермента, и для субстрата в больших полушариях мозга на фоне уменьшения кажущейся максимальной скорости окисления NADPH и в больших полушариях, и в базальных ганглиях. В опытах *in vitro* обнаружено снижение активности редуктазы в больших полушариях, но только в присутствии высоких концентраций этанола (0,1—1,0 M). При этом  $K_m$  для субстрата увели-

гена и в базальных ганглиях, и в больших полушариях, а  $K_m$  для кофермента снижена в больших полушариях. Полученные данные свидетельствуют о сложном комплексном влиянии алкоголя на образование ГОМК, в котором участвуют как прямые, так и опосредованные эффекты этанола.

В механизмах действия этанола на ЦНС существенную роль играют вызываемые им изменения активности нейромедиаторных систем мозга, в частности, ГАМК-ергической системы [1, 2], причем влияние этанола может проявляться на различных звеньях ГАМК-системы. Одной из возможных точек приложения действия алкоголя может быть так называемый «ГАМК-шунт» — путь переаминирования ГАМК в ЯПА с последующим превращением в янтарную кислоту или ГОМК. Ферменты метаболизма ЯПА являются NAD- или NADP-зависимыми, поэтому изменение соотношения окисленных и восстановленных форм этих коферментов, которое наблюдается при алкогольной интоксикации, может приводить к изменениям образования ГОМК.

ГОМК является нормальным метаболитом нервной ткани [3]. Неясно пока, какое физиологическое значение имеет эндогенная ГОМК, однако введение больших количеств этого соединения животным или человеку вызывает развитие бокового положения и сна. В последние годы было установлено существование в мозгу человека и животных специфического фермента образования ГОМК—ЯПА-редуктазы [4—6]. Восстановление ЯПА может осуществляться и другим ферментом, так называемой «неспецифической» ЯПА-редуктазой (альдегидредуктазой I или альдегидредуктазой с высокой  $K_m$ ) [6, 7]. Известно, что эта «неспецифическая» ЯПА-редуктаза, в отличие от специфической, весьма чувствительна к действию барбитуратов, антиконвульсантов, бензодиазепинов [4, 7, 8]. Исходя из того, что у «неспецифической» ЯПА-редуктазы  $K_m$  для ЯПА лишь в 6 раз больше, чем у специфической, можно предположить активное участие этой «неспецифической» редуктазы в поддержании постоянного уровня ГОМК, например, при алкогольной интоксикации, с целью уменьшения ее влияния на функциональную активность ЦНС.

В связи с вышесказанным нам представлялось целесообразным изучить влияние этанола на активность «неспецифической» ЯПА-редуктазы в отдельных структурах головного мозга.

### Материалы и методы

Эксперименты выполнены на белых беспородных крысах-самцах массой 160—200 г. Животным вводили 3,5 г/кг этанола внутривенно за 30 мин до декапитации. В опытах *in vitro* этанол добавляли в среду инкубации за 5 мин до добавления субстрата.

Животных декапитировали, извлекали мозг и выделяли базальные ганглии, большие полушария и ствол мозга [15]. Навески тканей гомогенизировали (1:20, масса/объем) в  $\text{Na}^+$ -фосфатном буфере, 10 мМ, рН 7,0, содержащем 0,5 мМ 2-меркаптоэтанола, и центрифугировали 1 ч при 0—4° 25000g. Полученную надосадочную жидкость использовали в качестве источника фермента [8]. Среда инкубации содержала  $\text{Na}^+$ -фосфатный буфер—100 мМ; 2-меркаптоэтанол—0,5 мМ;

NADPH—0,1 мМ; ЯПА—0,5 мМ и 200 мкл надосадочной жидкости (примерно 0,4 мг белка), рН среды 7,0. Субстратом для реакции служил ЯПА, полученный из диформилсукцината («Calbiochem—Behring Ltd»). Об активности фермента судили по уменьшению поглощения NADPH при 340 мμ. Для определения кинетических параметров в пробы добавляли 100 мкМ NADPH и ЯПА в концентрациях 50—1000 мкМ при определении кажущейся  $K_m$  для субстрата или же 500 мкМ ЯПА и различные концентрации NADPH (5—100 мкМ) при определении кажущейся  $K_m$  для кофермента. Предварительно было установлено, что фермент проявляет свою активность только в присутствии NADPH, но не NADH. Обработку данных проводили методом линейного регрессионного анализа графиков Вульфа-Хофста на ЭВМ [16, 17]. Белок определяли по Lowry и соавт. [18].

### Результаты и обсуждение

Литературные данные о влиянии этанола на образование и метаболизм ГОМК немногочисленны. В работе Gold, Roth [12] не было обнаружено изменений количества  $^3\text{H}$ -ГОМК, образовавшейся из  $^3\text{H}$ -ГАМК после введения алкоголя. Однако эти авторы не измеряли скорости метаболизма ГОМК. Позднее было показано отсутствие эффектов этанола (200 мМ) на скорость восстановления ЯПА цитозолем, полученным из ткани мозга, с NADH как кофактором [13], однако в последние годы установлено, что наилучшим или даже единственным кофактором при восстановлении ЯПА является NADPH. Anderson и соавт. [14] не обнаружили изменений восстановления ЯПА в присутствии этанола до 200 мМ, они определяли этот показатель в цитозоле, полученном из гомогената, приготовленного на 0,32 М сахарозе с последующим центрифугированием. Возможно, при этом были удалены формы редуктаз, чувствительные к действию нейротропных препаратов.

Введение этанола в наркотической дозе (3,5 г/кг) не вызывает достоверных изменений скорости восстановления ЯПА в присутствии насыщающих концентраций ЯПА и NADPH ни в одном из исследованных отделов мозга крыс (табл. 1). Однако при изучении кинетических

Таблица 1  
Влияние этанола *in vivo* на активность „неспецифической“ ЯПА-редуктазы (имоль/мг белка/мин) (n=6)

Структуры мозга	Контроль	Этанол
Базальные ганглии	4,32±0,34	4,02±0,54
Большие полушария	5,11±0,47	4,61±0,66
Ствол	5,29±0,61	4,35±0,95

параметров этой реакции обнаружено снижение кажущейся  $K_m$  и для субстрата, и для кофермента в больших полушариях мозга, тогда как в базальных ганглиях и стволе эти показатели не изменяются (табл. 2). При этом наблюдается также снижение кажущейся величины  $V$  окисления кофермента в базальных ганглиях и больших по-

Таблица 2

Влияние этанола *in vivo* на кинетические параметры «неспецифической»  
ЯПА-редуктазы в структурах мозга крыс

Ингредиенты	Исследуемые показатели	Базальные ганглии		Большие полушария		Стол	
		контроль	этанол	контроль	этанол	контроль	этанол
NADPH (5-100 мкМ)	$K_m$ (мкМ)	9,5±2,4	12,0±0,8	27,3±0,5	14,2±0,9***	19,8±3,0	19,9±0,5
	$V$ (нмоль мг белка/мин)	4,52±0,36	3,31±0,37*	6,54±0,22	3,50±0,39***	4,75±0,96	3,48±0,13
ЯПА (50-1000 мкМ)	$K_m$ (мкМ)	210±8	2,0±7	2,0±12	168±8*	188±6	188±11
	$V$ (нмоль мг белка/мин)	5,45±0,34	5,88±0,34	5,93±0,63	6,19±0,53	6,56±0,38	6,95±0,69

Примечание. Здесь и в табл. 3 значения  $K_m$  и  $V$  определяли по Вульффу-Хофсту, используя метод линейного регрессивного анализа. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

лушарных мозга при отсутствии изменений скорости восстановления субстрата.

В условиях *in vitro* в базальных ганглиях присутствие различных концентраций этанола не сопровождается достоверными изменениями скорости восстановления ЯПА. В то же время в больших полушариях восстановление ЯПА замедляется, но только в присутствии высоких (0,1—1,0 М) концентраций алкоголя (рисунок).

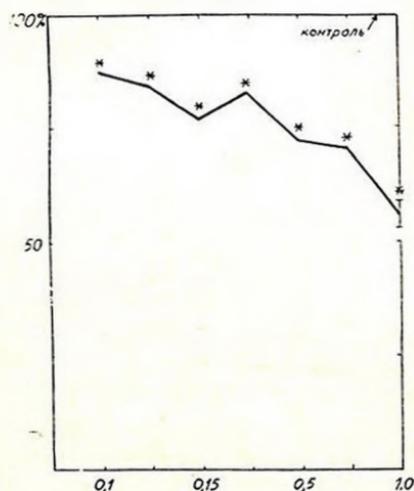


Рис. Влияние этанола *in vitro* на активность «неспецифической» ЯПА-редуктазы (контроль принят за 100%) в больших полушариях мозга крыс. По оси абсцисс — концентрация этанола (М), по оси ординат — активность фермента (%): \* $p < 0,05$

Окисление NADPH в присутствии насыщающей концентрации ЯПА и различных концентраций кофактора показывает отсутствие изменений кажущейся  $K_m$  для кофактора в базальных ганглиях, тогда как в больших полушариях ее значение уменьшается, что, наряду с отсутствием изменений  $V$ , вероятно, свидетельствует об увеличении средства редукасты к коферменту (табл. 3). Изучение кинетических параметров восстановления ЯПА в присутствии насыщающей концентрации NADPH и различных концентраций субстрата выявляет увеличение кажущейся  $K_m$  в базальных ганглиях и в больших полушариях мозга при отсутствии изменений кажущейся величины  $V$ .

Таким образом, изучение кинетических параметров реакции восстановления ЯПА позволяет более четко выявить эффекты этанола, определить характер этого влияния и возможные механизмы действия. Так, после введения алкоголя в организм не обнаруживается изменений редуктазной активности в мозгу в присутствии насыщающих концентраций субстрата и кофермента. При добавлении этанола в среду инкубации скорость восстановления ЯПА уменьшалась в больших полушариях, но только в случае высоких концентраций спирта.

В то же время кинетические константы изменяются заметным образом под влиянием этанола. Уменьшение кажущейся максимальной скорости окисления NADPH в условиях целостного организма, по-видимому, подтверждает данные об изменении соотношения окисленных

и восстановленных форм NAD и NADP по действию этанола, что является существенным моментом в неспецифических эффектах последнего [19, 20]. И хотя по данным Lopes-Cardozo, Albers [21], изменение этого соотношения не играет существенной роли в регуляции активности ГАМК—ГОМК-шунта на уровне ГАМК-Т, оно может внести нарушения на уровне дегидрогеназы и редуктазы ЯПА. Уменьшение же кажущейся  $K_m$  для кофермента на этом фоне может носить компенсаторный характер. Кажущаяся  $K_m$  для ЯПА на фоне введения алкоголя в организм снижается в больших полушариях, что может быть как следствием индукции редуктазной активности ткани повышенными количествами альдегидов, образующихся в присутствии этанола, так и компенсаторной активацией фермента, направленной на поддержание постоянного уровня ГОМК в мозгу. Добавление же этанола в инкубационную среду приводит, возможно, к конкурентным

Таблица 3

Влияние этанола *in vitro* (250 мМ) на кинетические параметры «неспецифической» ЯПА-редуктазы

Ингредиенты	Показатели	Базальные ганглии		Большие полушария	
		контроль	этанол	контроль	этанол
NADPH (5—100 мкМ)	$K_m$ (мкМ)	14,2±1,0	14,7±0,6	17,1±1,4	11,8±0,4**
	V (нмоль/мг белка/мин)	3,64±0,44	3,12±0,25	3,09±0,38	2,42±0,12
ЯПА (5)— 1000 мкМ)	$K_m$ (мкМ)	72,0±1,4	133,0±5,0***	83,0±5,0	149,0±5,5***
	V (нмоль/мг белка/мин)	3,14±0,1	3,41±0,21	2,13±0,2	2,62±0,17

отношениям между субстратом и этанолом, так как кажущаяся V не изменяется, а кажущаяся  $K_m$  для субстрата увеличивается.

Итак, полученные нами данные свидетельствуют о том, что этанол оказывает определенное воздействие на процессы образования ГОМК, наиболее выраженное в больших полушариях мозга. Воздействие это комплексное и складывается, вероятно, не только из влияния алкоголя на окисление NADPH и конкуренции с ЯПА. В условиях целостного организма в регуляцию этих процессов включаются, по-видимому, нарушения обмена других альдегидов, а также влияния, направленные на поддержание гомеостаза ГОМК. Дальнейшее изучение эффектов этанола на очищенных альдегидредуктазах позволит уточнить характер взаимоотношений между этанолом и ГОМК и их вклад в проявления алкогольной интоксикации на деятельности ЦНС.

# EFFECT OF ETHANOL ON SUCCINIC SEMIALDEHYDE REDUCTION IN RAT BRAIN REGIONS

KANUNNIKOVA N. P.

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of BSSR, Grodno

The influence of ethanol on reduction of succinic semialdehyde (SSA), the precursor of gamma-hydroxybutyric acid (GHBA), in some rat brain regions has been studied. At saturating concentrations of cofactor (NADPH) and substrate (SSA) the reductase activity was not changed in basal ganglia, big hemispheres and brain stem 30 min after the injection of alcohol (3,5 g/kg, i. p.), but the study of the kinetic parameters of this reaction showed a decrease in  $K_m$  for both the substrate and the cofactor in big hemispheres and basal ganglia. In *in vitro* experiments, a decrease in the reductase activity was obtained, but it was detectable only with the large dose of alcohol (0,1–1,0 M); the  $K_m$  for the substrate increased in basal ganglia and hemispheres, but the  $K_m$  for the cofactor decreased in hemispheres. Data obtained show a complex influence of alcohol, involving both direct and indirect effects, on the formation of GHBA in rat brain.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Сутинский Н. А. Биохимические основы действия этанола на центральную нервную систему, М., Медицина, 1980.
2. Hunt W. A. Neurosciences and Biobehav. Rev., v. 7, p. 87–95, 1983.
3. Roth R. H., Giarmar N. G. Biochem. Pharmacol., v. 19, p. 1087–1093, 1970.
4. Cash C. D., Maitre M., Mandel P. J. Neurochem., v. 33, p. 1169–1175, 1979.
5. Rumigny J. F., Maitre M., Cash C. D., Mandel P. FEBS Lett., v. 117, p. 111–116, 1980.
6. Turner A. J., Tipton K. F. Biochem. J., v. 13, p. 765–772, 1972.
7. Cromlish J. A., Flynn F. G. J. Neurochem., v. 44, p. 1485–1493, 1985.
8. Whittle S. R., Turner A. J. Biochim. et biophys. acta, v. 657, p. 94–105, 1981.
9. Kaufman E. E., Nelson Th., Goochee Ch., Sokoloff L. J. Neurochem., v. 32, p. 699–712, 1979.
10. Snead O. C., Liu Chun-Che. Biochem. Pharmacol., v. 33, p. 2587–2590, 1984.
11. Gessa G. L., Vargui L., Crabai F., Boero C., Caboni F., Camba R. Life Sci., v. 5, p. 1921–1930, 1966.
12. Gold B. J., Roth R. H. J. Neurochem., v. 28, p. 1039–1073, 1977.
13. Rivett A. J., Smith J. L., Tipton K. F. Biochem. Pharmacol., v. 30, p. 741–747, 1981.
14. Anderson P. A., Ritzmann R. F., Tabakoff B. J. Neurochem., v. 28, p. 633–639, 1977.
15. Glowinsky J., Iversen L. L. J. Neurochem., v. 13, p. 655–669, 1966.
16. Hofstee F. H. J. Nature, v. 184, p. 1296–1298, 1959.
17. Wilkinson G. N. Biochem. J., v. 80, p. 324–332, 1961.
18. Lowry O. H., Rosebrough N. G., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., v. 193, p. 265–275, 1951.
19. Lieber C. S. Sci. Amer., v. 234, p. 25–33, 1976.
20. Островский Ю. М., Садовник М. И.—В кн.: Итоги науки и техники. Токсикология, т. 13, с. 93–150, М., ВИНТИ, 1984.
21. Lopes-Cardozo M., Albers R. W. J. Neurochem., v. 33, p. 1259–1265, 1979.

Поступила 31. X 1985

## ИНТЕНСИВНОСТЬ ПРОЦЕССА УТИЛИЗАЦИИ $\alpha$ -КЕТОГЛУТАРАТА И СОДЕРЖАНИЕ НЕКОТОРЫХ СВЯЗАННЫХ С НИМИ СУБСТРАТОВ В РАЗЛИЧНЫХ ОТДЕЛАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

РОЗАНОВ В. А., БЕЗАМАУТА С.

Одесский медицинский институт им. Н. И. Пирогова

Исследовали  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназную и ГАМК- $\alpha$ -кетоглутаратаминотрансферазную активность в гомогенатах и митохондриально-синапсомной фракции мозжечка, коры и стволовой части головного мозга крыс. Судя по соотношению максимальных энзиматических активностей в митохондриях мозжечка ГАМК-шунт может обеспечивать превращение 1/4, а в коре—1/8—1/10 части потока  $\alpha$ -кетоглутарата. Митохондриальная ГАМК-Т составляет 80% от всей определяемой активности при пересчете на мг белка. Отношение глутамат/ГАМК в митохондриально-синапсомной фракции приближается к 1, а в постмитохондриальном супернатанте составляет 3,5—4,0. Полученные данные важны с точки зрения уточнения механизмов метаболического контроля ГАМК-шунта в ЦНС и разработки подходов его направленной регуляции.

Метаболическому пути глутамат→ГАМК→янтарный полуальдегид (ЯПА)→сукцинат принадлежит роль шунта регулируемой  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназной реакции, лимитирующей стадии цикла трикарбоновых кислот [1, 2], что является специфической особенностью нервной ткани и отражает ее повышенные компенсаторные возможности. Благодаря исследованиям Balazs [3, 4], сформировалось представление о том, что 8—10% потока субстратов цикла трикарбоновых кислот на стадии  $\alpha$ -кетоглутарата ( $\alpha$ -КГ) в ткани мозга может подвергаться превращениям в цепи альтернативных реакций ГАМК-шунта.

В то же время, особенности функционирования ГАМК-шунта и количественная оценка его вклада в биоэнергетику в различных морфо-функциональных образованиях мозга остаются во многом неясными. Одним из целесообразных методических этапов в решении этих вопросов является сопоставление максимальных активностей ферментных систем, катализирующих альтернативные метаболические превращения, в частности  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназного комплекса ( $\alpha$ -КГДК) и ГАМК- $\alpha$ -кетоглутаратаминотрансферазы (ГАМК-Т). Такое исследование представляет также интерес с точки зрения последующего анализа возможных механизмов контроля ГАМК-шунта как самостоятельного метаболического пути.

Исходя из этих соображений нами предпринято исследование, в ходе которого определялась активность  $\alpha$ -КГДК и ГАМК-Т, а также содержание ГАМК и глутамата в гомогенатах, грубой митохондриальной фракции и постмитохондриальном супернатанте мозжечка, коры и стволовой части головного мозга крыс.

## Материалы и методы

Исследования проводили на половозрелых крысах линии *Wistar* (самки и самцы) массой 180—200 г. Животных декапитировали, головной мозг быстро извлекали, освобождали от мозговых оболочек и сосудистых сплетений. На холоду отделяли мозжечок, изогнутыми ножницами снимали кору, остальную (стволовую) часть брали в опыт целиком. В гомогенатах отделов мозга определяли активность  $\alpha$ -КГДК феррицианидным методом [5]. ГАМК-активность — по приросту глутамата [6], содержание ГАМК и глутамата — методом хроматографии на бумаге.

С целью получения митохондриальной фракции из ткани отделов головного мозга и последующего определения  $\alpha$ -КГДК-активности, материал, полученный от 3-х животных, объединяли и гомогенизировали (1:10) на холоду в среде выделения, содержащей 0,225 М маннитола, 0,075 М сахарозы и 0,1 мМ ЭДТА, а также 2% (по объему) свежей сыворотки крови кролика.

Этапы выделения включали 10-минутное центрифугирование гомогенатов при 4000g, последующее центрифугирование полученной налосадочной жидкости в течение 15 мин при 11000g и промывку осадка при тех же условиях. Осадок митохондрий и синантосом ресуспендировали в среде разрушения, содержащей 0,02 М раствор калий-фосфатного буфера, pH 7,4; 0,33% (по весу) дезоксихолата и  $1 \cdot 10^{-4}$  М фенол-метилсульфонилфторида и подвергали троекратному замораживанию-оттаиванию в жидком азоте в течение 30—40 мин. В последующем активность фермента определяли в лизате митохондрий и синантосом.

При определении активности  $\alpha$ -КГДК инкубационная среда содержала: (в мМ)  $K^+$ -фосфатный буфер—100; NAD—1,0; CoA-SH—0,4; дитиотрейтол—0,5; тиаминпирофосфат—0,1;  $MgCl_2$ —1,0;  $\alpha$ -кетоглутарат—2,0. Реакцию начинали добавлением лизата митохондрий и синантосом, содержащего 80—200 мг белка. В контрольную пробу не вносили субстрат окисления. Активность фермента выражали в имоль окисленного субстрата в мин на мг белка или на 1 г ткани.

При определении ГАМК-Т активности в субфракциях ткани мозга среда выделения содержала те же компоненты, что и в нервном случае, а также 0,1 М трис-ацетатного буфера, pH 8,2. Условия фракционирования были аналогичными. Осадок митохондрий и синантосом ресуспендировали в среде разрушения, содержащей 0,1 М трис-ацетатного буфера, 0,1% тритона X-100 и выдерживали 30 мин при 0—4°. Далее определяли ГАМК-Т-активность по ранее описанному методу [6] и содержание ГАМК и глутамата в лизированной митохондриально-синантосомной фракции и постмитохондриальном супернатанте методом хроматографии на бумаге.

При определении содержания ГАМК и глутамата в митохондриально-синантосомной фракции и постмитохондриальном супернатанте средой выделения служил 0,15 М  $K^+$ ,  $Na^+$ -фосфатный буфер pH 7,0. Условия выделения были аналогичными. Результаты исследований обработаны статистически по методу Стьюдента.

## Результаты и обсуждение

Как видно из табл. 1., величины максимальной активности двух ферментных систем, катализирующих альтернативные реакции утилизации  $\alpha$ -КГ, существенно различаются. Во всех трех исследованных отделах головного мозга скорость окисления  $\alpha$ -КГ под действием дегидрогеназного комплекса превышает скорость его трансаминирования с ГАМК. В то же время, при сравнении отделов мозга наблюдается значительное и достоверное преобладание ГАМК-Т-активности в мозжечке над аналогичным показателем в коре, в то время как наиболее высокая  $\alpha$ -КГДК-активность отмечается в коре. Вследствие такой неравномерности в распределении активности обоих ферментов (ствол

в обоих случаях занимает промежуточное положение) превышение дегидрогеназной активности над трансаминазой в мозжечке достигает 2,6 раза, в стволе—4,3 раза, а в коре—6,9 раз. Таким образом, при сравнении различных отделов мозга видно, что в гомогенатах мозжечка вклад ГАМК-шунта в превращения  $\alpha$ -КГ более значителен, чем в гомогенатах коры.

Таблица 1

Максимальная  $\alpha$ -КГДК- и ГАМК-Т-активность и содержание ГАМК и глутамата в гомогенатах 3-х отделов головного мозга крыс (n=8—10)\*

Показатель и единицы измерения	Морфо-функциональные отделы мозга		
	мозжечок	кора	ствол
$\alpha$ -КГДК-активность (нмоль $\alpha$ -КГ · г <sup>-1</sup> ткани · мин <sup>-1</sup> )	950,0±45,0	1242,0±55,0	1085,0±39,0**
ГАМК-Т-активность (нмоль глутамата · г <sup>-1</sup> · мин <sup>-1</sup> )	364,0±26,0*	186,0±13,0	252,0±11,0*
Содержание глутамата (мкмоль/г ткани)	8,86±0,41	9,76±0,40	8,22±1,02
Содержание ГАМК (мкмоль/г ткани)	2,06±0,23	2,30±0,17	3,08±0,21**

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3 при расчете достоверности различий в качестве объекта сравнения взят минимальный показатель; \* p<0,001, \*\* p<0,01.

Следует отметить, что мозжечок, где наблюдается максимальная интенсивность утилизации ГАМК, характеризуется наиболее низким ее содержанием (табл. 1). Наиболее высокое содержание ГАМК отмечается в стволовой части мозга, включающей богатые ГАМК подкорковые образования [7]. Различия в содержании глутамата в отделах мозга менее выражены (отмечается тенденция к более высокой его концентрации в коре мозга), однако при расчете соотношения глутамат/ГАМК обнаруживается, что в мозжечке и коре оно составляет 4,3—4,2, а в стволе—2,7.

Несколько иные закономерности и соотношения выявлены в митохондриально-синапсомной фракции исследуемых отделов головного мозга. Как видно из табл. 2, наиболее высокая активность  $\alpha$ -КГДК определялась в митохондриях стволовой части мозга, а минимальная активность—в мозжечке (как и при определении активности в гомогенатах). ГАМК-активность в митохондриях различных отделов головного мозга крыс (в полном соответствии с результатами ее определения в гомогенатах) распределяется следующим образом: мозжечок > ствол > кора. При этом в митохондриях коры и мозжечка сохраняется примерно такое же соотношение между максимально определяемой  $\alpha$ -КГДК- и ГАМК-Т-активностью, как и в гомогенатах этих отделов мозга (близкое к 3 в мозжечке и к 7 в коре). В то же время в митохондриях, выделенных из стволовой части мозга, превышение  $\alpha$ -КГДК-активности над ГАМК-Т-активностью достигает 8, что при-

мерно вдвое превышает результат, полученный при изучении этих показателей в гомогенатах.

Таким образом, если судить по максимальной активности двух альтернативных ферментных систем, в митохондриях мозжечка ГАМК-шунт способен обеспечивать превращение примерно 1/4 потока  $\alpha$ -КГ, а в коре и структурах ствола—лишь 1/8—1/10, что приближается к данным Balazs [3, 4].

Таблица 2

$\alpha$ -КГДК- и ГАМК-Т-активность и содержание ГАМК и глутамата в лирированной митохондриально-синаптической фракции из различных отделов головного мозга крыс (n=6—10)

Показатель и единицы измерения	Морфо-функциональные отделы мозга		
	мозжечок	кора	ствол
$\alpha$ -КГДК-активность (нмоль NADH <sub>2</sub> ·мг <sup>-1</sup> белка·мин <sup>-1</sup> )	51,78±	70,08±	92,24±
	8,06	3,76	13,60
р	<0,05	<0,05	<0,05
	16,14±	10,80±	11,48±
ГАМК-Т-активность (нмоль глутамата·мг <sup>-1</sup> белка·мин <sup>-1</sup> )	0,59	0,55	1,31
	<0,001	>0,05	>0,05
Содержание глутамата (нмоль·мг <sup>-1</sup> белка)	20,83±	20,17±	18,57±
	7,92	6,91	4,56
р	>0,05	>0,05	>0,05
	23,00±	22,00±	13,00±
Содержание ГАМК (нмоль·мг <sup>-1</sup> белка)	4,27	3,72	2,27
	<0,05	<0,05	<0,05

Таблица 3

ГАМК-Т-активность и содержание ГАМК и глутамата в постмитохондриальном супернатанте различных отделов головного мозга крыс (n=8—10)

Показатель и единицы измерения	Морфо-функциональные отделы мозга		
	мозжечок	кора	ствол
ГАМК-Т-активность (нмоль глутамата·мг <sup>-1</sup> белка·мин <sup>-1</sup> )	2,20±	1,40±	2,05±
	0,30	0,14	0,36
р	<0,05	>0,05	>0,05
	159,83±	177,88±	156,75±
Содержание глутамата (нмоль·мг <sup>-1</sup> белка)	13,63	14,82	16,80
	>0,05	<0,05	<0,05
Содержание ГАМК (нмоль·мг <sup>-1</sup> белка)	56,43±	52,00±	61,00±
	7,65	6,17	6,12
р	>0,05	>0,05	>0,05

В связи с этим представляет интерес оценка интенсивности ГАМК-трансаминазной реакции вне митохондрий, где  $\alpha$ -кетоглутарат-дегидрогеназная активность, целиком связанная с митохондриями, отсутствует, но имеется значительная аминотрансферазная активность [8].

Как видно из табл. 3, постмитохондриальный супернатант по сравнению с митохондриальной фракцией мозга характеризуется на порядок более низкой активностью ГАМК-Т и соответственно в 2—3 и 8—9 раз более высоким содержанием ГАМК и глутамата (в пересчете на 1 мг белка). Полученные данные указывают на преимущественно митохондриальную локализацию ГАМК-Т и относительно низкое содержание взаимосвязанных с ней аминокислот в митохондриях. Следует обратить внимание на своеобразное распределение ГАМК и глутамата в митохондриальной фракции мозга и в супернатанте. Как видно из табл. 2, в митохондриальной фракции уровни ГАМК и глутамата примерно равны, в то же время во внемитохондриальном компартменте уровень глутамата в 3—4 раза превышает уровень ГАМК, что соответствует их соотношению в гомогенатах.

Подводя итоги сказанному, следует подчеркнуть, что наблюдаемые в гомогенатах соотношения между глутаматом и ГАМК обусловлены их содержанием во внемитохондриальном компартменте, в то время как соотношения между ферментативными активностями ( $\alpha$ -КГДК и ГАМК-Т) обусловлены митохондриальными показателями. Это особенно хорошо заметно, если произвести расчет активности ферментов и содержания аминокислот на супернатант и митохондрии из расчета на 1 г исходной ткани (рисунок). Оказалось, что постмитохондриальный супернатант содержит на порядок больше ГАМК и глутамата, чем митохондрии из того же количества исходной ткани. В то же время, учитывая малый объем митохондриальной и, особенно, синаптической фракции, концентрации субстратов могут быть совершенно иными. Однако независимо от этого отношение глутамат/ГАМК в митохондриально-синаптической фракции приближается к 1, а в постмитохондриальном супернатанте составляет 3,5—4. Поскольку глутамат является продуктом ГАМК-трансаминазной реакции, можно предположить, что его высокий уровень в постмитохондриальном супернатанте лимитирует активность фермента. С другой стороны, учитывая значения  $K_m$  для ГАМК и  $\alpha$ -КГ (соответственно 1,5 и 0,25 мМ) [9], что приближается к физиологическим концентрациям ГАМК [7] и значительно превышает концентрации  $\alpha$ -КГ [10], можно высказать предположение, что фактором, лимитирующим ГАМК-Т-активность, является концентрация  $\alpha$ -КГ. В связи с этим, вполне логичным представляется обнаруженный нами относительно большой вклад ГАМК-шунта в утилизацию  $\alpha$ -КГ именно в мозжечке, где активность  $\alpha$ -КГДК минимальная и наиболее вероятно участие  $\alpha$ -КГ в ГАМК-Т-реакции (рисунок).

При анализе данных, приведенных на рисунке, обращает на себя внимание почти полное совпадение обнаруженных уровней содержания аминокислот в митохондриально-синаптической фракции и супернатанте с их содержанием в гомогенатах и значительное расхождение суммарных показателей ферментативной активности в соответствующих субфракциях и гомогенатах, особенно в мозжечке. Вероят-

нее всего, это связано с потерями ферментативной активности вследствие удаления части фермента с ядерной фракцией и обрывкам клеток, а также возможным изменением соотношения эндогенных регуляторов активности в ходе препаративной обработки ткани, что имеет особое значение для регулируемого фермента  $\alpha$ -КГДК. Для выяснения истинных причин наблюдаемого несоответствия нужны

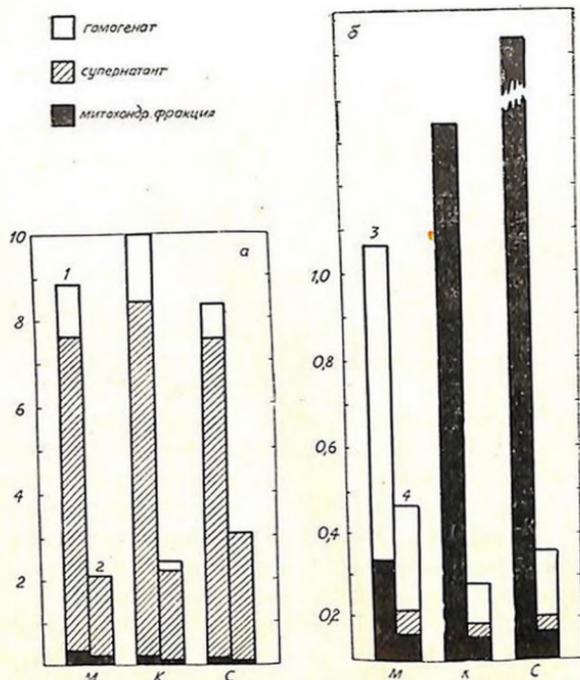


Рис. Распределение ГАМК-Т- и  $\alpha$ -КГДК-активности и содержания ГАМК и глутамата в митохондриально-синаптической фракции, постмитохондриальном супернатанте и гомогенатах различных отделов головного мозга крысы при расчете на 1 г исходной ткани. а — распределение глутамата (1) и ГАМК (2), б — распределение  $\alpha$ -КГДК-(3) и ГАМК-Т-активности (4); М — мозжечок К — кора, С — ствол мозга. По оси ординат: а — мкмоль г<sup>-1</sup> ткани мозга, б — мкмоль г<sup>-1</sup> ткани мозга · мин<sup>-1</sup>

дополнительные исследования. С другой стороны, обнаруженные соотношения между содержанием ГАМК в синаптической-митохондриальной фракции и супернатанте, совпадающие с данными литературы [11] и подтверждаемые сведениями о крайне незначительной скорости спонтанного выхода ГАМК из субклеточных структур [12] убеждают в адекватности методических подходов.

В целом, полученные данные представляют интерес для дальнейшего уточнения механизмов метаболического контроля ГАМК-шунта в ЦНС и разработки подходов его направленной регуляции.

## THE RATE OF 2-OXOGLUTARATE UTILIZATION AND SOME RELATED COMPOUNDS CONTENT IN DIFFERENT REGIONS OF RAT BRAIN

ROZANOV V. A., BEZAMANOVA G.

N. I. Pirogov Medical School, Odessa

The oxidation of 2-oxoglutarate and its transamination with GABA have been studied in homogenates and mitochondria of cerebellum, brain cortex and brain stem. Judged by maximal activities of the two enzymes, which catalyze these two reactions, GABA-bypass is able to utilize about 1/4 of 2-oxoglutarate in cerebellar mitochondria, and 1/8—1/10 in cortex and brain stem subcellular particles. The mitochondrial GABA—2-oxoglutarate transaminase (which comprises GABA—T activity) functions under the conditions of low GABA concentration, while outside mitochondria GABA content is much higher.

It is assumed that permeability of brain mitochondria membranes to GABA may represent a regulatory mechanism of GABA transamination rate in mitochondria.

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Сытинский Н. А. Гамма-аминомасляная кислота в деятельности центральной нервной системы, Л., Наука, 1972.
2. Newsholme E. FEBS Lett., v. 117, p. 121—134, 1980.
3. Balazs R., Machiyama Y., Hammond B. J., Julian T., Richter D. Biochem. J., v. 116, p. 461—467, 1970.
4. Hammond B. J., Julian T., Machiyama Y., Balazs R. Biochem. J., v. 116, p. 461—467, 1970.
5. Gubler C. J. J. Biol. Chem., v. 236, № 12, p. 3112—3120, 1961.
6. Розанов В. А. Вопр. мед. химии, т. 26, № 1, с. 42—46, 1980.
7. Сытинский Н. А. Гамма-аминомасляная кислота—медиатор торможения. Л., Наука, 1979.
8. Ещенко Н. Д. Нейрохимия, т. 1, № 2, с. 200—213, 1982.
9. Laan J. W., Boer Th., Bruinvels J. J. Neurochem., v. 32, № 6, p. 1769—1780, 1979.
10. Вольский Г. Г.—В кн.: Нервная система, т. 13, с. 63—65, Л., ЛГУ, 1973.
11. Löscher W. J. Neurochem., v. 36, № 4, p. 1521—1527, 1981.
12. Van der Heyden J. A. M., Venema K., Korf J. J. Neurochem., v. 34, № 6, p. 1648—1653, 1980.

Поступила 14. I 1986

## АМИДНЫЕ ГРУППЫ БЕЛКОВ И АММИАКООБРАЗОВАНИЕ В ГОЛОВНОМ МОЗГУ КРЫС

БАДАЛЯН И. А., ДАВТЯН М. А.

Ереванский государственный университет

Изучали процесс аммиакообразования, наблюдаемый при 3-часовой инкубации гомогената головного мозга крыс в 0,05 М  $K^+$ -фосфатном буфере, pH 7,4. Показано, что до инкубации в гомогенате содержится азотсодержащее лабильное соединение, продуцирующее аммиак в течение инкубации и легко расщепляющееся насыщенным раствором  $K_2CO_3$  (поташ) с выделением аммиака. Это соединение осаждается ТХУ, но является растворимым в органических липорастворителях и экстрагируется из ТХУ-осадка этанол-хлороформной смесью (2:1). Исследовали содержание амидных групп белков мозга крыс до и после инкубации. Установлено, что деаμίдирование белков не играет роли в аммиакообразовании, наблюдаемом при инкубации гомогенатов мозга крыс.

Установлено, что при преобладании процессов возбуждения в мозгу животных происходит деаμίдирование белков. В частности, при кратковременном электрическом возбуждении [1, 2], при гипероксии [3, 4], при гипогликемических судорогах, вызванных введением инсулина [5, 6], параллельно интенсивному израсходованию энергетических субстратов расщепляются и амидные группы белков мозга. И наоборот, при развитии тормозных процессов в мозгу, в частности при медикаментозном сне, вызванном введением мепробала [7], происходит аμίдирование белков мозга. Указанные и ряд других данных позволяют приписать процессам аμίдирования и деаμίдирования белков определенную роль в механизмах аммиакообразования и обезвреживания аммиака в головном мозгу. Однако следует отметить отсутствие прямых доказательств относительно участия амидных групп белков в процессе аммиакообразования в мозгу при нормальной жизнедеятельности. Лишь исследования Арутюняна и Микаелян [8] однозначно доказывают, что наблюдаемое при декапитации животных резкое увеличение содержания аммиака в мозгу в основном обусловлено деаμίдированием белков.

Намн была поставлена задача исследовать участие амидных групп белков в аммиакообразовании, наблюдаемом в течение инкубации гомогенатов мозга.

### Материалы и методы

Подопытные животные (белые крысы массой 150—200 г) были разделены на две группы. Крыс I группы декапитировали, извлекали мозг и гомогенизировали в гомогенизаторе типа Поттер-Эльведжема в 0,05 М  $K^+$ -фосфатном буфере, pH 7,4. До и после 3-часовой инкубации гомогенатов в ТХУ-экстракте мозга и непосредственно в гомогенате без предварительного осаждения белков ТХУ определяли со-

держание аммиака и глутамина, в ТХУ-осадке гомогената мозга—белковый амидо-азот.

Животных II группы целиком замораживали жидким азотом, затем вскрывали черепную коробку, извлекали мозг, растирали его в жидком азоте в порошок и его навески гомогенизировали в 10%-ной ТХУ. В ТХУ-экстракте мозга определяли содержание аммиака и глутамина, в ТХУ-осадке—амидоазот белка.

Аммиак определяли микродиффузионным методом Зелигсона в модификации Силаковой и соавт. [9], позволяющей по разнице величин азота аммиака, вытесненного КОН и  $K_2CO_3$  из ТХУ-экстракта определять также амидный азот глутамина. В случае определения аммиака непосредственно в гомогенате в микродиффузионный сосудик вносили гомогенат без предварительного осаждения белков ТХУ, то есть в этих условиях присутствовали все компоненты клетки, включая белки. Можно полагать, что при этом  $K_2CO_3$  будет вытеснять свободный аммиак, не гидролизывая другие известные азотсодержащие соединения.

При определении амидных групп белки предварительно очищали от азотсодержащих соединений и липидов. Очистку проводили следующим образом: ТХУ-осадок трижды промывали 5%-ной ТХУ по 15 мин, последнюю обработку проводили на водяной бане при  $90^\circ$  в течение 30 мин; осадок обрабатывали последовательно органическими растворителями: смесью этанола с хлороформом (2:1) 5 мл, 15 мин; этанолом, 5 мл, 15 мин; смесью этанола с эфиром (2:1) 5 мл, 15 мин (обрабатывали дважды, вторую обработку проводили при  $t 70^\circ$ ); эфиром трижды 5 мл, 10 мин.

Амидные группы белков определяли по количеству аммиака, выделившемуся при гидролизе 20 мг белка в 5 мл 1 н.  $H_2SO_4$  при  $100^\circ$  [3]. Гидролиз проводили в пробирках с обратным холодильником. При определении суммы амидных групп (САГ) белки подвергали гидролизу в течение 180 мин. При определении легкогидролизуемых амидных групп (ЛАГ)—30 мин. Для определения аммиака брали 0,5 мл надосадочной жидкости гидролизата, нейтрализовали его 1 н. NaOH и определяли содержание аммиака микродиффузионным методом. Трудногидролизуемые амидные группы (ТАГ) определяли по разности САГ и ЛАГ.

### Результаты и обсуждение

Данные, полученные при исследовании содержания аммиака в ТХУ-экстракте и гомогенате головного мозга крыс до и после 3-часовой инкубации, приведены в табл. 1. Показано, что в ТХУ-экстракте

Таблица 1

Содержание аммиака в гомогенате мозга (I) и ТХУ-экстракте гомогената мозга (II) крыс при деканитации до и после 3-часовой инкубации (мкмоль/г ткани),  $n=8$

Условия опыта	$NH_3$ , вытесненный потаем		$NH_3$ , вытесненный насыщенным раствором КОН		Разница (амидо-N-глутамин)	
	I	II	I	II	I	II
До инкубации	$3,50 \pm 0,27$	$7,93 \pm 0,45$	$7,94 \pm 0,15$	$21,33 \pm 0,30$	$4,44 \pm 0,26$	$13,40 \pm 0,25$
После инкубации	$16,29 \pm 1,18$	$16,41 \pm 0,77$	$18,20 \pm 0,92$	$25,54 \pm 0,60$	$1,91 \pm 0,34$	$9,13 \pm 0,34$
Образовалась за время инкубации	$12,79 \pm 1,04$	$8,48 \pm 0,45$	$10,26 \pm 0,82$	$4,21 \pm 0,31$	$2,53 \pm 0,40$	$4,27 \pm 0,43$

мозга до инкубации содержится 3,5 мкмоль аммиака/г свежей ткани, что совпадает с данными других авторов [10, 11]. Однако совершенно

неожиданно при определении количества аммиака непосредственно в гомогенате (то есть при вытеснении из гомогената— аммиака насыщенным раствором  $K_2CO_3$ ), его содержание оказалось более чем в 2 раза выше—7,93 мкмоль/г. После 3-часовой инкубации происходит почти 5-кратное увеличение количества аммиака в ТХУ-экстракте—16,29 мкмоль/г, причем при определении аммиака после инкубации как в ТХУ-экстракте, так и непосредственно в гомогенате (16,41 мкмоль/г) получаются почти одинаковые величины. Это позволяет полагать, что до инкубации в гомогенате мозга содержится азотсодержащее лабильное соединение, которое легко расщепляется поташем с выделением аммиака. При инкубации гомогената, очевидно, это соединение полностью дезаминируется и обуславливает прирост аммиака на 4,43 мкмоль/г. Возможно, это соединение высокомолекулярной природы, осаждаемое ТХУ. В связи с этим уместно упомянуть исследования П. А. Кометяни относительно существования в ТХУ-осадке гомогената мозга крыс экстрагируемых подкисленными липорастворителями азотсодержащих соединений (белковой природы), которые легко дезаминируются и таким образом играют существенную роль в процессе аммиакообразования. В частности установлено, что при возбуждении, вызванном введением камфоры, параллельно увеличению содержания аммиака в мозгу заметно снижается амидированность этих белков [12, 13].

При определении в ТХУ-экстракте глутаминна оказалось, что в течение 3-часовой инкубации гомогенатов глутаминна значительно дезаминируется. Так, его содержание до инкубации составляет 4,44 мкмоль/г, после инкубации снижается до 1,91 мкмоль/г, то есть в течение инкубации дезаминируется 2,53 мкмоль/г глутаминна. Таким образом, из образовавшихся при 3-часовой инкубации 16,41 мкмоль/г аммиака—3,5 мкмоль/г составляет преобразованный аммиак, 4,43 мкмоль/г образуется в результате дезаминирования неизвестного соединения (легко расщепляемого поташем), 2,53 мкмоль/г—при дезаминировании глутаминна, а остальные 5,95 мкмоль/г очевидно образуются в результате динамического процесса аммиакообразования (возможно дезаминирование аминокислот и других соединений различными механизмами, дезаминирование белков).

При вытеснении аммиака раствором КОН непосредственно из гомогената получаются чрезмерно высокие величины (21,33 мкмоль/г). Следует полагать, что из этого количества аммиака 3,5 мкмоль/г составляет преобразованный аммиак, 4,43 и 4,44 мкмоль/г образуются в результате распада неизвестного соединения и глутаминна соответственно, а оставшиеся 8,96 мкмоль/г принадлежат другим соединениям, продуцирующим аммиак под влиянием КОН. Однако, последующие расчеты показывают, что последние соединения, продуцирующие аммиак под влиянием КОН, очевидно, не участвуют в аммиакообразовании при инкубации гомогенатов. Так, при вытеснении аммиака непосредственно из гомогената после 3-часовой инкубации образуется

25,54 мкмоль/г аммиака, из них 3,5 мкмоль/г—это преобразованный аммиак, 4,43 и 4,44 мкмоль/г—аммиак, образующийся из неизвестного соединения и глутаминна, 5,95 мкмоль/г—в результате динамического процесса аммиакообразования, а оставшиеся 7,22 мкмоль/г—из соединений, продуцирующих аммиак под влиянием КОН. Таким образом, последнее соединение, продуцирующее аммиак под влиянием КОН в течение 3-часовой инкубации гомогенатов уменьшалось незначительно (на 1,74 мкмоль/г), что дает нам право судить об их непричастности или незначительном участии в качестве источников аммиака при инкубации гомогенатов.

Так как можно допустить возможность гидролиза и амидных групп белков насыщенным раствором КОН, исследовали их содержание до и после инкубации. Данные, приведенные в табл. 2, пока-

Таблица 2

Содержание амидного азота белков мозга крыс при декапитации до и после 3-часовой инкубации гомогенатов (мкмоль/г свежей ткани), n=8

Условия опыта	Сумма амидных групп	Легкогидролизуемые амидные группы	Трудногидролизуемые амидные группы
До инкубации	27,02±1,57	17,84±1,38	9,18±0,39
После инкубации	27,18±1,51	21,17±1,83	6,01±0,59

зывают, что при 3-часовой инкубации гомогенатов содержание суммарных амидных групп белков не меняется, хотя при этом наблюдается определенное количественное перераспределение между легко- и трудногидролизуемыми амидными группами. Ряд авторов [14, 15] указывал на перераспределение между лабильными и стабильными группами белков при различных функциональных состояниях мозга в результате трансформационных изменений последних. Так или иначе, при инкубации гомогенатов мозга в суммарном содержании амидных групп белков не происходит изменения и, следовательно, они не причастны к происходящему при инкубации аммиакообразованию. Можно полагать, что дезамидирование белков играет роль лишь при происходящем взрывообразном аммиакообразовании в мозгу после декапитации, что подтверждают исследования Арутюняна и Микаелян [8], согласно которым степень амидированности белков мозга значительно выше при замораживании крыс жидким кислородом по сравнению с декапитацией. Это нашло свое подтверждение и в наших экспериментах при исследовании амидных групп белков головного мозга крыс, замороженных жидким азотом.

Как видно из табл. 3, белки головного мозга замороженных жидким азотом крыс содержат значительно больше амидных групп—59,07 мкмоль/г, чем белки мозга декапитированных крыс—27,02 мкмоль/г, что свидетельствует о быстром дезамидировании белков мозга после декапитации и полностью соответствует литературным данным [8]. Содержание аммиака в мозгу замороженных крыс со-

ставляет 1,69 мкмоль/г, глутамин—5,95 мкмоль/г. Как и следовало ожидать, при декапитации в мозгу крысы возрастает количество свободного аммиака и уменьшается содержание глутамин.

Суммируя приведенные в работе данные можно заключить, что наблюдаемое при инкубировании гомогенатов головного мозга крысы аммиакообразование не обусловлено дезамидированием белков. Дезамидирование глутамин покрывает лишь около 20% образующегося аммиака, остальные 80% берут начало из других азотсодержащих соединений. Среди последних, по нашим данным, существенную роль играют соединения неизвестной природы, разрушаемые раствором  $K_2CO_3$  и осаждаемые ТХУ, которые в течение 3-часовой инкубации продуцируют 4,43 мкмоль/г аммиака.

Таблица 3

Содержание аммиака, глутамин и белкового амидоазота в мозгу крысы, замороженных жидким азотом при гомогенизации в 10%-ной ТХУ (мкмоль/г свежей ткани)

NH <sub>3</sub> , вытесненный поташем	NH <sub>3</sub> , вытесненный насыщенным раствором КОН	Разница между NH <sub>3</sub> , вытесненным КОН и поташем (амидо-N-глутамин)	Белковый амидо- N		
			сумма амидных групп	легкогидролизуемые амидные группы	трудногидролизуемые амидные группы
1,69±0,12	7,64±0,51	5,95±0,46	59,07±3,88	29,55±1,32	29,52±2,61

Следует учесть, что при изучении амидных групп белков ТХУ-осадка, последний предварительно освобождался от всех липорастворимых соединений путем последовательной многократной промывки различными липорастворителями. Следовательно, можно заключить, что интересующее соединение, хотя и осаждается ТХУ, но является липорастворимым и удаляется из ТХУ-осадка. Это подтвердилось в отдельной серии экспериментов при изучении содержания аммиака до и после инкубации гомогенатов как в промытом липорастворителями, так и в непромытом ТХУ-осадке. Оказалось, что при 3-часовой инкубации количество аммиака, вытесняемое растворами  $K_2CO_3$  и КОН, уменьшается только в непромытом липорастворителями ТХУ-осадке. Исходя из этого, следовало искать интересующее нас соединение в липорастворимом экстракте ТХУ-осадка гомогената. С этой целью его подвергали до и после инкубации гомогената последовательному экстрагированию различными липорастворителями (этанол-хлороформом (2:1), этанолом, этанол-эфиром (2:1), эфиром) и в каждом из них определяли содержание аммиака.

Результаты экспериментов, приведенные в табл. 4, показали, что в этанол-хлороформном экстракте ТХУ-осадка наблюдается уменьшение содержания аммиака, вытесняемого растворами  $K_2CO_3$  и КОН (на 2,87 мкмоль/г и 3,13 мкмоль/г соответственно). В полученных другими липорастворителями экстрактах ТХУ-осадка аммиак содержится в следовых количествах. Таким образом, продуцирующее ам-

миак при инкубации гомогенатов мозга лабильное соединение (разрушаемое раствором  $K_2CO_3$ ) осаждается ТХУ и является растворимым в этанол-хлороформной смеси (2:1).

Таблица 4

Содержание аммиака в этанол-хлороформном экстракте ТХУ-осадка гомогената мозга крысы до и после 3-часовой инкубации (мкмоль/г свежей ткани),  $n=5$

Условия опыта	$NH_3$ , вытесненный поташем	$NH_3$ , вытесненный KOH
До инкубации	7,46±0,67	11,91±1,55
После инкубации	4,59±0,44	8,78±1,34
Разница	2,87±0,29	3,13±0,32

В этой фракции содержатся протеолипиды, экстрагируемые различными липорастворителями, в том числе примененной нами смесью. Но так как в экспериментах экстрагировано органическими растворителями подвергали ТХУ-осадок, то, очевидно, в экстракте, помимо протеолипидов, содержались фосфатидопептиды и фосфопептиды, которые, как известно, экстрагируются подкисленными органическими липорастворителями [16, 17]. Протеолипиды и фосфатидопептиды содержат амидные группы глутамина и аспарагина пептидных цепей, а фосфопептиды содержат и фосфоамидные группы. Однако указанные амидные группы никак не могут гидролизываться примененным нами насыщенным раствором  $K_2CO_3$ . Известно, что экстрагируемая липорастворителями фракция ТХУ-осадка гомогената мозга дезамидируется лишь при жестком кислотном (2 н. HCl, 100°, 2 ч) или щелочном (1 н. KOH, 37°, 15 ч) гидролизе [12, 18—20]. Содержащиеся в этой фракции фосфопептиды, очевидно, не подвергаются щелочному гидролизу [21, 18]. Таким образом, можно заключить, что ни одно из известных соединений, экстрагируемых липорастворителями из ТХУ-осадка гомогената не является соединением, продуцирующим аммиак под влиянием насыщенного раствора  $K_2CO_3$ . Очевидно, в липорастворимом осадке содержатся другие азотсодержащие соединения, исследование природы которых является предметом дальнейших исследований.

## AMIDE GROUPS OF PROTEINS AND AMMONIUM FORMATION IN RAT BRAIN

BADALYAN I. A., DAVTYAN M. A.

Yerevan State University

Ammonium formation has been studied in rat brain homogenate (pH 7.4, 3h-incubation). It has been demonstrated that before incubation a labile nitrogen-compound may be detected in homogenate that produces ammonia on incubation and is lazily split by saturated  $K_2CO_3$  producing ammonia. This compound is precipitated by TCA, is readily

soluble in organic solvents and may be extracted from TCA-precipitate by ethanol-chloroform mixture (2:1).

The amount of amide groups in brain proteins has been determined before and after incubation. It has been established that ammonia formed on incubation of rat brain homogenates is not due to deamidation of proteins.

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Мартинсон Э. Э., Тяхепьльд Л. Я. *Вопр. клинич. неврологии и психиатрии*, т. 3, с. 40, 1963.
2. Клейн Е. Э., Иорданишвили Г. С., Гвадия Н. В.—В сб.: III Всесоюз. конф. по биохимии нервной системы, с. 193, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1963.
3. Гершеневич Э. С., Кричевская А. А. *Биохимия*, т. 25, с. 310, 1960.
4. Гершеневич Э. С., Кричевская А. А., Лукаш А. И., Ходыкина И. А.—В сб.: III Всесоюз. конф. по биохимии нервной системы, с. 91, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1963.
5. Мартинсон Э. Э., Тяхепьльд Л. Я.—В сб.: I биохим. конф. прибалт. республик и Белорусии, с. 26, Тарту, 1961.
6. Тяхепьльд Л. Я. *Докл. АН СССР*, т. 147, № 4, с. 954, 1962.
7. Тяхепьльд Л. Я. *Вопр. мед. химии*, т. 8, с. 264, 1962.
8. Арутюнян А. В., Микаелян Э. М. *Вопр. биохимии мозга*, т. 1, с. 113—116, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1964.
9. Силикова А. И., Труш Г. П., Являкова А. *Вопр. мед. химии*, т. 5, № 8, с. 538—544, 1962.
10. Richter D., Dawson R. M. C. *J. Biol. Chem.*, v. 176, p. 1199, 1948.
11. Takagaki G. *J. Biochim.*, v. 42, № 2, p. 131, 1955.
12. Коветиани П. А. *Вопр. биохимии мозга*, т. 3, с. 243—253, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1967.
13. Коветиани П. А. *Биохимия*, т. 35, № 2, с. 394—403, 1970.
14. Гавская М. С., Носова Е. А., Слез Л. М. *Укр. биохим. журн.*, т. 37, № 5, с. 691—696, 1965.
15. Папаян А. А. *Журн. эксперим. и клин. мед.*, т. 14, № 5, с. 28—32, 1974.
16. Le Baron F. N., Rothleder E. E.—In: *Biochemistry of lipids*, v. 1, Pergamon Press Oxford, 1960.
17. Ledig M., Mandell P. J. *Neurochem.*, v. 11, № 3, p. 210—211, 1961.
18. Mandel P., Ledig M. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, v. 24, p. 275, 1966.
19. Воронова Н. В. *Сообщ. АН ГССР*, т. 73, № 2, с. 469—472, 1974.
20. Коветиани П. А., Эдигашвили Л. А., Микаладзе Д. Г. *Вопр. биохимии мозга*, т. 13, с. 158—167, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1978.
21. Muller Th., Rathlev T., Rosenbergl Th. *Biochim. et biophys. acta*, v. 19, p. 563, 1956.

Поступила 16. VII 1986

## ОБ ИЗМЕНЕНИЯХ ЛИПИДОВ МЕМБРАН СЕТЧАТКИ ПРИ РАЗВИТИИ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ДИСТРОФИИ У КРЫС

ОСТАПЕНКО И. А., ШАБАНОВА М. Е., ТЮРИН В. А., БОРИН М. Л.,  
ГОРБУНОВ Н. В., ЭТИНГОФ Р. И.

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. Н. М. Сеченова АН СССР,  
Ленинград, Институт морфологии человека АМН СССР, Москва

При помощи метода синиловых зондов установлено, что при развитии наследственной дистрофии сетчатки у крыс линии *Campbell* микровязкость мембран сетчатки была существенно больше, чем у здоровых животных в период выраженной патологии (на 35-й день жизни) и не отличалась на 15-й день жизни. Начиная с этого дня, содержание продуктов перекисного окисления липидов в мембранах сетчатки крыс линии *Campbell* было выше, чем у крыс линии *Wistar*.

При изучении жирнокислотного состава мембран сетчатки у больных животных на 10-й день жизни отмечено уменьшение содержания линолевой кислоты по сравнению со здоровыми животными. В более поздние сроки постнатального развития (35- и 75-й дни жизни) выявлено уменьшение содержания докозагексаеновой кислоты, что является, вероятно, следствием деструкции наружных сегментов палочек сетчатки. Факт изменения жирнокислотного состава мембран у больных животных на 10-й день жизни, когда еще нет наружных сегментов, свидетельствует о нарушении при наследственной дистрофии сетчатки липидного состава мембран нефоторецепторных слоев.

Ранее нами было установлено, что при развитии наследственной дистрофии сетчатки у крыс относительно рано изменяется 5'-нуклеотидазная активность мембран этой ткани [1]. При анализе этого феномена предполагалось, что отмеченные изменения связаны с изменением липидов мембран сетчатки [2]. В литературе имеются отдельные указания об изменении липидов мембран сетчатки при данном заболевании у крыс [3]. Однако они относятся к поздним (64 дня) стадиям заболевания и могут быть обусловлены наличием значительного слоя обломков нефагоцитированных наружных сегментов.

Целью настоящего исследования было сравнительное изучение микровязкости мембран сетчаток, жирнокислотного состава (ЖС) их липидов и процесса перекисного окисления липидов (ПОЛ) у крыс с наследственной дистрофией сетчатки и здоровых на ранних и поздних этапах постнатального развития.

### Материалы и методы

Работа выполнена на крысах линии *Campbell* с наследственной дистрофией сетчатки и контрольных линии *Wistar*, разводимых в виварии Института эволюционной физиологии и биохимии им. Н. М. Сеченова, в возрасте 10, 35 и 75 дней жизни, то есть с начала формирования наружных сегментов палочек сетчатки и вплоть до развития полной слепоты у больных крыс.

Микровязкость мембран суммарной фракции сетчатки (осадок после центрифугирования гомогената сетчатки при 12000g 40 мин) оценивали по времени вращательной корреляции  $\tau_c$  свиногого зонда, как в работе Pontus, Delmell [4]. В

качестве спинного зонда использовали этиловый эфир 7-нуклеостеариновой кислоты [5], который вводили в суспензию мембран в буфере, содержащем 40 мМ трис-НСI, 100 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА pH 7,4 из расчета 1 молекула зонда на 100 молекул мембранных липидов. Спектры ЭПР снимали на малабаритном спектрометре [6]; термостатирование образцов осуществляли с точностью 0,5°; экстракцию липидов из мембран проводили по методу Folch и соавт [7]; липидный фосфор определяли по методу Vascofsky и соавт [8]; определение гидроперекисей или диеновых конъюгатов (первичных продуктов ПОЛ) проводили методом УФ-спектрофотометрии в системе растворителей метанол: гексан (5:1) [9]. Конечные продукты ПОЛ типа шиффовых оснований регистрировали по характерной флуоресценции  $\lambda_{возб.} = 360$  нм,  $\lambda_{эмис.} = 420-440$  нм [10]. Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре J 4-8960 «Аminco—Bowman» (США).

Жирные кислоты (ЖК) основных липидов определяли методом ГЖХ на хроматографе «Сhrom-4» (ЧССР). Использовали стеклянную колонку (длина—3,5 м, внутренний диаметр—3 мм), заполненную 6% LAC-3 R-728 на хромосорбе G-AW-DMCS (80—100 меш, США). Температура колонки 186°, скорость тока газ-носителя (аргон) 60 мл/мин. Переэтерификацию остатка ЖК в молекуле липида проводили мягким щелочным метанолизом без предварительной экстракции липидов [11]. Контрольные и опытные пробы анализировали в один день, в качестве стандарта использовали стандарт Askman [12], содержание отдельных ЖК выражали в процентах; количественной оценкой содержания каждой ЖК служила площадь пика на хроматограмме.

### Результаты и обсуждение

На рисунке представлены графики обратной температурной зависимости времени вращательной корреляции  $\tau_c$  спин-зонда в тотальной фракции мембран сетчатки контрольных и больных крыс. В пер-

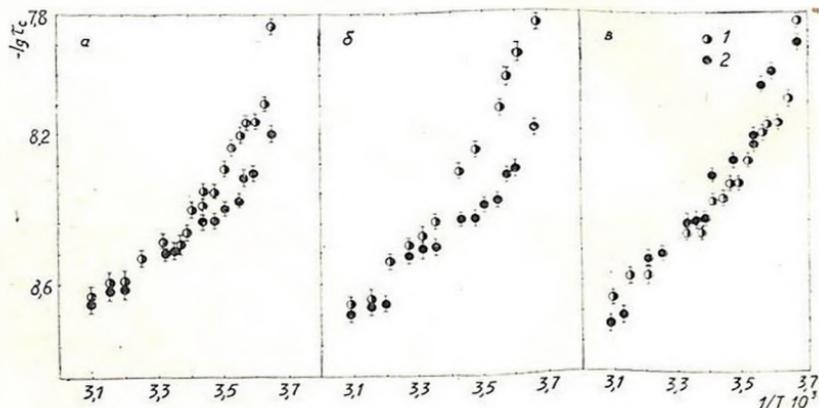


Рис. Микровязкость мембран сетчатки крыс линии Wistar и Campbell в различные сроки постнатальной жизни. а. Wistar—36 дней, Campbell 36 дней; б. Wistar—15 дней, Wistar—36 дней; в. Campbell—15 дней, Campbell—36 дней. По оси абсцисс—величина, обратная абсолютной температуре ( $1/T \cdot 10^3$ ), по оси ординат—время вращательной корреляции. ( $-lg \tau_c$ ).

вые дни после созревания (15—17-й день постнатальной жизни) существенных различий в показателе микровязкости мембран больных и здоровых животных не отмечено. В дальнейшем у крыс линии Wistar на 35-й день жизни наблюдали уменьшение микровязкости

мембран сетчатки по сравнению с 15-м днем жизни. У крыс линии *Campbell*, в отличие от здоровых, температурная зависимость вязкости мембран была одинаковой в изучаемые сроки жизни. Соответственно на 35-й день жизни, то есть в период выраженной патологии у крыс *Campbell*, вязкость мембран сетчатки у них была больше, чем у крыс линии *Wistar*. Это может быть отражением того

Таблица 1

Изменение уровня эндогенных продуктов перекисного окисления липидов мембран сетчаток крыс линий *Campbell* и *Wistar* в процессе постнатального развития

Возраст животных (дни)	Л и н и я к р ы с			
	Campbell		W i s t a r	
	оптическая плотность, $\lambda=232$ нм (гидроперекиси)	относительная интенсивность флуоресценции при $\lambda=420$ нм (инфоровые основания)	оптическая плотность, $\lambda=232$ нм (гидроперекиси)	относительная интенсивность флуоресценции при $\lambda=420$ нм (инфоровые основания)
15 (n=15)	0,21±0,01	0,77±0,08	0,13±0,01	0,69±0,10
45 (n=5)	0,57±0,01	2,13±0,06	0,14±0,01	0,71±0,09

Примечание. Концентрация липидного фосфора в растворах составляла 10 мкг/мл;  $p < 0,05$ .

факта, что изученные мембраны отличаются разной молекулярной организацией липидов. В частности, в результате развития данной патологии может меняться соотношение жидких липидов и липидов, образующих в мембране кластеры. Одной из возможных причин наблюдаемых отличий может быть появление в мембране перекисных кластеров [13]. Как видно из данных табл. 1, уровень первичных продуктов ПОЛ у больных крыс был выше, чем у здоровых уже на 15-й день жизни. В то время, как у крыс линии *Wistar* содержание продуктов ПОЛ в процессе онтогенеза не менялось, у крыс линии *Campbell* оно нарастало, так что к 45-му дню жизни количество и первичных, и вторичных продуктов ПОЛ у больных животных было приблизительно в 3 раза больше, чем у здоровых. Такое нарастание процесса ПОЛ, вероятно, и приводило к образованию перекисных кластеров в мембране и ограничению подвижности зонда. Полученные результаты хорошо согласуются с данными авторов [13—15], которые установили, что физиологически важными модификаторами гидрофобных свойств мембран могут быть эндогенные перекиси липидов. Появление последних в мембране изменяет не только проницаемость и барьерные свойства мембраны, но и приводит к ограничению подвижности фосфолипидов во всей толще мембраны от полярных головок фосфолипидов до концевых  $\text{CH}_2$ -групп хвостов ЖК за счет снижения доли жидких липидов в число и увеличения количества упорядоченных «кластеризованных» липидов [13—15].

Следует отметить, что усредненная микровязкость мембран всей сетчатки существенно зависит от доли, которую составляют в исследуемой фракции фоторецепторные мембраны, характеризующиеся высоким содержанием полиненасыщенных ЖК [16]. К 35-му дню жизни у больных животных фоторецепторных мембран в сетчатке еще относительно много, хотя они уже находятся в состоянии деструкции [17]. Наличие этих мембран в препаратах у больных животных позволяет полагать, что отсутствие изменения микровязкости мембран в онтогенезе обусловлено изменением их качественного состава, возможно, увеличением «кластеризованных» липидов, а не изменением соотношения фоторецепторных мембран.

Таблица 2

Жирнокислотный состав липидов сетчатки крыс (в % от суммы)

Жирная кислота	Крысы линии <i>Wistar</i>			Крысы линии <i>Campbell</i>		
	10 дней	35 дней	75 дней	10 дней	35 дней	75 дней
14:0	1,4±0,1	Сл*	Сл	Сл	Сл	Сл
16:0	25,3±0,2	19,6±0,4	19,7±0,2	25,6±0,5	20,9±0,8	22,6±0,6
16:1	4,0±0,1	0,5±0,1	0,5±0,1	5,2±0,1	0,6±0,1	1,2±0,1
17:0	Сл	0,5±0,1	Сл	Сл	0,5±0,1	0,6±0,1
18:0	16,2±0,2	22,6±0,6	24,6±0,1	16,4±0,1	21,0±0,2	22,8±0,3
18:1	15,0±0,1	10,1±0,1	11,0±0,3	15,2±0,3	9,7±0,3	15,4±0,3
18:2ω6	1,6±0,1	0,8±0,1	1,2±0,2	0,9±0,1	0,9±0,1	1,1±0,1
20:4ω6	16,0±0,6	10,3±0,1	11,0±0,3	15,5±0,4	11,3±0,1	13,5±0,2
ненасыщено	0,6±0,1	1,1±0,2	Сл	0,5±0,1	1,0±0,1	Сл
22:4ω6	3,0±0,1	2,7±0,1	2,6±0,1	2,6±0,1	2,9±0,1	2,4±0,1
22:5ω6	6,4±0,1	5,7±0,2	4,4±0,2	5,6±0,3	8,3±0,2	1,8±0,1
22:5ω3	0,5±0,1	0,5±0,1	0,5±0,1	0,6±0,1	0,6±0,1	0,7±0,1
22:6ω3	9,6±0,3	25,3±0,5	24,5±0,7	10,7±0,3	22,2±0,2	17,9±0,3
Насыщенные	42,9	42,7	44,3	43,0	42,4	46,0
Моноеновые	19,0	10,6	11,5	20,4	10,3	16,6
Полиеновые	37,7	46,4	44,2	36,4	47,2	37,3

Примечание. Сл\*—следы, менее 0,5%.

Известно, что основным субстратом ПОЛ в мембранах являются полиненасыщенные фосфолипиды, которыми так обогащены фоторецепторные мембраны. Поэтому в следующей серии опытов был изучен ЖК мембран сетчатки больных и здоровых крыс на 10-, 35- и 70-й дни жизни. У крыс линии *Wistar* в процессе постнатального развития от 10-го до 35-го дня жизни наблюдали снижение содержания 16:0 и увеличение 18:0, так что процент насыщенных ЖК не менялся. В этот же срок происходит снижение содержания ЖК линолевого ряда 18:2ω6, 20:4ω6 и 22:5ω6 и увеличение содержания докозагексаеновой кислоты—ω 3 ряда (табл. 2). Во все сроки жизни количество ненасыщенных ЖК было больше, чем насыщенных, а из ненасыщенных преобладали полиненасыщенные. Увеличение количества 22:6ω3, специфического маркера фосфолипидов фоторецепторных мембран, более чем в 2 раза по сравнению с 10-м днем жизни может частично объяснить уменьшение микровязкости мембран сетчатки крыс линии *Wistar* к

35-му дню (рис. 1). С другой стороны, само увеличение процентного содержания 22:6 $\omega$ 3 среди ЖК сетчатки обусловлено ростом наружных сегментов палочек, в которых содержание этой ЖК особенно высоко и составляет у теплокровных животных приблизительно 40—50 молярных процентов [16].

При сравнении ЖС липидов сетчатки здоровых и больных крыс было показано, что у крыс линии *Campbell* уже на ранних сроках жизни (10-й день) понижено содержание эссенциальной 18:2 $\omega$ 6 в 2 раза по сравнению с контролем ( $p < 0,001$ ), а также других длинноцепочечных кислот линолевого ряда 22:4 $\omega$ 6 ( $p < 0,001$ ), 22:5 $\omega$ 6 ( $p < 0,05$ ). Одновременно с этим увеличивалось содержание моноеновой кислоты 16:1 ( $p < 0,001$ ). На 35-й день уровень 22:6 $\omega$ 3 был достоверно понижен по сравнению с нормой, что, возможно, обусловлено уменьшением ее синтеза или увеличением ее окисления в период начавшейся деструкции наружных сегментов. Подобные по характеру изменения в содержании 22:6 $\omega$ 3 отмечены в работе Organisciak и соавт. [3] на более поздних сроках заболевания. На 75-й день наблюдали дальнейшее уменьшение содержания 22:6 $\omega$ 3 в сетчатках больных крыс, что, вероятно, связано с распадом наружных сегментов в этот период [17].

Обнаруженные на 10-й день, то есть в период, когда еще нет наружных сегментов, изменения ЖС свидетельствуют о том, что нарушения ЖС относятся не только к фоторецепторному слою сетчатки, но и к мембранам других слоев. Это положение подтверждает ранее полученный факт об изменении активности 5'-нуклеотидазы в нефоторецепторных мембранах сетчатки [2]. Следует также отметить, что несмотря на то, что изменение ЖС сетчатки у больных крыс удается констатировать уже к 10-му дню жизни, оно не отражается на микровязкости мембран. Это обусловлено тем, что изменения касаются тех ЖК, доля которых от общего содержания ЖК липидов весьма незначительна. На 35-й день при одинаковом суммарном содержании полиеновых ЖК вязкость мембран сетчатки была больше у больных крыс, что свидетельствует о том, что жидкость мембран обусловлена определенным качественным составом ЖК и связанными с ним белок-липидными взаимодействиями.

Резюмируя полученные данные, и в частности результаты о ранних изменениях ЖС мембран сетчаток больных крыс, можно предположить, что эти изменения могут иметь значение в патогенезе заболевания, учитывая уникальный ЖС сетчатки, и в частности наружных сегментов. Изучение конкретной значимости ранних изменений ЖС сетчаток у больных крыс является предметом дальнейших исследований.

# RAT HEREDITARY DYSTROPHY AND RETINAL MEMBRANE LIPIDS

OSTAPENKO I. A., SHABANOVA M. E., TYURIN U. A., BORIN M. L.,  
GORBUNOV N. V., ETINGOF R. N.

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

Institute of Human Morphology, USSR Academy of Medical  
Sciences, Moscow

Starting from the 35th day of life the micr oviscosity of rat retina membrane turned to be essentially higher in normal animals than in Campbell line ones with hereditary retinal dystrophy (tested by spin probe method). Since 35th day of life the content of the products of lipid peroxidation in Campbell rats was higher than in Wistar ones.

The amount of linolic acid dropped on the 10th day of life in diseased animals; on the 35th and 75th days a decrease in the amount of dokoza-hexaenic acid was registered pointing to a possible destruction of the outer segments of retinal rods. Changes in the fatty acids composition in retinal membrane of diseased animals on the 10th day of life (when the outer segments are not yet formed) points to the damage of retinal non-photoreceptive strata in this pathology.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Чусова Г. Г., Остапенко И. А., Этингоф Р. П. Бюл. экперим. биол. и мед., т. 93, № 9, с. 305—307, 1981
2. Остапенко И. А. Нейрохимия, т. 4, № 2, с. 126—133, 1985.
3. Organisciak D. T., Wang H—M., Kou A. L. Exp. Eye Res., v. 34, (3), p. 401—412, 1982.
4. Pontus M., Delmett M. Experientia, v. 31, (7), p. 799—801, 1975.
5. Борин М. Л., Кедин С. А., Володарский Л. В., Швец В. И. Биооргани. химия, т. 10, № 2, с. 251—259, 1984.
6. Ерин А. Н., Горбунов Н. В., Брусованик В. Н., Тюрин В. А., Прилико Л. Биохимия, т. 50, № 6, с. 998—1004, 1985.
7. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. J. Biol. Chem., v. 226, p. 497—509, 1957.
8. Vaskovsky V., Kostetsky E., Vasendin I. J. Chromatogr., v. 114, p. 129—142, 1975.
9. Bolland J., Koch H. P. J. Chem. Soc., v. 7, p. 445—447, 1945.
10. Chio K. S., Tappel A. L. Biochemistry, v. 8, p. 2821—2827, 1969.
11. Foot F., Allen R., Agranoff R. W. Lipid Res., v. 6, p. 518—524, 1965.
12. Ackman R. C. Amer. Oil Chem. Soc., v. 40, p. 564—570, 1963.
13. Кляин П. К., Тюрин В. А., Каган В. Е., Шуколюков С. А., Новиков К. И., Лизова О. А., Владимиров Ю. А., Козлов Ю. П. Биол. науки, т. 11, с. 39—44, 1978.
14. Каган В. Е., Лизова О. А., Архипенко Ю. В., Кляин П. К., Козлов Ю. П., Владимиров Ю. А. Биофизика, т. 22, № 4, с. 625—630, 1977.
15. Кляин П. К., Лизова О. А., Сибельдина Л. А., Архипенко Ю. В., Каган В. Е. Биохимия, т. 48, № 4, с. 626—633, 1983
16. Fliesler S. J., Anderson R. E. Prog. Lipid Res., v. 22, p. 79—131, 1983.
17. Yates C. M., Dewar A. J., Wilson H., Winterburn A. K., Reading H. W, Exp Eye Res., v. 18, (2), p. 119—133, 1974.

Поступила 14. IV 1986

# ПРОТЕОЛИПИДНЫЙ БЕЛОК И ЛИПИДЫ ЦЕЛОГО МОЗГА И СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИИ В РЯДУ ПОЗВОНОЧНЫХ

ЗАБЕЛИНСКИЙ С. А., ДЕНИСОВА Н. А.

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

Представлены данные по содержанию липидов, включая протеолипиды, в целом мозгу у 22 видов и в субклеточных фракциях (миелиновой и синапсомной) у 8 видов исследованных позвоночных. Исследование липидов головного мозга позвоночных подтвердило, что в составе мембран мозга теплокровных снижено относительное количество фосфолипидов по сравнению с холоднокровными. По количественному составу липидов пластиножаберные отличаются от костистых рыб. Обнаружено, что липидный состав фракций мозга представителей разных классов позвоночных имеет немало общих черт. В то же время имеются отличия в липидном составе как в миелиновых, так и в синапсомных мембранах. Можно заключить, что биохимические показатели, отличающие мозг низших позвоночных (рыб) от мозга наземных и в особенности от мозга теплокровных животных, полученные при расчете на г влажной и сухой массы, в основном сохраняются и при расчете на сухую массу липидного экстракта. Близость пластиножаберных и наземных позвоночных по липидному составу мембран мозга объясняется, по-видимому, тем, что они относятся к общей линии развития полуводных (амфибий) и наземных позвоночных.

Содержание липидов в различных мембранах мозга составляет от 40 до 80% их сухого веса. Миелиновые структуры особенно богаты липидами, бимолекулярный слой которых, главным образом фосфолипидов (ФЛ), является одним из наиболее важных структурных компонентов любой клеточной мембраны мозга. Самое высокое содержание ФЛ обнаружено во фракции миеллина, в особенности в препаратах миеллина рыб [1].

Цель настоящей работы состояла в изучении липидного состава мембран мозга в ряду позвоночных, адаптированных к различным температурным условиям.

## Материалы и методы

Животных декапитировали, и мозг быстро извлекали. Липиды и протеолипиды экстрагировали из ткани мозга смесью хлороформа и метанола по методу Folch и соавт. [2], и в дальнейшем обработка целого мозга и субклеточных фракций шла аналогично тому, как описано ранее [3]. Субклеточные фракции получали по методу, приведенному в работе Sun G., Sun A. [4]. В липидных экстрактах (ЛЭ) определяли сухой остаток, суммарное содержание ФЛ, белок протеолипидов [3]. Содержание глицолипидов [5] и холестерина [6] определяли колориметрически и с помощью метода ГЖХ\*.

Следует отметить, что масса липидов, входящих в протеолипидные комплексы, составляет 25—30% от массы очищенных протеолипидов (ОПЛ) у теплокровных

\* Авторы приносят благодарность М. А. Чеботаревой и М. В. Левитиной за оказанную помощь в определении содержания холестерина и глицолипидов.

животных и около 40% у холоднокровных [3, 7]. Следовательно, зная содержание протеолипидного белка в ЛЭ мозга у изученных животных, можно рассчитать примерное содержание ОПЛ на г влажной ткани мозга.

Статистическую обработку проводили стандартным методом на микро-ЭВМ «Электроника ДЗ-28».

## Результаты и обсуждение

Исследован головной мозг 21 представителя позвоночных. В табл. 1 приведены данные о средних величинах массы головного мозга у исследованных животных. Следует отметить индивидуальную вариабельность размеров тела и головного мозга в пределах вида у исследованных животных. Наиболее сильные колебания в размерах головного мозга обнаружены у колючих акул или катранов (*Squalus acanthias*).

Из результатов определения сухой массы мозга, представленных в табл. 1, следует, что сухая масса мозга теплокровных животных больше, чем у холоднокровных, что, по-видимому, связано с увеличенным в мозгу высокоорганизованных животных количества клеточных элементов и со степенью миелинизации мозга животных [8]. Сухая масса нелипидного компонента в составе мембран мозга всех изученных животных изменяется в меньшей степени (в пределах 11—126 мг/г влажной ткани), чем сухая масса липидов. Так, сухая масса ЛЭ у этих видов животных изменяется в пределах 49—105 мг/г влажной ткани. Самое высокое ее содержание (без учета ганглиозидов) обнаружено у млекопитающих и рыб—81—105 мг/г влажной ткани, а самое низкое—у амфибий—49 мг.

Наиболее отчетливые сдвиги в изменении сухой массы ЛЭ мозга происходят на ранних стадиях развития, в особенности у незрелорождающихся млекопитающих (табл. 2). Например, у однодневных мышей она составляет 25,7 мг, а у взрослых—88,4 мг/г влажной ткани мозга. Морская свинка выбрана в качестве объекта исследования, поскольку она является зрелорождающимся млекопитающим с частично сформированным миелином и с почти нормальной терморегуляцией. Ряд авторов [9, 10] отмечает, что в онтогенезе незрелорождающихся животных происходит изменение липидного состава мембран мозга, в частности обогащение их протеолипидным белком и гликолипидами [9, 10]. Одной из причин этого, по мнению авторов, является активный процесс миелинизации. Нами также установлено, что липидный состав мозга взрослых морских свинок отличается от однодневных более высоким содержанием всех липидов, в том числе и протеолипидов. Например, сухая масса ЛЭ у взрослых морских свинок увеличивается в 1,6 раз, а холестерин—в 1,8 раз по сравнению с ЛЭ мозга новорожденных, причем нарастание ФЛ происходит лишь в 1,2 раза.

В мембранах мозга млекопитающих и костистых рыб ФЛ составляют 41—59 мг/г влажной ткани, тогда как у амфибий их содержи-

Таблица 1

## Состав липидного экстракта головного мозга позвоночных

Животное	Количество животных в опыте	Масса целого мозга (мг)	С о д е р ж а н и е (в мг/г влажной ткани)					
			сухой массы мозга	сухой массы ЛЭ	фосфолипидов	белка протеолипидов	глицколипидов	холестерина
Макака	1	87250	225,0±6,2	105,3±2,3	52,5±2,1	8,3±0,8	19,1±1,9	22,4±2,2
Морская свинка	5	3610±3,0	—	85,4±1,6	41,2±1,1	7,2±0,3	16,4±2,1	20,2±1,8
Крыса белая	10	1850±2,0	210,3±5,2	100,2±1,9	50,1±1,9	6,0±0,6	17,3±1,7	21,4±2,1
Хомяк	3	1095±5,0	—	83,0	41,0	5,5	14,0±1,7	18,3±1,9
Мышь (6-месячная) [13]	—	444,5	238,0	88,4	52,0	5,0	13,1	20,0
Ворона серая	3	—	—	79,3±1,7	41,6	5,5±1,1	17,1±1,1	15,1±1,4
Кура	10	3031±2,0	194,9±3,9	71,3±1,8	37,2±1,3	6,4±1,0	16,0±1,7	12,4±1,6
Голубь	10	2200±3,0	199,6±4,1	73,9±2,1	38,1±1,4	6,3±1,1	16,4±1,3	11,9±1,8
Агма степная	7	91±2,0	110,4±3,6	69,1±2,0	36,2±1,3	5,1±0,9	9,3±1,0	14,3±1,1
Желтопузик	10	300±1,0	170,0±4,1	64,6±1,6	34,9±0,8	3,8±0,6	8,1±1,3	14,0±1,2
Чернаха степная	10	350±2,0	170,3±4,4	51,1±2,0	29,4±1,6	4,5±0,8	6,1±0,9	10,3±1,3
Лягушка	20	70±0,5	161,1±3,7	48,9±1,5	27,9±1,4	4,1±0,9	4,9±0,8	9,9±1,0
Форель (2—3 года)	10	228±3,0	185,3±3,3	81,4±1,6	54,9±1,1	3,0±0,5	4,0±0,8	18,8±2,0
Форель (3—4 года)	100	300±0,4	200,1±8,0	91,3	59,0±1,8	3,2±0,5	3,9±0,7	19,9±2,1
Акула молот	1	44100	—	83,7	41,0	4,4	—	—
Акула белоперая	2	32100±50,0 29170±20,0	—	66,8	35,1	3,6	10,6—1,1	15,3—1,6
Акула голубая	1	15510	—	60,3	31,1	2,7	—	—
Катран L-100—126 см	5	3525±18,0	181,1±3,5	60,3±1,3	31,4±1,9	2,3±0,5	9,0±1,0	14,8±1,1
Катран L-45 см	1	949	178,3±3,1	53,5	28,4±1,5	2,3±0,5	7,1±0,7	12,9±1,4
Скат лиса	7	1810±15,0	178,0±4,5	61,7	35,3±2,1	3,0±1,0	8,1±0,9	14,5±1,3

ся в 1,5—2 раза меньше. Содержание холестерина у млекопитающих и костистых рыб приблизительно в 1,4—2 раза больше, чем у представителей остальных классов позвоночных.

Таблица 2

Состав липидных экстрактов головного мозга новорожденных позвоночных

Животное	Масса целого мозга (мг)	Содержание (мг/г влажной ткани)					
		сухой мас- сы мозга	сухой массы ЛЭ	фосфоли- пидов	белка про- теолипидов	гликоли- пидов	холесте- рина
Морская свинка (3)	2072±1,0	180,0±3,5	52,9±1,4	33,5±1,6	1,8±0,7	7,1±1,5	11,3±1,7
Крыса [13] (3)		124,0	25,7	17,6	—	2,7	3,8
Мышь [13] (3)		132,0	23,7	21,5	0,3	0,3	4,2

Анализ полученных данных показал (табл. 1), что в содержании суммарных гликолипидов (цереброзидов и цереброзидсульфатов) и протеолипидного белка при расчете на г влажной ткани мозга прослеживается определенная корреляция с уровнем организации животных, что, возможно, связано также с различной степенью миелинизации этого органа. Сопоставление содержания гликолипидов и протеолипидного белка позволило выявить высокую корреляцию между этими показателями ( $r=0,89$ ).

Таблица 3

Состав липидных экстрактов головного мозга позвоночных (% от сухой массы липидного экстракта)

Животное	Фосфо- липиды	Белок про- теолипидов	Глико- липиды	Холесте- рин
Макака	50,0	7,9	18,2	21,3
Морская свинка	48,2	8,4	19,2	23,7
Крыса белая	50,0	6,0	17,3	21,4
Хомяк	49,6	6,6	16,9	22,1
Мышь [13]	58,8	5,7	14,8	22,6
Ворона серая	52,5	6,9	21,5	19,1
Кура	52,2	9,0	22,4	17,4
Голубь	51,6	8,5	22,2	16,1
Агама степная	54,0	7,6	13,9	21,3
Черепаха степная	57,5	8,8	12,2	20,2
Желтопузик	54,0	5,9	12,5	21,7
Лягушка травяная	57,1	8,4	10,0	20,2
Форель	67,5	3,7	4,9	23,1
Сельдь пваси	67,1	4,0	4,3	22,3
Хариус байкальский	70,0	3,6	4,8	21,8
Камбала тихоокеанская	68,1	3,3	4,7	23,0
Скат черноморский	51,5	4,6	12,6	22,4
Катран черноморский	52,0	3,8	14,9	24,5

В табл. 3 представлен липидный состав мозга изученных позвоночных в процентах от сухой массы ЛЭ. Мы сочли возможным подойти к рассмотрению состава мембран мозга животных с разным уров-

нем организации с точки зрения процентного состава основных мембранных липидов на основе следующих фактов: во-первых, масса сухого ЛЭ и суммарная масса липидов и протеолипидного белка у каждого из изученных животных совпадают (табл. 1); во-вторых, во всех предложенных моделях клеточной мембраны ее основа представлена бимолекулярным слоем липидов; в-третьих, биохимические показатели, отличающие мозг низших позвоночных (рыб) от мозга наземных и особенно от мозга теплокровных животных, полученные на г влажной и сухой массы мозга, в основном сохраняются и при расчете на сухой вес ЛЭ.

Таблица 4

Состав липидных экстрактов миелиновых и синапсомных субклеточных фракций (% от суммы сухой массы ЛЭ)

Ж и в о т н ы е	Белок протеолипидов	Фосфолипиды	Гликолипиды	Холестерин
Ф р а к ц и я м и е л и н а				
Крыса белая	12,3±1,7	36,1±1,1	25,9±1,9	22,6±1,7
Кура	12,4±1,6	38,8±1,9	27,6±1,6	21,1±1,8
Черепаша степная	11,9±1,3	37,9±1,4	26,3±1,7	22,9±2,1
Лягушка	10,2±1,2	42,7±1,5		
Форель	3,9±0,7	63,1±1,2	8,3±1,2	21,9±1,9
Волосатка обыкновенная	4,1±0,9	55,3±3,2	12,0±2,7	23,4±2,3
Акула катран	2,9±0,4	44,3±1,8		
Скат тихоокеанский	4,3±1,1	46,3±2,7	22,9±2,9	24,1±1,8
Скат черноморский	3,0±1,9	44,2±3,0		
Ф р а к ц и я с и н а п т о с о м				
Крыса белая	5,1±0,9	57,9±1,8	9,8±1,3	11,8±1,4
Кура	5,9±0,7	60,1±1,7	13,8±1,8	18,3±1,8
Черепаша степная	4,3±0,9	63,9±1,6	8,3±1,4	17,8±1,9
Лягушка	3,6±1,0	63,8±1,2		
Форель	4,6±1,1	70,1±1,9	6,5±0,9	17,3±1,5
Волосатка обыкновенная	4,0±0,9	66,4±2,9	7,3±2,3	19,8±1,9
Акула катран	3,7±1,2	54,5±2,1		
Скат тихоокеанский	4,2±1,1	57,6±3,1	14,2±2,5	21,1±2,1
Скат черноморский	4,4±1,0	55,8±2,6		

Анализ липидного состава головного мозга позвоночных при расчете на процентное содержание от сухого веса ЛЭ показал, что при сравнительно одинаковом содержании холестерина, общее количество гликолипидов нарастает с 4% у костистых рыб до 18—22% у млекопитающих и птиц (табл. 3). Количество протеолипидного белка практически неизменно в ряду животных (6—9%), кроме рыб, у которых оно значительно ниже (3—5%). В содержании ФЛ, которые составляют основу мембранных липидов, можно проследить тенденцию к понижению их доли в составе мембран с повышенным уровнем организации с 65—70% у костистых рыб до 51% у млекопитающих.

Данные, представленные в табл. 1—3, получены при изучении гомогената целого мозга животных. Они дают общее представление о составе мембран мозга. Изучен также липидный состав специаль-

зированных мембран мозга (фракции миелина и синапсом) у животных разного уровня филогенетического развития, разной степени миелинизации мозга и живущих в разных температурных условиях. Из данных, представленных в табл. 4, следует, что миелиновые мембраны земноводных, рептилий, птиц и млекопитающих имеют сходный состав. Содержание ФЛ составляет 36,1—42,7%, содержание протеолипидного белка—10,2—12,4%, гликолипидов—26,3—27,6%. Миелиновые мембраны рыб, выделенные в тех же условиях, что и миелиновые мембраны других изученных животных, отличаются по относительному содержанию ФЛ, гликолипидов и протеолипидного белка (табл. 4). Исходя из наших данных, можно отметить, что в составе миелиновых мембран мозга изученных животных снижено относительное содержание ФЛ по сравнению с относительным содержанием ФЛ в мембранах, выделенных из целого мозга. Следовательно, в миелине у всех изученных животных по сравнению с целым мозгом увеличено относительное количество гликолипидов, протеолипидного белка и холестерина.

По представлениям Е. М. Крепеа «...липиды в силу особенностей их химического состава и строения, форм связей с белками в мембранах как бы специально приспособлены природой для целей адаптации, прежде всего температурной» [1].

Что касается синапсомных мембран, то все они обогащены ФЛ по сравнению с миелиновыми. В ряду изученных животных можно проследить тенденцию к понижению содержания ФЛ от рыб (за исключением хрящевых) к высшим позвоночным. В синапсомных мембранах не прослеживается корреляция в содержании гликолипидов и уровня организации животных.

Из полученных данных следует, что увеличение содержания протеолипидного белка, гликолипидов и снижение относительного содержания ФЛ в мембранах мозга в ряду позвоночных протекает параллельно развитию теплокровности.

## PROTEIN OF PROTEOLIPIDS AND LIPIDS IN SUBCELLULAR FRACTIONS AND WHOLE BRAIN OF VERTEBRATA

ZABELINSKY S. A., DENISOVA N. A.

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

Study of the content of lipids (including proteolipids) in the whole brain of 22 species and in subcellular fractions (myelin and synaptosomal) of 8 types of vertebrata confirm that in the warm-blooded animals relative content of phospholipids in brain membranes is lower than in cold-blooded species. It was shown that lipid composition of the brain fractions in various vertebrates is rather close, at the same time differences in the lipid composition both in myelin and synaptosomal membranes were found. It may be concluded that biochemical traits which

distinguish the brain of lower vertebrates (fishes) from the brain of terrestrial, especially warm-blooded animals, calculated per 1 g of wet and dry mass, are consistent with those calculated per dry mass of the lipid extract. Similarity of the Elasmobranchia and terrestrial vertebrates with respect to the lipid composition of brain membranes comes presumably from the fact that these species share common developmental pathways with semi-aquatic and terrestrial vertebrates.

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Кренис Е. М. Липиды клеточных мембран, Л., Наука, 1981.
2. Folch J., Ascoli I., Lees M. *Biol. Chem.*, v. 191, p. 833—841, 1951.
3. Забелинский С. А., Помазанская Л. Ф., Чирковская Е. В. Журн. эволюц. биохимии и физиологии, т. 20, № 3, с. 239—245, 1984.
4. Sun G. Y., Sun A. Y. *Biochim. et biophys. acta*, v. 280, p. 306—315, 1972.
5. Svennerholm L. *J. Neurochem.*, v. 1, p. 42—53, 1956.
6. Davison A. N., Dobbing J., Morgan R. S. *J. Neurochem.*, v. 3, № 1, 89—94, 1958.
7. Забелинский С. А., Помазанская Л. Ф. Журн. эволюц. биохимии и физиологии, т. 20, № 6, с. 570—575, 1984.
8. Norton W. T., Podusto S. E. *J. Neurochem.*, v. 21, p. 759—773, 1973.
9. Folch J.—In: *Biochemistry of the developing nervous system.* (ed. H. Waelsch), p. 121—136. New York, Acad. Press, 1955.
10. Манукян К. Г., Левонян К. Л., Киракосян Л. Г.—В кн.: *Вопр. биохимии мозга*, т. 10, с. 192—206. Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1975.

Поступила 21. I 1986

Во II—III квартале 1987 года издательство «Наука» (Москва) выпустит монографию Ю. В. ГОДУХИНА «Модуляция синаптической передачи в мозге» (отв. ред. д. б. н., проф. А. Ю. Буданцев), в которой изложен ряд данных, полученных в последние годы автором монографии и рядом сотрудников Лаборатории структуры и функции синапсов Института биологической физики АН СССР.

Монография посвящена анализу собственных и литературных данных, посвященных принципам и молекулярным механизмам модуляции синаптической передачи в мозгу млекопитающих. В частности, в монографии описан «гомеостатический» принцип модуляции синаптической передачи в мозгу, впервые обоснованный в работе автора. Представлены экспериментальные результаты изучения молекулярных механизмов этой модуляции.

В монографии на примере глутамат- и дофаминергической синаптических передач исследована модулирующая функция целого класса физиологически активных соединений: анилина, катехоламинов, опондных пептидов, стероидных гормонов. Проанализирована также роль циклических нуклеотидов и  $Ca^{2+}$  в молекулярных механизмах модулирующего действия этих веществ.

В заключении обсуждается возможное практическое значение изучения процессов модуляции синаптической передачи в мозгу. В частности, на основании полученных данных автор выдвигает гипотезу, объясняющую возникновение такого неврологического заболевания, как хория Гентингтона.

Монография предназначена для широкого круга специалистов: биофизиков, нейрофизиологов, нейрехимиков и нейрофармакологов.



## Na<sup>+</sup>-ЗАВИСИМОЕ СВЯЗЫВАНИЕ <sup>3</sup>H-ГАМК СИНАПТОСОМАМИ КОРЫ БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПОСЛЕ ВНУТРИЖЕЛУДОЧКОВОГО ВВЕДЕНИЯ 6-ОКСИДОФАМИНА И АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ

ГРИГОРЬЕВ И. П., НЕОКЕСАРИЙСКИИ А. А.

Институт экспериментальной медицины АМН СССР, Ленинград

При изучении медиаторных систем в ЦНС возникает вопрос о характере межмедиаторных взаимодействий, которому посвящается множество исследований. При этом очень редко изучают состояние пресинаптического рецепторного аппарата. Этот недостаток полностью относится и к изучению взаимодействия катехоламинергической и ГАМК-ергической систем в коре больших полушарий. Установлено, что кора больших полушарий богата иннервирована норадренергическими и дофаминергическими волокнами [1], а ГАМК-ергические нейроны, отростки которых заканчиваются в пределах неокортекса, являются одной из основных популяций кортикальных клеток [1]. О взаимодействии этих основных тормозных медиаторных систем коры большого мозга известно лишь то, что выброс ГАМК из коры усиливается после внутрижелудочкового введения норадреналина [2]. В настоящем сообщении приводятся данные о Na<sup>+</sup>-зависимом связывании <sup>3</sup>H-ГАМК синаптосомами коры больших полушарий мозга крыс после резкого снижения содержания катехоламинов под влиянием 6-оксидофамина (6-ОНДА), избирательного катехоламинергического нейротоксина [3]. Na<sup>+</sup>-зависимое связывание ГАМК является преимущественно пресинаптическим [4].

По общепринятой методике для предотвращения окисления 6-ОНДА в растворе в него добавляют аскорбиновую кислоту. Однако в литературе появились данные о действии аскорбата на присоединение меченых лигандов к дофаминовым, мускариновым, опиатным, адренергическим β-рецепторам [5]. Для выявления возможного эффекта аскорбата на Na<sup>+</sup>-зависимое связывание <sup>3</sup>H-ГАМК нами прове-

дены две параллельные серии экспериментов: 6-ОНДА вводили в желудочки мозга с добавлением аскорбиновой кислоты или в её отсутствие.

Взрослым крысам-самцам линии *Wistar* под эфирным наркозом билатерально инъецировали в боковые желудочки мозга по 125 мкг (в расчёте на свободное основание) 6-ОНДА-гидрохлорида («Serva», ФРГ) в 20 мкл стерильного физиологического раствора с добавлением L-аскорбиновой кислоты (1 мг/мл) или без нее. Повреждение пораднергической системы после введения 6-ОНДА подтверждалось отсутствием постдекапитационных судорог. Контролем служили крысы, которым при тех же условиях вводили раствор-носитель без 6-ОНДА. Через 2, 5, 21—23 суток животных декапитировали, кору больших полушарий 3—4-х животных объединяли и получали грубую митохондриальную фракцию  $P_2$  [6]. По 0,1 мл полученной суспензии в 0,32 М сахарозе (400—600 мкг белка) добавляли в пробирки с 1,9 мл инкубационной среды следующего состава (в мМ): NaCl—117,9; KCl—4,7; CaCl<sub>2</sub>—2,5; MgSO<sub>4</sub>—1,2; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>—1,2; трис-HCl буфер (pH 7,4)—50; глюкоза—5,6. После 10 мин преникубации в пробирки добавляли ГАМК—2,3<sup>3</sup>H<sub>2</sub> (N.A. 1,3 ТБк/ммоль, «Изотоп», Ленинград) для получения конечной концентрации 1.10<sup>-7</sup> М. Неспецифическое связывание определяли в присутствии 1.10<sup>-3</sup> М немеченой ГАМК в инкубационной среде. Специфическое связывание рассчитывали как разницу между общим и неспецифическим связыванием. Инкубацию при 0—4° прекращали через 10 мин центрифугированием с ускорением 16000g при 4° 10 мин и дважды промывали охлаждённым на льду трис-HCl буфером (pH 7,4) с последующим центрифугированием при тех же условиях. Полученный осадок растворяли в 0,4 мл 2,5%-ного раствора ДДС-Na в 0,1%-ном растворе тритона X-100 в течение 16—24 ч и в 7 мл тритозола [7] измеряли величину радиоактивности на сцинтиляционном счётчике Isoscar-300 («Beckman», США). Белок определяли по Lowry и соавт. [8]. Достоверность различных результатов оценивали по критерию Стьюдента.

Специфическое связывание <sup>3</sup>H-ГАМК синапсосомами коры больших полушарий после введения 6-ОНДА с добавлением аскорбиновой кислоты было достоверно выше, чем после введения раствора-носителя через 5 и 21—23 суток (таблица). В серии экспериментов без добавления аскорбиновой кислоты связывание <sup>3</sup>H-ГАМК через 5 суток после инъекции 6-ОНДА было значительно ниже, чем после введения физиологического раствора.

Таким образом, внутрижелудочковое введение 6-ОНДА как с аскорбиновой кислотой, так и без неё существенно изменяло Na<sup>+</sup>-зависимое связывание <sup>3</sup>H-ГАМК синапсосомами коры мозга через 5 и 21 сутки. Как показано нами ранее, инъекция 6-ОНДА с аскорбиновой кислотой в боковые желудочки в 2,5—3 раза снижала содержание норадреналина в коре мозга через 2 и 5 суток [9], количество дофамин также резко снижалось [10]. В условиях дефицита катехоламинов в коре мозга связывание <sup>3</sup>H-ГАМК было значительно выше после введения 6-ОНДА с аскорбиновой кислотой. В отсутствие последней 6-ОНДА снижал Na<sup>+</sup>-зависимое связывание <sup>3</sup>H-ГАМК. В любом случае изменение синапсосомного связывания <sup>3</sup>H-ГАМК в коре мозга после повреждения катехоламинергической системы с помощью 6-ОНДА указывает на возможность прямого или опосредованного действия катехоламинов на пресинаптическое присоединение медиатора в ГАМК-ергической системе неокортекса.

Специфическое  $\text{Na}^+$ -зависимое связывание  $^3\text{H}$ -ГАМК синапсами коры больших полушарий мозга крыс в разные сроки после внутрижелудочкового введения 6-оксидофамина (6-ОНДА) с добавлением или в отсутствие L-аскорбиновой кислоты (в тыс. расп./мин/мг белка)

	2 суток			5 суток			21-23 суток		
	6-ОНДА на физиологическом растворе	Достоверность различий	физиологический раствор.	6-ОНДА на физиологическом растворе	достоверность различий	физиологический раствор	6-ОНДА на физиологическом растворе	достоверность различий	физиологический раствор
С аскорбиновой кислотой	$118,5 \pm 26,0$ (3)	$p > 0,05$	$83,5 \pm 23,9$ (3)	$93,8 \pm 8,9$ (5)	$p < 0,001$	$53,5 \pm 13,1$ (4)	$101,1 \pm 13,4$ (5)	$p < 0,05$	$69,4 \pm 12,0$ (4)
Достоверность различий	$p > 0,05$		$p > 0,05$	$p > 0,05$		$p < 0,001$	—		—
Без аскорбиновой кислоты	$127,2 \pm 37,1$ (4)	$p > 0,05$	$95,0 \pm 28,6$ (3)	$83,4 \pm 31,4$ (5)	$p < 0,05$	$143,2 \pm 30,1$ (5)	—		—

*Примечание.* В скобках указано число опытов. Специфическое  $\text{Na}^+$ -зависимое связывание  $^3\text{H}$ -ГАМК синапсами коры больших полушарий мозга интактных крыс составляло  $118,4 \pm 28,5$  тыс. расп./мин/мг белка (9 опытов).

Вместе с тем, в полученных данных отчетливо проявился эффект аскорбиновой кислоты на  $\text{Na}^+$ -зависимое связывание  $^3\text{H}$ -ГАМК. Так, на 5-е сутки после внутрижелудочкового введения 0,1%-ного раствора L-аскорбиновой кислоты на физиологическом растворе связывание  $^3\text{H}$ -ГАМК было в 2 с лишним раза ниже, чем после введения физиологического раствора (таблица). На таком же низком уровне связывание  $^3\text{H}$ -ГАМК оставалось и через 3 недели после введения раствора аскорбиновой кислоты. Обращает на себя внимание то, что одновременное введение 6-ОНДА и аскорбиновой кислоты снижало ингибирующий эффект на связывание  $^3\text{H}$ -ГАМК, который проявляли оба соединения порознь после внутрижелудочкового введения.

Как уже отмечалось, в литературе описано действие аскорбиновой кислоты на центральные моноаминовые, мускариновые, опиатные рецепторы [5, 11], но эффект аскорбата на связывание  $^3\text{H}$ -ГАМК ранее не наблюдали. Модулирующее действие аскорбиновой кислоты на рецепторное связывание объясняют её влиянием на интенсивность перекисного окисления мембранных липидов [11], играющих важную роль в регуляции  $\text{Na}^+$ -зависимого связывания  $^3\text{H}$ -ГАМК [12]. Вместе с тем, нельзя исключить и другие механизмы влияния аскорбата на рецепторы, возможно, связанные с прямым восстановительным действием этого соединения.

Введение аскорбиновой кислоты в желудочки мозга (в обход ГЭБ), по-видимому, увеличивает её концентрацию в межклеточной жидкости головного мозга, где она строго поддерживается на постоянном уровне [13, 14], что приводит к изменению структуры нервных мембран. Действительно, на ультраструктурном уровне через 2—10 суток после внутрижелудочковой инъекции аскорбиновой кислоты в коре больших полушарий и подкорковых структурах мозга наблюдали характерные перестройки в мембранах аксонов и дендритов, в том числе и в синаптических мембранах [15]. Полученные нами данные свидетельствуют, что как введение аскорбиновой кислоты в мозговые желудочки, так, возможно, и увеличение концентрации аскорбата в ткани головного мозга вследствие каких-либо причин, может вести к продолжительному (не менее 3 недель) снижению интенсивности  $\text{Na}^+$ -зависимого связывания ГАМК и, таким образом, изменять синаптическую активность в ГАМК-ергических нейронах коры мозга.

#### $\text{Na}^+$ -DEPENDENT $^3\text{H}$ -GABA BINDING TO RAT BRAIN CORTICAL SYNAPTOSOMES AFTER THE INTRAVENTRICULAR INJECTION OF 6-HYDROXYDOPAMINE AND ASCORBIC ACID

GRIGOREV I. P., NEOKESARIYSKIY A. A.

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

$\text{Na}^+$ -dependent  $^3\text{H}$ -GABA binding to rat brain cortical synaptosomes 5 and 21 days after the bilateral intraventricular injection of 125  $\mu\text{g}$  of 6-hydroxydopamine with 20  $\mu\text{g}$  of L-ascorbic acid in 20  $\mu\text{l}$  saline

was significantly higher than after the injection of saline. Administration of 6-hydroxydopamine or ascorbic acid alone has a strong inhibitory effect on  $^3\text{H}$ -GABA binding 5 days later. The inhibitory effect of ascorbic acid as well as the possibility of the catecholaminergic influence on  $\text{Na}^+$ -dependent (presumably presynaptic) GABA binding in the neocortex are discussed.

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Emson P. C., Lindvall O. *Neuroscience*, v. 4, p. 1-30, 1979.
2. Moroni F., Bianchi C., Monetti G., Tanganelli S., Spidalieri G., Guandalini P., Beani L. *Brain Res.*, v. 232, p. 216-221, 1982.
3. Kostrzewa R. M., Jacobowitz D. M. *Pharmacol. Rev.*, v. 26, p. 199-288, 1974.
4. Zukin S. R., Young A. B., Snyder S. H. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 71, p. 4802-4807, 1974.
5. Hadjiconstantinou M., Neff N. H. *Neuropharmacol.*, v. 22, p. 939-943, 1983.
6. Høgebum G. H., Schneider W. C., Pallade G. E. *J. Biol. Chem.*, v. 172, p. 619-635, 1948.
7. Fricke U. *Anal. Biochem.*, v. 63, p. 555-558, 1975.
8. Lowry O. H., Rosebrough W. J., Farr A. L., Randall R. J. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265-275, 1951.
9. Отеллин В. А., Кучеренко Р. П., Гилерович Е. Г., Усова И. П., Федосихина Л. А., Туровский В. С., Григорьев И. П., Неокесарийский А. А.—В кн.: Теоретические вопросы строения и деятельности мозга (под ред. О. С. Адрианова), вып. 12, с. 51-55. М., Ин-т мозга ВНИЦПЗ, 1983.
10. Reader T. A. *Brain Res. Bull.*, v. 8, p. 527-534, 1982.
11. Heikkila R. E., Cabbat F. S., Manzino L. J. *Neurochem.*, v. 38, p. 1000-1006, 1982.
12. Chweh A. Y., Lestle S. W. *J. Neurochem.*, v. 38, p. 691-695, 1982.
13. Spector R., Lorenzo A. V. *Amer. J. Physiol.*, v. 226, p. 1468-1473, 1974.
14. Schenk J. O., Miller E., Gaddis R., Adams R. N. *Brain Res.*, v. 253, p. 353-356, 1982.
15. Григорьев И. П., Неокесарийский А. А., Отеллин В. А. Докл. АН СССР, т. 281, № 3, с. 748-750, 1985.

Поступила 20. II 1986

УДК 612.822.1

### ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДА ДЕЛЬТА-СНА НА АКТИВНОСТЬ МОНОАМИНОКСИДАЗ И СОДЕРЖАНИЕ ГИСТАМИНА В МОЗГУ И КРОВИ КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ ХОЛОДОВОГО СТРЕССА

КРИЧЕВСКАЯ А. А., БОНДАРЕНКО Т. И., ГОРОШИНСКАЯ И. А.,  
ХОДАКОВА А. А., \*МИХАЛЕВА И. И., КРУПЕННИКОВА Е. Ю.

Кафедра биохимии и биотехнологии Ростовского государственного университета им. М. А. Сулового,  
\*Институт биоорганической химии АН СССР им. М. М. Шемякина, Москва

Пептид дельта-сна (ПДС) первоначально был выделен как фактор, регулирующий дельта-волновую стадию сна, откуда он получил

свое название [1], однако ПДС, вероятно, обладает более широким спектром регуляторного действия, так как все больше накапливается свидетельств полифункциональности нейропептидов и взаимного «перекрывания» некоторых их эффектов [2]. Нами показан адаптивный эффект ПДС при действии низких температур на организм животных [3]. Можно предположить, что ПДС осуществляет свое действие путем влияния на нейромедиаторные системы, то есть является представителем класса нейромодуляторов.

Ведущая роль в регуляции процессов адаптации к холоду принадлежит симпато-адреналовой системе [4]. Нормальная работа моноаминергических медиаторных систем непосредственно связана с состоянием ключевого фермента обмена моноаминов—митохондриальной МАО (моноамин: кислород-оксидоредуктаза (дезаминирующая), КФ 1.4.3.4).

Важное значение в регуляции адаптационных процессов имеет взаимодействие гистамина с катехоламинергическими медиаторными системами. Гистамин принимает активное участие в стимуляции функций гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, обеспечивая тем самым адаптивную реакцию организма к стрессорному воздействию [5].

Исследовали активность МАО типа А и В в митохондриальной фракции мозга, а также содержание гистамина в мозгу и крови крыс при действии холода в течение 3-х суток—период стресс-синдрома и протекторное действие ПДС у животных в состоянии холодового стресса.

Исследования проводили на белых крысах-самцах массой 150—180 г. Действие холода на животных изучали в зимние месяцы (январь-февраль). Подопытных крыс помещали в холодовую камеру с температурой 0—2°. В опыт брали животных на 3-и сутки действия холода. Контролем служили крысы того же возраста и веса, содержащиеся в условиях вивария при температуре 20—22°. Животным подопытной группы внутривенно вводили ПДС в дозе 12 мкг/100 г массы, после чего их помещали в холодовую камеру на 3 суток. Этот период определяется как стрессорный, что выявляется по гормональным сдвигам и усилению катаболизма [6—8]. Для определения активности МАО мозг гомогенизировали в 0,25 М растворе сахаразы, приготовленном на 0,02 М фосфатном буфере, рН 7,45. Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования [9]. О дезаминировании серотонина и глюкозамина судили по освобождению аммиака после инкубации суспензии митохондрий с одним из субстратов в насыщающей концентрации. Инкубацию проводили в воздушной среде при 37,5° и рН 7,45 в течение 30 мин. Содержание аммиака определяли фенолгипохлоридным методом после изотермической отгонки [10], белок—методом Lowry в модификации Schachterle, Pollak [11], содержание свободного гистамина—как описано ранее [12]. ПДС, имеющий структуру Trp-Ala-Gly-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu, синтезировали в институте биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва.

При трехсуточном холодовом стрессе активность МАО типа А с субстратом серотонином снижается на 28% по сравнению с контролем ( $p < 0,01$ ), что сопровождается изменением субстратной специфичности фермента: он приобретает способность дезаминировать глюкоза-

мин. Интенсивность дезаминирования глюкозамина при холодовом стрессе увеличивается почти в 17 раз (таблица). Активность MAO типа Б при холодовом стрессе не изменяется. Снижение активности

Таблица

Активность моноаминоксидаз (MAO) мозга и содержание гистамина в мозгу и крови при действии холодового стресса и введении ПДС (n=8—16)

Условия опыта	Активность MAO (в нмоль N <sup>15</sup> NH <sub>2</sub> мг белка/мин)		MAO Б	Гистамин (в мкг/г ткани или мкг/мл)	
	MAO А (субстраты дезаминирования)			мозг	кровь
	серотонин	глюкозамин			
Контроль	8,00±0,47	0,21±0,09	3,43±0,16	0,96±0,07	0,24±0,02
ПДС (12 мкг/100 г)	7,83±0,74	0,18±0,17	1,79±0,09*	1,10±0,12	0,25±0,04
Холод	5,73±0,42*	3,54±0,46*	3,20±0,21	1,55±0,13*	0,49±0,06*
Холод+ПДС (12 мкг/100 г)	5,15±0,66*	0,57±0,25	1,79±0,07*	0,86±0,09	0,32±0,04*

Примечание: \*—статистически достоверные изменения по отношению к контролю (p<0,01—0,001)

MAO типа А способствует повышению в тканях уровня моноаминов и активированию моноаминергических медиаторных систем. Повышение функциональной активности симпато-адреналовой системы рассматривают как важнейший фактор адаптации к холоду. Вместе с тем появление способности MAO типа А дезаминировать аминоксахара и некоторые другие азотсодержащие компоненты клетки может быть одной из причин нарушения метаболизма при холодовом стрессе, в частности обусловить повреждение структуры и изменение проницаемости мембран.

Одним из факторов, способствующих активированию симпато-адреналовой системы по гуморальному механизму активации, является высокое содержание гистамина в тканях и крови [13]. Холодовое стресс сопровождается увеличением количества гистамина в мозгу на 61 и в крови на 110% (таблица), что является результатом общей стресс-реакции, для которой характерен значительный прирост количества гистамина в крови и тканях [13], и свидетельствует об активировании гистаминергической медиаторной системы. Проницаемость ГЭБ при действии холода увеличивается [14]. Повышение содержания гистамина, являющегося нейрогуморальным регулятором тонуса кровеносных сосудов и проницаемости капилляров, влияет, по-видимому, в значительной степени на нарушение мозгового кровообращения при холодовом стрессе, поскольку на 3-и сутки наблюдается нарастание отека ткани мозга [15].

Однократное введение ПДС в дозе 12 мкг/100 г массы intactным животным не приводит к изменению активности MAO типа А как с субстратом серотонином, так и с глюкозамином, однако почти в 2 ра-

за уменьшается активность MAO типа Б. Вероятно, ПДС или продукты его метаболизма являются ингибиторами MAO типа Б.

Однократное введение ПДС в дозе 12 мкг/100 г массы intactным животным не приводит к изменению содержания гистамина как в мозгу, так и в крови животных, а при холодовом стрессе не оказывает нормализующего эффекта на активность MAO типа А—она на 29% ниже по сравнению с контролем. Активность MAO типа Б почти в 2 раза ниже контрольного уровня. Важно отметить, что введение ПДС холодовым животным предотвращает изменение субстратной специфичности MAO типа А. Таким образом, изменение субстратной специфичности MAO типа А при действии холода является, по-видимому, проявлением повреждения, в то время как снижение активности фермента может иметь адаптивный характер. Холодовая адаптация предотвращает изменение субстратной специфичности MAO типа А. Аналогичный эффект оказывает введение холодовым животным ПДС.

Однократное введение ПДС в дозе 12 мкг/100 г массы животным при холодовом стрессе приводит к нормализации уровня гистамина в мозгу. В крови его уровень остается на 33,9% выше контроля, но на 36,2% ниже, чем в крови животных, подвергшихся холодовому стрессу. Следовательно, ПДС обладает антигистаминным эффектом при холодовом стрессе.

Таким образом, для холодового стресса характерно комплексное нарушение активности медиаторных систем, обуславливающее развитие как приспособительных, так и патологических изменений в организме. ПДС препятствует стрессорным изменениям в организме на начальном этапе холодового воздействия, и его введение способствует быстрому выходу животных из состояния холодового стресса. Ускорению адаптации, вероятно, способствует нормализация обмена нейромедиаторов. ПДС, введенный в организм, или продукты его метаболизма могут обладать способностью запускать комплекс нейрохимических реакций, перестраивающих рецепторные структуры нейронов и метаболизм нейромедиаторов.

#### EFFECT OF DELTA-SLEEP INDUCING PEPTIDE (DSIP) ON THE ACTIVITY OF MAO AND HISTAMINE IN RAT BRAIN AND BLOOD UNDER COLD STRESS CONDITIONS

KRICHEVSKAYA A. A., BONDARENKO T. I., GOROSHINSKAYA I. A.,  
KHODAKOVA A. A., \*MIKHALEVA I. I., KRUPENNIKOVA E. Yu.

Rostov state University; \*Institute of Bioorganic Chemistry, USSR  
Academy of Sciences, Moscow

Under cold stress conditions (exposure to 2°C for 3 days). The activity of MAO type A in rat brain mitochondrial fraction decreases for 28%, while the deamination of glucosamine increases 17-fold. There is no change in MAO type B activity. One-time injection of DSIP (12 µg/100

g b. w) does not affect the activity of MAO type A neither with serotonin nor with glucosamine, while the activity of MAO type B drops 2-fold; histamine content in brain and blood does not change. Injection of DSIP followed by exposure to cold results in a decrease in MAO type A and type B activity for 29% and 50% respectively. DSIP prevents a shift in the specificity of MAO type A that accompanies the adaptation to cold and exerts an antihistaminic effect in cold stress conditions.

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Monnier M., Dudler L., Gachter R., Maier P. F., Schoenenberger G. A. *Experientia*, v. 33, p. 548—552, 1974.
2. Ашмарик И. П., *Нервная система*, № 23, с. 105—111, Л., ЛГУ, 1982.
3. Кричевская А. А., Бондаренко Т. И., Горошинская Н. А., Крупенинкова Е. Ю., Михалева И. И., Ходакова А. А.—В кн.: Стресс, адаптация и функциональные нарушения, с. 343, Кишинев, Штиница, 1984.
4. Пастухов Ю. Ф., Хаскин В. В. *Успехи физиол. наук*, т. 10, № 3, с. 121—142, 1979.
5. Хайдарлиу С. Х. *Функциональная биохимия адаптации* (под ред. Ф. Н. Фурдуй), Кишинев, Штиница, 1984.
6. Ардашев А. А., Семикина В. В., Мосин А. Ф.—В кн.: Нейроэндокринные корреляции, с. 77—84, Владивосток, ДВНЦ, 1978.
7. Майстрах Е. В. *Физиол. журн. СССР*, т. 65, № 11, с. 1582—1591, 1979.
8. Щеглова А. И.—В кн.: Физиологические адаптации к теплу и холоду, с. 70—77, Л., Наука, 1969.
9. Москвитина Т. А.—В кн.: Современные методы в биохимии (под ред. В. Н. Ореховича), с. 22—26, М., Медицина, 1977.
10. Горкин В. Э., Вережкина И. В., Гриднева Л. И., Жердеви Л. В. (Брусова), Кляшторни Л. Б., Кривченкова Р. С., Комиссарова Н. В., Леонтьева Г. А., Романова Л. А., Северина И. С., Фейгина С. М.—В кн.: Современные методы в биохимии (под ред. В. Н. Ореховича) с. 155—177, М., Медицина, 1968.
11. Schachterle G. R., Pollak R. L. *Anal. Biochem.*, v. 51, p. 651—655, 1973.
12. Коробова Л. И., Ходакова А. А., Френкель М. Л. *Лаб. дело*, № 4, с. 199—202, 1982.
13. Вайсфельд И. Л., Кассиль Г. И. *Гистамин в биохимии и физиологии*, М., Наука, 1981.
14. Сулонова Г. А., Сулонов Ю. П.—В кн.: Биологические проблемы Севера, с. 64—65, Кировск, 1979.
15. Пандикова А. И.—В кн.: Научные труды Омского медицинского института, № 75, *Вопр. морфо-физиологических основ грязелечения*, вып. 4, с. 102—105, Омск, 1968.

Поступила 16. III 1986

## ВЛИЯНИЕ ПУРИНОВЫХ И ПИРИМИДИНОВЫХ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ НА РНК-ПОЛИМЕРАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ ЯДЕР КЛЕТОК ГОЛОВНОГО МОЗГА

ГАЛСТЯН Г. Г., ЗАХАРЯН Р. А., ХАЧАТРЯН Г. С.

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР, Ереван

Известно, что нейромедиаторы и другие нейроактивные вещества, регулируя функциональную активность клеток головного мозга, могут стимулировать экспрессию их генетического аппарата [1, 2]. В большинстве случаев действие нейромедиаторов на синтез РНК реализуется сАМР и сGMP-зависимым фосфорилированием хроматинных белков [3, 4]. Установлено участие этих циклических нуклеотидов в регуляции компенсаторного синтеза нейромедиаторов [5]. Однако сведения об участии циклических нуклеотидов в регуляции синтеза РНК в клетках головного мозга в основном касаются нейронов. Мало изучена роль циклических нуклеотидов в регуляции синтеза РНК в глиальных клетках [6], практически нет сведений о ядерной функции пиримидиновых циклических нуклеотидов в клетках головного мозга.

Морфологические, функциональные и биохимические различия нейронов и клеток глиии послужили основанием для изучения и сопоставления взаимодействия систем циклических нуклеотидов при регуляции синтеза РНК в указанных клетках.

Эксперименты проводили на белых беспородных 3—4-недельных крысах-самцах. Обогащенные фракции нейронов и глиальных клеток выделяли по методу Blomstrand, Hamburger [7]. Действие циклических нуклеотидов на синтез РНК изучали в бесклеточной РНК-синтезирующей системе, состоящей из ядер нейронов или глиальных клеток и dialизованного цитозоля. Субклеточное фракционирование и очистку ядер проводили по методу Nepp [8]. Дифференциальное определение активностей I и II форм РНК-полимеразы осуществляли по модифицированному методу Гаузе и соавт. [9]. Минимальные эффективные концентрации сАМР, сGMP, сUMP и сCMP в реакционной смеси соответственно составляли  $5 \times 10^{-6}$ ,  $5 \times 10^{-7}$ ,  $10^{-5}$  и  $5 \times 10^{-7}$  М. В сочетании с сАМР эффективная концентрация сUMP составляет  $5 \times 10^{-7}$  М. Реакционную смесь инкубировали при  $37^\circ$  в течение 20 мин. Активность РНК-полимеразы выражали в пмоль включенного за период инкубации  $[^{14}\text{C}]$ UMP/мг ДНК.

Каждая серия экспериментов состояла из 6—8 опытов. Полученные данные подвергали статистической обработке по Стьюденту-Фишеру.

Как видно из данных, приведенных в таблице, при действии сАМР в ядрах нейронов и глиальных клеток активность I формы РНК-полимеразы по сравнению с контролем увеличивается соответственно на 41 и 57%. При этом активность II формы РНК-полимеразы глиальных ядер возрастает на 37%, а в ядрах нейронов наблюдается некоторое понижение активности этой формы РНК-полимеразы. При действии сGMP в ядрах обеих клеточных фракций главным образом

стимулируется активность II формы РНК-полимеразы, ее активность в ядрах нейронов и клеток глии по сравнению с контролем повышается соответственно на 35 и 46%. При этом активность I формы

Таблица

Влияние циклических нуклеотидов на РНК-полимеразную активность ядер нейронов и глиальных клеток в бесклеточной РНК-синтезирующей системе (пмоль [ $^{14}\text{C}$ ]UMP/мг ДНК)

Исследуемые вещества	Ядра нейронов		Ядра глиальных клеток	
	I форма РНК полимеразы*	II форма РНК полимеразы	I форма РНК полимеразы*	II форма РНК полимеразы
Контроль	110±12	315±33	82±8	221±23
cAMP	156±16	266±28	129±15	303±29
p	<0,1	<0,5	<0,05	<0,1
cGMP	133±14	425±44	99±10	323±31
p	<0,5	<0,1	<0,5	<0,05
cUMP	130±14	377±40	94±10	269±26
p	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
cCMP	98±9	307±29	87±9	278±27
p	>0,5	>0,5	0,5	<0,2
cAMP+cGMP	138±15	406±13	123±11	311±32
p	<0,5	<0,05	>0,5	>0,5
cAMP+cUMP	149±14	281±26	159±14	2,3±25
p <sub>1</sub>	>0,5	>0,5	=0,2	>0,5
cAMP+cCMP	162±15	358±39	111±11	314±23
p <sub>1</sub>	>0,5	<0,1	>0,5	>0,5

Примечание. \* при определении активности I формы РНК-полимеразы инкубационная смесь (0,5 мл) содержала 75 мМ трис-НСI буфер, рН 8,0; 0,05 мМ ЭДТА; 0,08 мМ DTT; 1,5 мМ спермидина; 0,1 мМ CaCl<sub>2</sub>; 10 мМ MgCl<sub>2</sub>; АТР, GTP и CTP—по 0,32 мМ; 0,06 мМ немеченый УТР и 0,034 мМ [ $^{14}\text{C}$ ]УТР (4 мкКи). При определении активности II формы РНК-полимеразы рН смеси доводили до 7,5, добавляли 320 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и вместо MgCl<sub>2</sub> вносили 2 мМ MnCl<sub>2</sub>. p<sub>1</sub>—достоверность по отношению к пробам с cAMP.

РНК-полимеразы в ядрах обеих фракций увеличивается всего на 20%. Следует отметить, что минимально эффективные концентрации cAMP и cGMP находятся в пределах их физиологического содержания в клетках головного мозга [10]. Действие cUMP проявляется при концентрации 10<sup>-5</sup> М и выше, что значительно превышает его физиологическое содержание в тканях. При действии cCMP стимулируется только II форма РНК-полимеразы ядер глиальных клеток, активность которой повышается на 26%. Этот результат интересен в том плане, что cCMP имеет определенные регуляторные функции в менее дифференцированных и быстро растущих тканях [11]. Эффективная концентрация cCMP также оказалась выше его нормального содержания в тканях [11].

Очевидно, что в условиях организма циклические нуклеотиды не могут функционировать изолированно и находятся в тесном взаимодействии друг с другом. Функциональное взаимодействие систем cAMP и cGMP в ядрах ряда тканей описано в литературе [12]. Результаты

проведенных нами исследований дают дополнительную информацию о взаимодействии систем циклических нуклеотидов. cGMP и cCMP устраняют ингибирующее действие cAMP на активность II формы РНК-полимеразы ядер нейронов, в то время как cUMP несколько усиливает эффект cAMP на активность I формы РНК-полимеразы ядер глимальных клеток.

Полученные результаты показывают, что в регуляции синтеза РНК в клетках головного мозга соответствующие пуриновые и пиримидиновые циклические нуклеотиды (cAMP и cUMP, cGMP и cCMP) проявляют определенный синергизм. Можно отметить также неодинаковый характер реакций ядер нейронов и глимальных клеток на действие различных циклических нуклеотидов.

## THE EFFECT OF PURINE AND PYRIMIDINE CYCLIC NUCLEOTIDES ON THE ACTIVITY OF RNA-POLYMERASE IN BRAIN CELLS NUCLEI

GALSTIAN H. G., ZAKARIAN R. A., KHACHATRIAN G. S.

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

The nuclei of neuronal and glial cells respond differently to the action of cAMP. The activity of the 1st form of RNA-polymerase increased significantly in both fractions, while the activity of the 2nd form diminished in the neuronal and increased in the glial nuclei. In both fractions cGMP stimulated the activity mainly of the 2nd form of RNA-polymerase. It was established, that the corresponding purine and pyrimidine cyclic nucleotides (cAMP—cUMP, cGMP—cCMP) exert a kind of a synergism when regulating RNA synthesis.

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Хачатрян Г. С. Биохимия нуклеиновых кислот и высшие функции головного мозга, Ереван, Айастан, 1981.
2. Куликова О. Г., Белянцева Л. М., Разумовская Н. М., Бородин Ю. С. Нейрохимия, т. 4, с. 3—9, 1985.
3. Greengard P. Harvey Lect. ser., v. 75, p. 277—331, 1981.
4. Кочетков С. Н., Абдурагимов А. Р., Лукашина Т. Н., Северин Е. С. Биохимия, т. 49, с. 344—348, 1984.
5. Lewis E. C., Tank A. W., Weiner N., Chikaraichi D. G. J. Biol. Chem., v. 258, p. 14632—14637, 1983.
6. Schwartz J. P., Costa E. J. Biol. Chem., v. 255, p. 2943—2948, 1980.
7. Blomstrand S., Hamberger A. J. Neurochem., v. 16, p. 1401—1407, 1969.
8. Henn F. A. Adv. Cell. Neurobiol., v. 1, p. 379—403, 1981.
9. Гаузе Л. Н., Экизашвили В. К., Кафизани К. А. Биохимия, т. 45, с. 1017—1024, 1980.
10. Steiner A. L., Pagliara A. S., Chase L. R., Kipnis D. M. J. Biol. Chem., v. 247, p. 1114—1120, 1972.
11. Bloch A. Adv. in Cyclic Nucl. Res. (Eds. Drummond S. A., Greengard P., Robison G. A., Pedd I.), p. 331—339, N. Y., Raven Press, 1979.
12. Johnson E. M., Hadden J. W. Science, v. 187, p. 1198—1200, 1975.

Поступила 10. IX 1986

## РЕГУЛЯЦИЯ МАЛАТОМ СКОРОСТИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ В МИТОХОНДРИЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ РАЗЛИЧНЫХ СУБСТРАТОВ ДЫХАНИЯ

ЗАГОСКИН П. П., САМАРЦЕВ В. Н.

Государственный медицинский институт, Горький

Основная доля энергии в ткани головного мозга производится за счет митохондриального дыхания, сопряженного с синтезом АТР, при окислении NAD-зависимых субстратов и сукцината, образующихся из глюкозы [1].

Среди NAD-зависимых субстратов, окисляющихся в митохондриях, важная роль принадлежит малату. Этот метаболит, помимо способности окисляться митохондриальной дыхательной цепью, участвует в транспорте восстановительных эквивалентов через малат-аспаратный шунт [2] и активнрует транспорт других NAD-зависимых субстратов, например цитрата [3].

Вместе с тем, остается неизученной возможность регуляции малатом скорости окислительного фосфорилирования при окислении других субстратов в митохондриях мозга.

Целью настоящей работы явилось исследование действия малата на скорость и кинетические показатели окислительного фосфорилирования в митохондриях мозга при использовании разных субстратов окисления.

Опыты проводили на белых крысах-самцах. Митохондриальную фракцию выделяли из ткани мозга дифференциальным центрифугированием [4]. Среда выделения (в мМ): сахараза—250, трис-НСI—10, ЭДТА—1, рН—7,4. Дыхание регистрировали полярографическим методом с применением открытого платинового электрода сферической формы. Среда инкубации (в мМ): сахараза—250, КСI—15,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ —20, трис-НСI—5, ЭДТА—0,5, рН—7,4. Субстраты дыхания (в мМ): глутамат—10, сукцинат—5, аскорбат+тетраметил-п-фенилендиамин (ТМФД)—2 и 0,2 соответственно. В опытах с сукцинатом и аскорбатом+ТМФД NADH-дегидрогеназный участок дыхательной цепи ингибировали ротеноном (3 мкМ). Малат, АDP, АТР, 2,4-динитрофенол (ДНФ) в виде водных растворов объемом 0,01 мл добавляли в полярографическую ячейку с помощью микрошприца МШ-10.

Как показано в таблице, добавление в среду инкубации 1 мМ малата приводит к увеличению скорости фосфорилирования АDP (ADP/t) на 45—55% со всеми субстратами. В случае применения сукцината и аскорбата+ТМФД использование малата в качестве субстрата дыхания устранялось ротеноном.

Скорость дыхания в состоянии 3 ( $V_3$ ) под влиянием малата также увеличивалась, что наиболее отчетливо выявилось в опытах с глутаматом и сукцинатом в качестве субстратов. Малая выраженность последнего эффекта при использовании аскорбата+ТМФД связана,

по-видимому, со значительной долей нефосфорилирующего окисления в состоянии 3, на что указывает относительно низкая величина дыхательного контроля с этим субстратом. Нефосфорилирующее окисление ( $V_4$ ) со всеми тремя субстратами под действием малата не

Таблица

Влияние малата на скорость дыхания и фосфорилирования ADP в митохондриях мозга при использовании различных субстратов дыхания (концентрация добавленного ADP—300 мкМ, ДНФ—80 мкМ). Скорость дыхания выражалась в нг-атомах O/мин/мг белка, скорость фосфорилирования—в нмоль ADP/мин/мг белка

Субстрат	Исследуемые показатели				
	ADP/t	$V_3$	$V_4$	$V_{ДНФ}$	дыхательный контроль
Глутамат	374,4±9,6	86,70±2,04	24,00±1,69	120,40±3,81	3,66±0,28
Глутамат+малат	532,2±44,2*	113,0±6,3*	23,30±1,45	129,1±7,1	4,89±0,36*
Сукцинат	265,2±18,0	84,6±4,4	37,5±1,2	120,80±3,48	2,37±0,14
Сукцинат+малат	383,3±30,5*	103,7±4,4*	40,60±1,97	116,7±4,8	2,69±0,22
Аскорбат+ТМФД	164,0±6,2	131,0±8,2	104,5±6,7	190,7±21,2	1,25±0,025
Аскорбат+ТМФД+малат	253,9±18,5*	148,3±7,5	108,9±4,13	192,8±10,4	1,37±0,024*

Примечание. \*—достоверное различие ( $p < 0,05$ ).

изменялась. Дыхательный контроль в присутствии малата проявлял тенденцию к повышению. В то же время малат не влиял на скорость разобщенного ДНФ дыхания ( $V_{ДНФ}$ ).

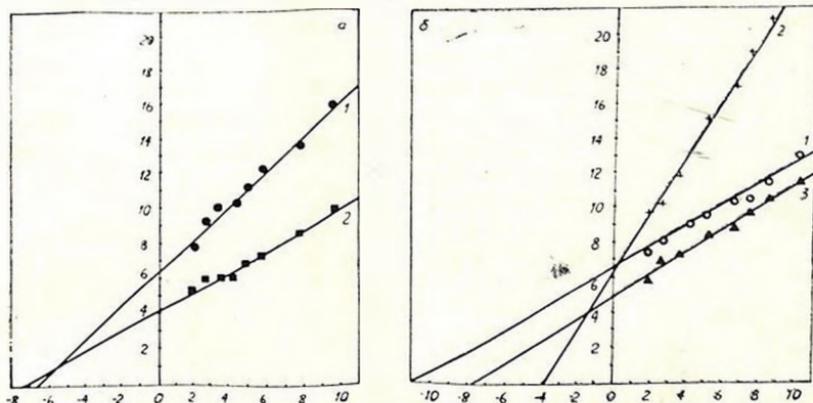


Рис. Влияние малата на кинетику окислительного фосфорилирования. а—глутамат, 10 мМ (1), глутамат, 10 мМ+малат, 5 мМ (2); б—глутамат, 10 мМ (1), глутамат, 10 мМ+АТР, 2 мМ (2), глутамат, 10 мМ+малат, 5 мМ+АТР, 2 мМ (3)

Кинетические исследования зависимости скорости фосфорилирования ADP в присутствии и в отсутствие малата показали, что малат значительно повышает величину  $V$  без изменения кажущейся  $K_m$  для ADP (рисунок, а). Известно, что внемитохондриальный АТР яв-

ляется конкурентным ингибитором транспорта ADP внутрь митохондрий, осуществляемого адениннуклеотидтранслоказой [5], поэтому избыток АТФ снижает скорость окислительного фосфорилирования [6]. По нашим данным, АТФ повышал кажущуюся  $K_m$  для ADP в 3 раза (128 мкМ по сравнению с 45 мкМ) без изменения  $V$  (рисунок б), что свидетельствует о конкурентном ингибировании окислительного фосфорилирования. Добавление малата помимо повышения  $V$ , приводило к заметному снижению ингибирующего эффекта АТФ, что выражалось в увеличении  $K_i$  с 1,1 до 5,3 мМ. Таким образом, процессы избирательной активации малатом только фосфорилирующего дыхания, не связанного с его окислением, увеличения  $V$  кинетики фосфорилирования ADP, а также понижения ингибирующего действия АТФ на этот процесс позволяют предположить, что действие малата при указанных экспериментальных условиях не связано с окислением его как добавочного NAD-зависимого субстрата, а свидетельствует о его регуляторном влиянии на окислительное фосфорилирование.

Среди ферментативных систем, участвующих в регуляции скорости утилизации ADP при окислительном фосфорилировании, ведущее место занимает адениннуклеотидтранслоказа [7—9]. Экспериментально найденный вклад этого переносчика в контроль фосфорилирующего дыхания в зависимости от условий опыта может колебаться от 29 до 50% и более [7, 8]. Теоретически же обосновано, что эта величина может достигать 90% среди всех систем, участвующих в регуляции [9].

Логично предположить, что действие малата направлено именно на переносчик адениннуклеотидов. Есть основания также считать, что *in vivo* малат участвует в регуляции окислительного фосфорилирования в головном мозгу и печени. Значительное повышение его тканевой концентрации при гипоксии [10, 11], физической нагрузке [12, 13] и действии гормонов [14] служит доводом в пользу последнего утверждения.

## EFFECT OF MALATE ON THE REGULATION OF OXIDATIVE PHOSPHORYLATION IN BRAIN MITOCHONDRIA

ZAGOSKIN P. P., SAMARTSEV V. N.

Medical School, Gorky

The effect of malate on the velocity of oxidative phosphorylation in brain mitochondria of rats was studied with glutamate, succinate and ascorbate with TMPD. It was found that malate increases this process regardless of the substrate type and decreases the inhibiting action of ATP on phosphorylation velocity.

The regulatory effect of malate is supposed to be realized through adenine nucleotide translocase.

1. Jung D. W., Brierley G. P. *Handb. Neurochem.*, v. 3, p. 295—319, 1983.
2. La Noul K. F., Schoolwerth A. C. *Annu. Rev. Biochem.*, v. 48, p. 871—922, 1979.
3. Patel M. S. *Brain Res.*, v. 98, № 3, p. 607—611, 1975.
4. Еуценко Н. Д.—В кн.: Методы биохимических исследований (под ред. М. И. Прохоровой), с. 29—33, ЛГУ, 1982.
5. Klingenberg M. J. *Membrane Biol.*, v. 56, № 2, p. 97—105, 1980.
6. Davis E. J., Davis-Van Thienen W. I. A. *Arch. Biochem. and Biophys.*, v. 233, № 2, p. 573—581, 1984.
7. Tager J. M., Wanders R. J. A., Groen A. K., Kunz W., Bohnsack R., Kuster U., Letko G., Böhme G., Duszyński J., Wojtczak L. *FEBS Lett.*, v. 151, № 1, p. 1—9, 1983.
8. Gellerich F. N., Bohnsack R., Wolfgang K. *Biochim. et biophys. acta.* v. 722, № 2, p. 381—391, 1983.
9. Холоденко Б. Н. *Биофизика*, т. 29, № 3, с. 453—458, 1984.
10. Siesjö B. K. *Brain Energy Metabolism*.—John Wiley and sons; (A. Wiley—Interscience Publication), 1978.
11. Хватова Е. М.—В кн.: Дегидрогеназы в норме и патологии (под ред. Е. М. Хватовой), Горький, мед. институт, 1980.
12. Hanson R. D., Gray R. M., Alberti K. G. M. *M. J. Appl. Physiol. Respir. Environ. and Exercise Physiol.*, v. 51, № 5, p. 1326—1330, 1981.
13. Бобылёва-Кварриеро В., Ларди Г. Тезисы докл. XVI Конференции Федерации европейских биохимических обществ, с. 294, М., 1984.
14. Ларди Г., Бобылёва-Кварриеро В. Тезисы докл. XVI Конференции Федерации европейских биохимических обществ, с. 299, М., 1984.

Поступила 11. I 1986.

---

В ИЗДАТЕЛЬСТВЕ «МЕДИЦИНА» готовится к печати в 1987 г. монография  
 Хватовой Е. М., Сидоркиной А. Н., Мироновой Г. В. «Нуклеотиды мозга»  
 (метаболизм при кислородном голодании). 13 л.

Монография посвящена актуальной проблеме энергетики мозга в норме и при недостатке кислорода. Представлены современные сведения об особенностях обмена, энергетической и регуляторной функции адениновых и гуаниновых нуклеотидов мозговой ткани. Подчеркнута особая роль гуаниновых нуклеотидов. Разобраны обменные преобразования АМР, ферментативные реакции распада этого нуклеотида и роль аденозина в мозговой ткани. Подводятся итоги многолетних исследований энергетики мозга при разных формах кислородной недостаточности. Определяется роль нуклеотидов в оценке тяжести гипоксии мозга.

Книга представляет интерес для нейрохимиков, биохимиков общего профиля, нейрофизиологов, невропатологов, нейрохирургов, психопатологов и других специалистов, интересующихся проблемами метаболизма мозга.



Письма в редакцию

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

НОВЫЙ КАЛЬЦИЙНЕЗАВИСИМЫЙ ПЕПТИДНЫЙ АКТИВАТОР  
ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ ЦИКЛИЧЕСКИХ  
НУКЛЕОТИДОВ МОЗГА

ГАЛОЯН А. А., ГУРВИЦ Б. Я.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Из гипоталамуса быка выделен пептидный фактор, обладающий способностью активировать высокоочищенную кальмодулинзависимую фосфодиэстеразу (ФДЭ) сАМР мозга быка, отделенную от эндогенного кальмодулина (КМ). При этом активация ФДЭ достигала уровня, наблюдаемого в присутствии КМ, однако, в отличие от КМ, для осуществления этого эффекта не требуется  $Ca^{2+}$ .

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

Показано, что в присутствии известных ингибиторов КМ-зависимых ферментов, трифторперазина и W—7, стимулирующее действие активатора тормозится. Это может свидетельствовать о связывании указанных соединений с активатором  $Ca^{2+}$ -независимым способом, в отличие от их взаимодействия с КМ, требующего присутствия  $Ca^{2+}$ .

Действие активатора на ФДЭ не проявлялось после его инкубации с трипсином, что подтверждает пептидный характер этого соединения. Выделенный пептид отличается термостабильностью. Чувствительность ФДЭ к активатору изменялась в зависимости от степени очистки фермента, определяющей, вероятно, конформационное состояние ФДЭ, доступность ее аллостерических центров, наличие в препаратах фермента соединений—антагонистов активатора и других эффектов.

Ранее было установлено, что коронароактивные нейропептиды, выделенные нами из мозга и сердца, являются ингибиторами ФДЭ циклических нуклеотидов. К их числу относятся коронарорасширяю-

иные соединения: нейрогормон «С» (иС) и его множественные формы, нейрогормон «Г», триптические гидролизаты нейрогормона «К», факторы, выделенные из сердечной мышцы и др. [1]. Было показано, что иС и его аналоги ингибируют главным образом КМ-зависимую форму частично очищенной ФДЭ мозга и сердца.

Результаты настоящих экспериментов свидетельствуют о том, что пептидный активатор ФДЭ сопровождается иС на всех этапах его очистки, включающих гель-фильтрацию, ионообменную и тонкослойную хроматографию. Лишь с помощью обратнофазовой жидкостной хроматографии при высоком давлении удалось разделить активатор и ингибитор ФДЭ. На основании этих результатов в совокупности с данными, полученными ранее, можно предположить, что стимулирующий и ингибирующий ФДЭ факторы образуют высокоэффективный комплекс в составе препарата иС, регулирующий проявление его кардиотропного действия.

Обнаруженный  $\text{Ca}^{2+}$ -независимый активатор ФДЭ циклических нуклеотидов был нами назван С-модулином. По количественным данным, на ФДЭ имеются, по крайней мере, 2 центра для С-модулина ( $n_n = 2$ ), а иС, по нашим данным, является конкурентным ингибитором ФДЭ сАМР [2]. В нашей лаборатории накоплен значительный материал, свидетельствующий о наличии множественных форм пептидов, в том числе глукотрипептидов,  $\text{Ca}^{2+}$ -независимых активаторов ФДЭ в мозгу.

В настоящее время известен ряд факторов, вызывающих  $\text{Ca}^{2+}$ -независимую активацию не только ФДЭ, но и других КМ-зависимых систем. К их числу относятся жирные кислоты и фосфолипиды [3] (однако сродство этих соединений к ферменту на 4—5 порядков ниже по сравнению с КМ), белковый аналог КМ, названный бактериомодулином [4], ограниченный протеолиз и др. При этом активирующий эффект, как правило, сопряжен с участием КМ-связывающего центра. Важно подчеркнуть, что известная полифункциональность КМ предопределяет его влияние не только на ФДЭ циклических нуклеотидов, но и на многие другие белки и ферменты. Можно предположить, что при лимитированной концентрации КМ или же  $\text{Ca}^{2+}$  взаимодействие с ним каждого из множества КМ-зависимых белков будет затруднено. В этом случае решающую роль играют компартиментизация того или иного фермента, изменения концентрации субстрата и  $\text{Ca}^{2+}$ , регулирующих чувствительность фермента к КМ, и др. факторы. Особый интерес в этой связи представляют КМ-подобные, но  $\text{Ca}^{2+}$ -независимые регуляторы в клетке, подобно С-модулину и его множественным формам, которые могут стимулировать ФДЭ сАМР в гораздо меньших концентрациях, чем кальмодулин. Видимо, этим можно объяснить исключительно высокую ФДЭ активность мозга, когда концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  составляет  $\approx 10^{-7}$  М (то есть тогда, когда еще  $\text{Ca}^{2+}$  не в состоянии связываться с кальмодулином). Можно предположить, что С-модулин является также регулятором других КМ-зависимых ферментов.

# NOVEL CALCIUM-INDEPENDENT PEPTIDE ACTIVATOR OF CYCLIC NUCLEOTIDES PHOSPHODIESTERASE FROM BRAIN

GALOYAN A. A., GURVITS B. Ya.

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

A  $Ca^{2+}$ -independent activator of highly-purified calmodulin-dependent cAMP PDE from brain has been detected in bovine hypothalamus. The affinity of this activator to enzyme is close to that of calmodulin.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Galoyan A. *Neurochem. Res.*, v. 11, № 6, p. 769—787, 1986.
2. Galoyan A., Gurvitz B., Saribekian G., Kirakosova A. *Advances in the Biosciences*, (eds. G. Cehovic, G. A. Robison), p. 165—181, Pergamon Press, N. Y., 1979.
3. Wolff D. I., Brostrom C. O. *Arch. Biochem. and Biophys.*, v. 173, p. 720—731, 1976.
4. Alakhov V. Yu., Emelyanenko E. I., Shakhparonov M. I., Dudkin S. M. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, v. 132, p. 591—597, 1985.

С 1 квартала 1987 г. издательство «Наука» будет выпускать новый ежеквартальный журнал «СЕНСОРНЫЕ СИСТЕМЫ»

Журнал будет публиковать статьи экспериментального характера и обзоры по актуальным проблемам физиологии органов чувств: механизмам сенсорной рецессии, передачи и переработки информации на всех уровнях сенсорных систем, реализации сенсорной информации, опознавания образов, по моделированию сенсорных процессов и функций, а также по прикладным (медицинским, робототехническим и т. д.) аспектам сенсорной физиологии.

Индекс журнала в «Каталоге советских газет и журналов» на 1987 г.—70810. Подписная цена за год (4 номера)—5 р. 20 к.

Адрес редакции: 117512, Москва, В-312, ул. Вавилова, 39, к. 20.

ХУЧО Ф. *Нейрохимия. Основы и принципы* (англ., перевод с нем.). СН, 326 с., 1986.  
HUCCO F. *Neurochemistry. Fundamentals and Concepts*. (Transl. by Margaret Dickins), Weinheim, FRG, VCH.—326 p., 1986.

Монография немецкого автора освещает молекулярные основы функций нервной системы. В книге содержится информация о таких важнейших направлениях нейрохимических исследований, как зрение, структура и функция мембран, электрические свойства нервных клеток, синапсы и рецепторы, пластичность, обучение и память.

Предназначается для биохимиков, фармацевтов, молекулярных биологов, врачей, студентов биологических и медицинских специальностей.

ПЕПТИДЫ, МОЗГОСПЕЦИФИЧЕСКИЕ БЕЛКИ И  
АГРЕССИВНОЕ ПОВЕДЕНИЕ

ШЕРСТНЕВ В. В., РЫЛОВ А. Л., ГРОМОВ А. И.

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

В обзоре рассмотрены наиболее важные экспериментальные данные об участии эндогенных олигопептидов в регуляции агрессивности животных и человека. С системных позиций анализируется роль пептидов в физиологическом контроле агрессивного поведения и возможные механизмы их действия. Изложены собственные и литературные данные о поиске специфических белковых индукторов и регуляторов агрессивного поведения. Подчеркивается перспективность исследования и использования пептидов с целью направленной регуляции агрессивности.

В настоящее время считается, что среди множества эндогенных физиологически активных соединений именно пептиды, особенно синтезирующиеся в нервной ткани, могут быть отнесены к числу наиболее избирательных регуляторов и индукторов определенных типов поведения [1—3]. Современные данные свидетельствуют, что исследование пептидных регуляторов является одним из самых перспективных направлений изучения нейрофизиологической и нейрохимической организации поведения, а также создания препаратов для прицельной коррекции психопатологических состояний человека [4, 5].

Физиологическая активность пептидов проявляется, в частности, в их влиянии на такую биологически важную форму зоосоциального поведения, как агрессия, которая у животных разных видов имеет, как правило, приспособительное значение и проявляется видоспецифическим набором поведенческих реакций [6]. В большинстве своем исследованные пептиды агрессивного поведения различаются по направленности, длительности и интенсивности влияния на проявления агрессии [7—10]. Имеющиеся экспериментальные факты создают реальные предпосылки для более углубленного анализа представлений о нейрохимической организации этого вида поведенческой активности, для разработки подходов к направленному воздействию пептидами на различные формы агрессивности животных и патологиче-

скую агрессивность человека, что имеет несомненное теоретическое и практическое значение.

Целью настоящего обзора является не только рассмотрение наиболее важных и интересных работ в указанной области, но и анализ перспектив развития исследований, а также дискуссионных вопросов о возможных механизмах действия нейропептидов как модуляторов и регуляторов агрессивного поведения.

Наиболее изученной на сегодняшний день в отношении агрессии является группа гипоталамо-гипофизарных пептидов. Согласно современным представлениям, именно в подбугорной области и близлежащих структурах мозга локализованы триггерные зоны важнейших биологических влечений [11]. О том, что в этой же области находятся и «агрессогенные» центры, свидетельствуют данные многочисленных экспериментов, показывающих, что электростимуляция гипоталамических ядер, их разрушение или локальное подведение к ним нейромодуляторов либо нейрогормонов оказывает выраженное влияние на разные типы агрессивного поведения [12—14]. Учитывая, что нейросекреторные клетки гипоталамических ядер выделяют ряд пептидов, участвующих в организации определенных форм поведения [15], логично предположить, что некоторые из этих соединений имеют отношение и к физиологической регуляции агрессивности.

Среди гипоталамо-гипофизарных пептидов наиболее исследованным в отношении агрессивного поведения является адренокортикотропный гормон (АКТГ). Его стимулирующее действие показано на моделях внутривидовой агрессии мышей и крыс, направленной на помещаемых в клетки интродуцеров [16, 17], а также при защитно-оборонительной и хищнической агрессии крыс [18, 19]. Уровень пептида (АКТГ<sub>1-24</sub>) в крови значительно повышается после схваток животных [20]. Наиболее выраженным агрессогенным действием обладают фрагменты АКТГ<sub>4-10</sub> и АКТГ<sub>1-24</sub>, тогда как другие фрагменты мало эффективны [21]. Однако имеются данные о том, что АКТГ и его фрагменты (4—10, 1—10) не оказывали существенного влияния на драки мышей-изолянтов [22]. Кроме того, на бульбэктомированных самцах монгольских песчанок с повышенным уровнем агрессивности было показано, что некоторые вещества, подавляющие естественную продукцию АКТГ и кортикостероидов, не изменяли агрессивности животных [23].

Несмотря на отмеченную противоречивость результатов, прослеживается определенная закономерность действия АКТГ на агрессивность, особенно наглядно проявляющаяся на модели межсамцовой агрессии мышей. Однократное острое введение изолированным мышам-резидентам пептидов в дозе 100—600 мкг/кг значительно учащало атаки на интродуцеров, а хроническое введение (4 дня по 25 мкг/кг) оказывало антиагрессивный эффект [24, 25].

$\alpha$ -Меланоцитстимулирующий гормон (меланотропин), являющийся фрагментом АКТГ, содержащим 13 аминокислот, помимо чисто «пиг-

ментарных» эффектов, проявляет и другие виды действия, в том числе на НС и поведение [26]. В частности, после его инъекции агрессивным изолированным мышам в дозе 25 мкг внутривбрюшинно наблюдается кратковременное снижение их агрессии по отношению к интродерам, а затем усиление ее [7]. Влияние  $\alpha$ -меланотропина на внутривидовую агрессивность мышей в значительной степени зависит от зоосоциального ранга животного: введение за 15 мин до тестирования субдоминанте (подчиненной мыши) повышало агрессивность доминанты, а инъектирование пептида доминанте снижало ее агрессивность [27, 28]. Интересно, что действие  $\alpha$ -меланотропина на агрессивность может быть обусловлено выделением специфических феромонов: химическая аносмия у доминанты устраняет повышение ее агрессивности по отношению к субдоминанте, которая получила инъекцию  $\alpha$ -меланотропина [29].

Меланоцитингибирующий фактор (меланостатин, концевой трипептид окситоцина) оказывает кратковременный (5 мин), но весьма выраженный агрессивный эффект на мышей-изолянтов (внутрибрюшинно, 25 мг/кг), а также повышает защитно-оборонительную агрессивность кошек и их атаки на мышей и их умерщвление в тесте хищнической агрессивности [30, 16].

Тиротропин-рилизинг-гормон—вырабатываемый гипоталамусом трипептид—при введении изолированным мышам в дозе 25 мг/кг внутривбрюшинно значительно усиливает их схватки с интродерами [16]. Сходное влияние оказывает рилизинг-фактор лютеинизирующего гормона (люлиберин), секретируемый преимущественно областями гипоталамуса, которые контролируют половое поведение и репродуктивные системы. Введение люлиберина в дозе 2,5 мг/кг внутривбрюшинно усиливает агрессивность мышей-изолянтов как непосредственно после инъекции, так и через сутки [16]. Эффект пептида не всегда является однонаправленным и в большой степени зависит от исходного уровня агрессивности: на фоне введения усиливающего агрессию апоморфина (0,5 мг/кг) проагрессивное действие пептида извращается [7].

Введение самцам мышей-резидентов другого гипоталамического пептида соматостатина (5 мг/кг внутривбрюшинно), ингибирующего вывобождение гипофизом гормона роста, снижало их агрессивность, уменьшая число атак на интродеров [16].

Большое влияние на агрессивное поведение оказывают опиоидные пептиды, среди которых исследовано действие на агрессивность как эндогенных веществ, так и их синтетических аналогов [7, 16, 31, 32]. Помимо этих препаратов, в некоторых исследованиях применялись антагонисты опиатных рецепторов налоксон и налорфин [33—35], а также экзогенные опиаты, в частности морфин [36]. Тестирование соединений, активных в отношении эндогенной опиатной системы, осуществлялось на всех важнейших моделях агрессивного поведения, имитирующих основные формы естественной агрессивности животных: схватки изолированных мышей и крыс с интродерами [31, 32];

защитно-оборонительная агрессия крыс, вызванная ударами электрического тока [33]; хищническая агрессия крыс [35]; материнская агрессия изолированных самок крыс, защищающих потомство от интродера [36, 37]; агрессивность, вызванная электростимуляцией гипоталамических центров [36, 38].

В указанных экспериментах выявлено 3 основных типа влияния опийных веществ на агрессивность животных: в малых дозах они, как правило, оказывают слабое агрессогенное действие, а при увеличении количества вводимого вещества начинает проявляться мощное антиагрессивное действие; при резкой отмене препаратов у животных с морфиновой зависимостью, вызванной длительным введением больших доз опийных, наблюдается отчетливое усиление агрессивности, напоминающее по проявлениям защитно-оборонительные реакции [36].

Данные об эффектах антагонистов опиатных рецепторов на агрессивное поведение противоречивы. Продемонстрировано, что налоксон в дозах 0,5—5 мг/кг внутрибрюшинно увеличивал драчливость мышей-изолянтов [39]. По другим данным, это вещество в дозе 0,1—1 мг/кг усиливало оборонительные и наступательные реакции у самок мышей, подвергнутых нападению лактирующих самок [37]. Однако имеются данные о том, что налоксон не эффективен в тех же дозах в отношении агрессии крыс интродеров и резидентов [40]. Антагонист опиатных рецепторов ICI 154, 129 в опытах на мышках-изолянтах в дозах 30 и 80 мг/кг увеличивал процент атакующих животных и латентный период атаки, а налоксон в эквивалентных дозах действовал противоположным образом [34].

Имеются сообщения о влиянии на агрессивность еще одного пептида обезболивающего и стресспротективного действия субстанции P [41, 42]. Введение мышам-изолянтам N-концевого гексапептида субстанции P (1—7) оказывало антиагрессивный эффект в дозе 1—10 мг/кг внутрибрюшинно. Иначе действовал C-концевой фрагмент (7—11), тогда как отрезок пептида 4—11 не оказывал существенного влияния. Налоксон устранял эффекты C-, но не N-концевого фрагмента вещества P.

Действие на агонистическое поведение некоторых олигопептидов, из тех, что были впервые обнаружены в желудочно-кишечном тракте, также зависит от того, какие из их фрагментов ингибировались животным. В частности, неодинаковое влияние на агрессивность оказывали три- и тетрапептиды гастрина [43], а также соединения другой родственной группы: эндогенный для мозга холецистокинин (ХЦК), включающий 8 аминокислот, его тетрапептид [44, 45] и перулетид—декапептидный аналог ХЦК мозга. Тетрапептид ХЦК (внутримышечно, 400 нг/кг) значительно усиливал электроболевую агрессивность крыс [44], а октапептид ХЦК, как показали наши исследования [45], не оказывал существенного влияния ни на один из показателей хищнической, болевой и межсамцовой агрессивности у крыс, ускоряя в то же время развитие пищевого насыщения у крыс-убийц, поедающих мышей.

Обнаружена модулирующая агрессивную активность и у многих других пептидов. В частности, внутрибрюшинное введение 10—500 мкг/кг крысам и мышам трипептида тафцина, фрагмента иммуноглобулинов типа G, значительно повышало в течение 3—35 мин агрессивность крыс, вызванную ударами электрического тока [46]. Нейротензин (внутри желудочков мозга, 50 мкг) ускорял у крыс вызванное ганглиотомией дорсальных корешков спинного мозга [47] развитие аутоагрессивных реакций, проявлявшихся кусанием собственных конечностей. Вазопрессин повышал агрессивность мышей-интродеров по отношению к изолированным резидентам [48]. Выявлено также более чем 300-кратное увеличение содержания ренина в плазме крови мышей-самцов после схваток с другими самцами [49, 50].

Результаты изучения агрессивного поведения животных и опыта фармакотерапии агрессивности душевнобольных позволяют предполагать принципиальное сходство нейрохимических механизмов агрессивного поведения млекопитающих, по крайней мере, на уровне его эмоционально-мотивационного компонента [51, 52]. Это явилось основанием для попыток купирования патологической агрессивности больных шизофренией и другими психическими заболеваниями с помощью эндогенного опиоидного пептида  $\gamma$ -эндорфина [8], а также церулетидом [9]. Хотя церулетид не исследовался непосредственно на моделях агрессивного поведения животных, было обнаружено его выраженное нейролентическое действие. Антиагрессивный эффект  $\gamma$ -эндорфина (внутримышечно, 5—10 мкг, обнаруживался с 4 по 9 день после инъекций, а церулетида (внутримышечно, 40 мкг)—с 9 по 23 день [8, 9]. Таким образом, имеются первые обнадеживающие попытки применения пептидов для купирования патологической агрессивности душевнобольных.

Изложенные данные свидетельствуют, что многие исследованные физиологически активные пептиды при разных способах введения вызывают изменения различных форм агрессивного поведения животных и, по единичным сообщениям, агрессивности душевнобольных. Обращают на себя внимание некоторые общие закономерности действия исследованных пептидов на агрессивные реакции: сравнительно высокие эффективные дозы и кратковременность действия; низкая избирательность, проявляющаяся влиянием на многие виды поведения; отсутствие способности индуцировать наиболее яркие проявления агрессии (схватки животных) и поэтому лишь модулирующие (усиливающие, ослабляющие) эффекты по отношению к агрессивности. Изложенное позволяет с уверенностью полагать, что среди изученных соединений пока не обнаружены достаточно избирательные регуляторы агрессивности или интегрирующий молекулярный фактор функциональной системы определенного вида агрессивного поведения, подобного гормону откладки яиц в репродуктивной активности моллюска аплизии [2] или ангиотензину-II в питьевом поведении млекопитающих [53].

Полифункциональность рассмотренных пептидов, действующих и на агрессивные реакции, может быть отчетливо охарактеризована исходя из системных представлений о целенаправленной поведенческой деятельности. В естественных условиях акт агрессии редко имеет для животных самостоятельное значение. Практически всегда агрессия выступает в качестве формы поведения, направленной на достижение этапного полезного приспособительного результата в поведенческом континууме при преодолении конкуренции в борьбе за пищу, полового партнера, при защите от боли и т. д.

Исходя из этих представлений можно предположить, что пептиды, участвующие в интеграции пищевого, полового поведения, болевых реакций и др., включены и в организацию нейрохимических механизмов агрессивности, тесно связанной с этими формами поведения. В частности, усиливающее действие АКТГ на агрессивность может быть обусловлено усилением и доминированием определенных биологических мотиваций, на основе которых формируется целенаправленное поведение: с селективным улучшением внимания, общеактивирующим влиянием на организм [54].

Угнетение агрессивности после длительного введения АКТГ связывают со снижением уровня тестостерона, одного из сильных эндогенных стимулирующих агрессию факторов. Усиление схваток изолированных самцов мышей под влиянием люлиберина, стимулирующего сперматогенез и повышающего уровень мужских половых гормонов, с рассматриваемых позиций можно объяснить участием этого пептида в организации нейрохимических механизмов агрессивности, связанной с половым поведением. В естественных условиях межсамцовая агрессивность, которая экспериментально моделируется, например, изоляцией животных, находится под контролем половых гормонов и часто реализуется в контексте брачного поведения.

Ослабление защитно-оборонительной, в частности электроболевой агрессивности, под влиянием эндогенных опиоидных пептидов может быть обусловлено их участием в нейрохимической организации антиноцицептивной системы мозга. Ослабление атак изолированных резидентов на интродуеров, возможно, связано с нормализацией пониженного у изолянтов «эндогенного эндорфинового тонуса», что вызвано длительным хроническим стрессом вследствие отсутствия социальных контактов [55]. Согласно другим предположениям, опиаты угнетают агрессивность, неспецифически снижая различные биологические побуждения [56].

Возрастание под влиянием вазопрессина числа атак мышей-интродуеров на резидентов связывают с нарушением консолидации процессов памяти животных, в частности информации об их поражениях в предыдущих схватках [48].

К настоящему времени наиболее изучены нейрохимические механизмы действия пептидов на агрессивное поведение посредством их регулирующего влияния на активность ряда нейромедиаторных си-

стем, связанных с контролем агрессивности. Согласно современным представлениям, повышение активности катехоламинергических систем мозга усиливает агрессивное поведение, а активация ГАМК- и серотонинергических центральных механизмов оказывает противоположное влияние. Соответственно угнетение катехоламинергических нейронов вызывает антиагрессивный эффект, а ослабление ГАМК- и серотонинергических систем — агрессогенный [57—60]. Экспериментально продемонстрировано, что пептиды реализуют свои угнетающие влияния на агонистические реакции через катехоламинергическую, ГАМК- и серотонинергические системы. В частности, через дофаминнегативные эффекты опосредуют антиагрессивное действие церулетид [9] и эндогенные опиаты [36]. Агрессогенный эффект АКТГ, меланостатина, люлиберина, тиротропина и тафцина объясняют катехоламинпозитивным, ГАМК-негативным действием [7, 25, 46].

Изложенные представления являются, однако, в значительной степени упрощенными и достаточно схематичными, поскольку каждый из пептидов оказывает действие на несколько медиаторных систем, подчас находящихся в реципрокных отношениях. При этом в тех или иных структурах мозга имеются четкие региональные особенности эффектов пептидов в отношении медиаторных процессов. Следует также учитывать, что физиологически активные пептиды оказывают влияние не только на процессы синтеза, выделения и инактивации, но и механизмы рецепции «классических» нейромедиаторов, выполняя роль модуляторов нейротрансмиссии [61—63].

В качестве вторичных «посредников» действия пептидов, участвующих в организации агрессивного поведения, выступают циклические нуклеотиды. Показано прямое действие пептидов как на аденилатциклазные ферменты, так и на эффекты нейромедиаторов, опосредованные циклазными системами [64]. Демонстрировано, что введение самих циклических нуклеотидов изменяет агрессивность животных: дибутрил сАМР (50—200 мкг внутрь желудочков) усиливал схватки крысы в ответ на удары электрического тока, агрессивность мышей-изолянтов и их хищнические реакции (тест убийства сверчков), тогда как сСМР не был эффективен [65]. Введение дибутрил-сСМР (250—2500 мкг) в течение длительного времени снижало агрессивные реакции у мышей-изолянтов [66].

Многие пептиды могут опосредовать агрессотропные эффекты через взаимодействие с другими нейропептидами. Например, антиагрессивное действие меланостатина объясняется торможением секреции под его влиянием АКТГ, тиротропина, люлиберина; меланостатин, возможно, обладает антиопиатным эффектом; вещество Р и нейротензин стимулируют высвобождение меланостатина, а люлиберин — гонадотропина [7, 16, 25].

Следует обратить внимание на тот факт, что широко используемое деление пептидов на агрессогенные и антиагрессивные достаточно условно. Ряд нейропептидов (меланостатин, АКТГ, вещество Р и

др.) оказывают фазное действие на агрессивность животных [7, 42, 67]. Для опиатов, гастрин, меланотропин и некоторых иных пептидов характерен сложный дозозависимый эффект [16, 68]. Обнаружены различные влияния пептидов на отдельные виды агрессивного поведения, а также зависимость их действия от фонового уровня агрессивности. Эти особенности действия пептидов могут быть связаны с их естественным процессингом в ткани мозга и последовательным высвобождением многочисленных физиологически активных фрагментов, оказывающих неодинаковые агессотропные эффекты. Так, целая молекула вещества Р значительно снижает уровень агрессивности мышей, вызванной длительной изоляцией. N-терминальный фрагмент вещества Р (1—7) также подавляет агрессию мышей, тогда как С-терминальный фрагмент (4—11) такого эффекта не вызывает, а более короткий отрезок пептида (7—11) увеличивает агрессивность [41, 42]. Среди многочисленных фрагментов, образующихся при протеолизе действующих на агрессию пептидов АКТГ, холецистокинина, вазопрессина и др., также найдены более короткие фрагменты, обладающие выраженным влиянием на поведение [69—72]. Эти физиологически активные фрагменты связываются со специфическими рецепторами, регионально распределенными в мозгу.

С другой стороны, различие влияний пептидов на агрессивность определяется, по-видимому, особенностями локализации синтеза, высвобождения и расщепления, а также распределением рецепторов к этим веществам и неодинаковой аффинностью к продуктам протеолиза.

В частности, антиагрессивное действие эндогенных пептидов с опиоидной активностью связывают с влиянием этих веществ на дельта-рецепторы [34]. Неоднозначное действие пептидов на агрессивное поведение может быть объяснено различиями в нейрофизиологической и нейрохимической организации отдельных форм агрессивности, причем даже внутри одной и той же формы, но у разных видов животных [7—9]. Все эти примеры отчетливо демонстрируют сложность экспериментального исследования и теоретического анализа участия нейропептидов в организации агрессивного поведения, а также многочисленные противоречия в трактовке полученных результатов.

Особый теоретический и практический интерес представляют, на наш взгляд, исследования, направленные на поиск и выделение эндогенных пептидных факторов, высококонцентрационно модулирующих или индуцирующих определенные формы агрессивного поведения. Некоторые исследователи пытались выделить такие регуляторные факторы из мозга специально подготовленных животных доноров, демонстрирующих агрессивные реакции. В частности, изучалась возможность переноса с экстрактами мозга крыс веществ, регулирующих их межвидовую агрессивность по тесту убийства мышей от высокоагрессивных к низкоагрессивным особям [73]. Показано, что агрессия мышей-самцов, которым субдурально вводили пептидные экстракты от высокоагрессивных сородичей, имевших опыт побед в драках, значи-

тельно возрастала [74]. Из мочи больных липодистрофией удалось выделить и установить первичную структуру трипептида (Pyrroglu-Asp-Glu-OH), повышающего и индуцирующего внутривидовую агрессивность мышей [75]. Однако данных о продолжении или подтверждении этих работ в литературе не имеется, что относится и к экспериментам, продемонстрировавшим присутствие в гипоталамусе монгольских песчанок фактора предположительно пептидной природы, ответственного за их внутривидовую агрессию [76].

В то же время, как свидетельствует опыт экспериментального изучения эндогенных пептидных регуляторов определенных форм поведения животных, эти вещества обнаруживаются не только во время осуществления соответствующей поведенческой деятельности, но и в интактном состоянии. Основываясь на этом, в нашей лаборатории в сотрудничестве с лабораторией биотехнологии Института биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР проводятся работы по выделению из мозга животных пептидных регуляторов агрессивного поведения.

Последовательным применением методов уксуснокислой экстракции, гель-фильтрации и ИОХ из мозга быков были выделены фракции с величиной  $M_r$  от 300 до 500 Д, повышающие в течение 14 суток после внутрижелудочкового введения агрессивность самцов беспородных белых крыс, вызванную ударами электрического тока, и индуцирующую через 24 ч после введения спонтанные схватки крыс, проявляемые реакциями, сходными с болевой агрессией. Агрессогенный эффект вызывался также внутрибрюшинным введением фракций. По показателю биуретовой пробы доза сухого вещества, вызывающая агрессогенный эффект, составляла около 300—400 мкг. Предварительные физико-химические исследования (амино-кислотный и N-концевой анализ) позволяют предполагать пептидную природу выделяемого нами агрессогенного фактора [77].

Перспективным аспектом рассматриваемых исследований представляются также работы, связанные с изучением мозгоспецифических белков (МСБ), соединений, уникальных для нервной ткани. Согласно современным представлениям, МСБ могут быть акцепторами или специфическими рецепторами для некоторых нейропептидов, а также являться молекулами-предшественниками физиологически активных пептидов мозга [78].

Как показали наши эксперименты, введение основной и минорной фракций МСБ S-100, а также антисыворотки к S-100 оказывало различные, отчетливо выраженные влияния на межсамцовую агрессивность мышей и крыс, электроболевою и хищническую агрессивность крыс [79]. В частности, внутрижелудочковые инъекции крысам основной фракции МСБ S-100 в дозе 60 мкг отчетливо стимулировало формирование у этих животных хищнической агрессивности под влиянием изоляции и голодания, а введение этого вещества в тех же дозах мышам-резидентам учащало их атаки на интродуцеров.

Обнаружены также изменения спектра кислых белков, в том числе МСБ S-100 некоторых структур мозга, при развитии агрессивного поведения [80]. Все эти результаты показывают, что поиск и изучение пептидов, действие которых в естественных условиях связано с МСБ, может быть перспективным направлением исследования нейрохимических механизмов агрессивного поведения и выявления новых пептидных факторов, участвующих в его регуляции.

Таким образом, изучение участия и роли пептидов и мозгоспецифических белков в организации агрессивного поведения не только обогащает наши знания о нейрохимических механизмах регуляции и формирования одного из важных видов поведенческой активности животных и человека, но и создает реальные предпосылки для направленного поиска эффективных средств управления этим поведением, которые могли бы найти применение как в клинике нервно-психических болезней, так и ряде областей народного хозяйства.

## PEPTIDES AND AGGRESSIVE BEHAVIOR

SHERSTNEV V. V., RYLOV A. L., GROMOV A. I.

Ф. К. Анохин Institute of Normal Physiology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

The most important experimental data about involvement of endogenous peptides in the regulation of the aggressive behaviour are covered in the present review. Using systematic approach the role of peptides in the physiological control of aggressive behaviour and the possible mechanisms of the neuropeptides' action are analyzed. Personal and literature data aimed to identify specific protein inductors and regulators of aggressiveness are summarized. The application of the peptides for the regulation of aggressive behaviour is emphasized as a main trend of this study.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Kastin A. J., Olson R. D., Schally A. V., Coy D. H. *Life Sci.*, v. 25, p. 401—414, 1979.
2. Strumwasser F. *Federat. Proc.*, v. 41, p. 2919—2922, 1982.
3. Guillemín R. *Perspectives in biol. and med.*, v. 22, p. 74—80, 1979.
4. Бахарев В. Д., Тихомиров С. М. *Сов. медицина*, т. 6, с. 50—53, 1984.
5. Клуша В. Е. Пептиды—регуляторы функций мозга, Рига, Зинатне, 1985.
6. Valzelli L. *Psychobiology of aggression and violence*, Raven Press, N. Y., 1981.
7. Вальдман А. В., Пошивалов В. П. *Фармакологическая регуляция агрессивного поведения*, М., Медицина, 1984.
8. Van Ree J., De Wied D., Verhoveen W. M., Van Prag H. M. *Lancet*, v. 269, p. 1363—1365, 1980.
9. Van Ree J., Verhoveen W. M., Brouwer G. J., De Wied D. *Neuropsychobiology*, v. 12, p. 4—8, 1984.
10. Mendelson J. M., Dietz P. E. *Pharm., Biochem. and Behav.*, v. 17, p. 171—173, 1983.

11. Судяков К. В. Биологические мотивации, М., Медицина, 1971.
12. Eichelman B. S., Elliot G. R., Barchas J. D. Biobehavioral aspects of aggression, p. 51—84, N. Y., Alan R. Liss, 1981.
13. Bandler R., Fatouris D. Brain Res., v. 153, p. 427—433, 1978.
14. Siegel A., Edinger H. M. Neurosci. Biobehav. Rev., v. 7, p. 395—407, 1983.
15. Ашмарин Н. П. Журн. эволюц. биохимии и физиологии, т. 5, с. 576—578, 1977.
16. Poshivalov B. P. Aggressive behav., v. 4, p. 355—370, 1982.
17. File S., Clarke A. Pharm., Biochem. and Behav., v. 12, p. 711—715, 1980.
18. Северьянов Л. А., Журн. высш. нерв. деят-сти, т. 31, с. 1230—1237, 1981.
19. Conner R. L. Physiol. and Behav., v. 22, p. 417—420, 1979.
20. Leshner A. I., Walker W. A., Johnson A. E. Physiol. and Behav., v. 11, p. 705—711, 1973.
21. Pool A. E., Brain P. F. J. Endocrinol., v. 64, p. 32—33, 1975.
22. Hull E. M., Hommedieu G., Vastanotis C. Physiol. and Behav., v. 22, p. 417—421, 1979.
23. Brain P., Evance A. Pharm., Biochem. and Behav., v. 7, p. 425—433, 1977.
24. Kostowski W., Rewerski W., Piechcki T. Neuroendocrinology, v. 6, p. 311—318, 1970.
25. Пошвалов В. П.—В сб.: Фармакология нейропептидов, с. 46—52, М., Медицина, 1982.
26. De Wied D.—In: Memory and information, p. 375—378, N. Y., Academic Press, 1973.
27. Fatterson A. T., Rickerby J., Simpson J., Vickers C. Physiol. and Behav., v. 24, p. 843—848, 1980.
28. Nowell N. W., Thody A. J., Woodly R. Physiol. and Behav., v. 24, p. 5—9, 1980.
29. Nowell N. W., Thody A. J., Woodly R. Peptides, v. 1, p. 69—72, 1980.
30. Вальдман А. В., Пошвалов В. П.—В кн.: Некоторые аспекты моделирования патологии поведения животных, с. 3—18, М., Медицина, 1980.
31. Poshivalov V. P. Pharm., Biochem. and Behav., v. 14, p. 53—59, 1981.
32. Meyerson B., Berg M. Acta pharmacol. et toxicol., v. 41, p. 64, 1977.
33. McGivern R., Lobangh N. J., Collier A. C. Physiol. Psychology, v. 9, p. 251—256, 1981.
34. Behton D., Brain S., Brain P. F. Neuropharmacology, v. 23, p. 13—17, 1984.
35. Walsh H. Pharm., Biochem. and Behav., v. 21, p. 5—7, 1984.
36. Giannitsos G., Lal H.—In: Med. Probl. Pharmacopsych. (ed. L. Valzelli), p. 82—102, Raven Press, 1978.
37. Rodgers R. J., Hendrie C. A., Waters A. J. Physiol. and Behav., v. 30, p. 781—786, 1983.
38. Panksepp J., Herman B. H., Vilberg T., Bishop P. Neurosci. and Biobehav. Rev., v. 4, p. 473—487, 1981.
39. Krsiak M., Tomaskova Z. Aggressive behav., v. 10, p. 160, 1984.
40. Rodgers R. J. Brit. J. Pharmacol., Suppl. 77, p. 460, 1982.
41. Stewart J. M., Hall M. E. Peptides, v. 3, p. 511—516, 1982.
42. Hall M. E., Stewart J. M. Peptides, v. 5, p. 85—89, 1984.
43. Козловская М. М., Клиша В. Е., Бондаренко Н. А.—В кн.: Нейрохимические основы психотропного эффекта, с. 95—106, М., Медицина, 1982.
44. Вассар Э. Э., Аликметс Л. Х., Майметс М. О. Журн. высш. нерв. деят-сти, т. 34, с. 283—289, 1984.
45. Рылов А. Л., Анохин К. В. Бюл. эксперим. биол. и мед., в печати, 1986.
46. Андреев С. М., Анохин К. В., Антонова Л. В. Докл. АН СССР, т. 253, с. 498—500, 1980.
47. Rossitch E., Ovelmen-Levitt J., Nashold B. S. Pain, suppl. 19, № 2, p. 445, 1984.
48. Siegfried B., Frischknecht H. R., Waser P. G. Aggressive Behav., v. 10, p. 84, 1984.

49. Bing J., Poulsen K. Acta physiol. scand., v. 105, p. 61—72, 1979.
50. Poulsen K. Clin. Exp. Hypertens., v. 5, p. 969—973, 1983.
51. Eichelman B. Progr. Neuro-psychopharmacol., v. 2, p. 633—643, 1978.
52. Valzelli L. Progr. Neuro-psychopharmacol., v. 2, p. 591—610, 1978.
53. Ролс Б. Дж., Ролс Э. Т.—Жажда, М., Медицина, 1984.
54. Sandman C. A., Kastin A. J.—In: Neurobiology of sleep and memory, p. 347—359, N. Y.: Academic Press., 1977.
55. Bonnet K. A., Miller J., Simon E. S.—In: Opiates and endogenous opioid peptides, Amsterdam, North-Holl. Press, p. 335—343, 1976.
56. Stein L., Belluzzi J. Federat. Proc., v. 38, p. 2468—2472, 1979.
57. Pucilowski O., Kostowski W. Behav. Brain Res., v. 6, p. 33—48, 1983.
58. Darana J. H. Neurosci. and Behav. Rev., v. 2, p. 101—113, 1978.
59. Eichelma N. B., Thoa N. G. Biol. Psychiatry, v. 6, p. 143—164, 1973.
60. Stil T. M., Seaman P. Progr. Neuro-psychopharmacol., v. 2, p. 659—669, 1978.
61. Ценер Г.—В кн.: Эндорфины, с. 15—34, М., Мир, 1981.
62. Чиченков О. Н. Фармакология и токсикология, т. 41, с. 245—256, 1978.
63. Будиев В. М.—В сб.: Опиоидные пептиды и их рецепторы. ВНИИТИ, Итоги науки и техники. Серия: фармакология, химиотерапевтические средства, т. 13, с. 101—181, М., 1982.
64. Туракулов Я. X. Циклические нуклеотиды и регуляция клеточного метаболизма, Изд-во Фан, Ташкент, 1983.
65. Kantak K., Hegstrand L. Neuropharmacology, v. 20, p. 79—83, 1981.
66. Benton D. Aggressiv. Behav., v. 10, p. 79—89, 1984.
67. Brain P. F., Brain S., Benton D. Aggressiv. Behav., v. 10, p. 147, 1984.
68. Покишилов В. П., Исмаилов Ю. Д., Титов М. И. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 93, с. 40—42, 1982.
69. Griffiths E., McDermott J. R. Neuroendocrinology, v. 39, p. 573—581, 1984.
70. Burbach J. P. H. J. Endocrinol., v. 102, suppl., p. 74, 1984.
71. Steardo L., Knight M., Taminga C., Chase T. N. Neurosci. Lett., v. 54, p. 319—325, 1985.
72. Rehfeld J. F. J. Neurochem., v. 44, p. 1—10, 1985.
73. Reinis S., Mobbs D.—In: Molecular approaches to learning and memory., p. 189—193, N. Y., Academic Press, 1970.
74. Welster J., Fox K. A. Behav. Biol., v. 12, p. 567—571, 1974.
75. Reichelt K. L., Trygstad O. E., Johansen J. H. Psychopharmacol. of aggression, p. 98—108, N. Y., Raven Press, 1979.
76. Thiessen D. D. Amer. Science, v. 61, p. 346, 1973.
77. Шерстнев В. В., Беляев С. В., Долгов О. Н., Лысов Н. П., Рылов А. Л. IX Всесоюз. конф. по биохимии нервной системы, Ереван, 1983, Тезисы докл.
78. Шерстнев В. В. Белки и пептиды в механизмах интегративной деятельности мозга. Дис. на соиск. учен. степени докт. мед. наук, М., 1985.
79. Рылов А. Л., Шерстнев В. В. Журн. высш. нервн. деят-сти, т. 34, с. 904—911, 1984.
80. Каркищенко Н. Н., Куликова А. Л., Страдомский Б. В. Нейрохимия, т. 4, с. 35—42, 1985.

Поступила 14. II 1986



## ХРОНИКА

## О ЗАСЕДАНИИ СЕКЦИИ НЕЙРОХИМИИ

(2—3 июня 1986 г., Москва)

2—3 июня 1986 г. в Москве состоялось очередное заседание Секции нейрохимии Научного совета АН СССР по проблемам биохимии животных и человека.

Члены секции минутой молчания почтили память академика *Е. М. Кренса*, в лице которого советская и мировая наука понесла тяжелую утрату.

Председатель секции, член-корр. АН АрмССР, проф. *А. А. Галоян* поздравил от имени членов секции проф. *Н. Н. Демия* с его 75-летием и пожелал ему дальнейших творческих успехов, а также академика АН УССР *В. К. Липко* и докт. биол. наук *Н. Ф. Ааврову* с присуждением им государственных премий в области науки и проф. *Е. М. Хватову* с присвоением ей звания «Заслуженный деятель науки РСФСР».

Академик *С. Е. Северин* выступил с сообщением о формировании Советской делегации для участия в VI общем собрании Европейского общества нейрохимиков в Праге в сентябре 1986 г. Он заявил, что год назад был учрежден Национальный комитет биохимиков, который занимается осуществлением связи биохимической общности СССР с зарубежными странами (вступление в различные зарубежные научные общества, сотрудничество в научных журналах, приглашение на конференции со стороны оргкомитетов и т. д.). Председателем Национального комитета биохимиков назначен академик *С. Е. Северин*, ученым секретарем—канд. хим. наук *М. Б. Агаларова*.

Проф. *А. А. Галоян* отметил, что в число мероприятий, намеченных Секцией нейрохимии на XII пятилетку, входит проведение на базе Института биохимии АН АрмССР конференции «Функциональная нейрохимия белков, пептидов, транзиттеров» с участием видных советских и зарубежных нейрохимиков. На конференции будут рассмотрены актуальные проблемы современной нейрохимии.

С сообщением о ходе проведения организационных мероприятий по подготовке к X Всесоюзной конференции по нейрохимии (г. Горький, сентябрь, 1987 г.) выступила проф. *Е. М. Хватова*. В программу конференции, кроме традиционных фундаментальных нейрохимических исследований, рекомендовано включить вопросы по биотехнологии, касающиеся получения биологически активных соединений и медицинские проблемы биохимии мозга.

На заседании секции обсуждались вопросы, связанные с развитием исследований по нейрохимии экстремальных состояний. Проф. *Н. Н. Демия* указал, что необходимо уделить большое внимание молекулярным аспектам стрессорных состояний (включая последствия радиационных поражений), а также вопросам по пересадке нервной ткани и нейрохимическим аспектам бессонницы. Проф. *А. А. Кричевская* привела новые данные по использованию пептида  $\delta$ -сна как антистрессорного фактора. *Д. Г. Микеладзе* сообщил о дальнейшем развитии проводимых в Институте физиологии им. Н. С. Бериташвили АН ГССР исследований по изучению изменений метаболизма нейронов при стрессовых и невротических состояниях ЦНС.

Было принято решение поручить *С. Х. Хайдарлиу* на одном из последующих заседаний секции доложить о перспективах развития исследований по нейрохимии экстремальных состояний.

Были рассмотрены вопросы, относящиеся к патологической нейрохимии. Проф. *Н. К. Попова* информировала членов секции о том, что в Институте цитологии и генетики СО АН СССР селекционирована линия крыс, генетически предрасположенных к каталепсии. В мозгу у этих животных выявлены изменения в активности триптофангидроксилазы и в метаболизме дофамина. Исследования проводили с целью выявления роли таких медиаторов, как дофамин и серотонин, в возникновении каталепсии. Проф. *Л. Я. Тяхевлад* привел данные об изменениях процессов перекисного окисления при экспериментальных новообразованиях. Проф. *М. Ш. Промыслову* и проф. *В. Н. Розенгауру* было поручено к следующему заседанию секции подготовить перспективный план развития исследований в области патологии нервной системы. Проф. *Р. Н. Этингоф* и проф. *Р. И. Кругликов* высказали мнение о необходимости координации нейрохимических исследований между АН СССР и АМН и МЗ СССР.

Проф. *Р. Н. Этингоф* предложила наметить на ближайшие годы развитие исследований по изучению молекулярных основ полового поведения животных. Эти исследования, отметила она, имеют большое значение для продуктивности сельскохозяйственных животных.

Были рассмотрены вопросы, касающиеся развития исследований по радиационной нейрохимии. Проф. *А. А. Галоян* указал на важность и актуальность этих исследований. Он отметил, что в Институте биохимии АН АрмССР изучается защитная роль супероксиддисмутазы при радиационном поражении. По этому вопросу выступили также проф. *А. Т. Пикунев*, проф. *А. Д. Рева*, проф. *Р. И. Кругликов*.

Следующее заседание Секции нейрохимии было решено провести 13—14 сентября 1986 г. в Ереване.

БАРХУДАРЯН Н. А.

## НАУЧНАЯ СЕССИЯ ОТДЕЛЕНИЯ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК АМН СССР И ОТДЕЛЕНИЯ ФИЗИОЛОГИИ АН СССР

27—30 мая 1986 г. в Ленинграде состоялась объединенная научная сессия Отделения медико-биологических наук АМН СССР и Отделения физиологии АН СССР, посвященная современному состоянию и перспективам развития исследований высшей нервной деятельности. В работе сессии приняли участие ведущие ученые страны, исследования которых посвящены различным аспектам высшей нервной деятельности. Главная задача сессии состояла в том, чтобы на основе современных достижений этой области нейробиологии наметить наиболее перспективные направления дальнейших исследований. Заслушанные доклады носили обобщающий характер и представляли собой характеристику основных современных направлений изучения высшей нервной деятельности. Большое место в работе сессии заняли вопросы изучения высшей нервной деятельности человека, рассмотренные в докладах *Н. П. Бехтеревой*, *В. С. Русинова* и *О. М. Гриндель*, *А. М. Иванецкого*, *Э. А. Костандова*, *Н. А. Василевского*. Материалы этих докладов явились свидетельством существенных достижений в изучении нейрофизиологических основ высшей нервной деятельности человека и перспективности дальнейших исследований в этом направлении. Много интересных материалов было представлено в докладах, посвященных общим закономерностям и механизмам высшей нервной деятельности в норме (*М. Н. Ливанов*, *П. В. Симонов*, *О. С. Адрианов*, *К. В. Судаков*, *А. С. Батцев*, *У. Г. Гасанов*, *Н. Ф. Суворов*, *В. М. Сторожук*) и патологии (*Г. Н. Крыжановский*, *М. М. Хананашвили*, *А. В. Вальдман*, *В. А. Пеговский*).

Собственно нейрохимическим механизмам высшей нервной деятельности были посвящены доклады чл.-кор. АМН СССР М. Е. Варганяна, Г. А. Варганяна и Р. И. Кругликова. В докладе М. Е. Варганяна представлены материалы о новом эндогенном лиганде бензодиазепиновых рецепторов. Используя широкий набор современных физико-химических методик и приемов геной инженерии, автор и его сотрудники смогли получить некоторые важные характеристики этого лиганда.

Доклад Г. А. Варганяна «Проблемы нейрохимического уровня организации высшей нервной деятельности» был посвящен анализу современного состояния вопроса о роли эндогенных биохимических факторов пептидной природы в процессах обучения и памяти. На основе анализа фактических данных, в том числе полученных в последние годы в физиологическом отделе Института экспериментальной медицины АМН СССР, докладчик обосновал представление о том, что факторы «переноса памяти» следует рассматривать как «включатели», «актуализаторы» предсуществующих связей, а не как «молекулы памяти». В докладе особо подчеркивалась необходимость целенаправленного изучения биохимических механизмов подкрепления, делающих эффективным условнорефлекторный вход. Автором выдвинута оригинальная гипотеза, основанная на свойстве интервало-селективного взаимодействия между нейронами мозга. Согласно этой гипотезе, «замыкание» условнорефлекторной связи может осуществляться не за счет модификации, а в результате изменения чувствительности нейрона к различным интервалам поступающей к нему импульсации и изменения структуры межимпульсных интервалов импульсных потоков. При наличии свойства интервальной селективности нейрона адрес импульсного потока может меняться. Иными словами, активность с любого входа ЦНС может быть выведена на любые командные эффекторные системы нейронов, что эквивалентно формированию новой связи или «замыканию». Реальным биохимическим уровнем регуляции этого процесса является регуляция интервало-селективной чувствительности нейрона факторами пептидной природы.

В более общей форме решение проблемы докладчик связывает с раскрытием химического механизма воздействия подкрепляющих систем мозга на генетический аппарат нейронов.

Р. И. Кругликов в своем докладе рассмотрел общие принципы изучения молекулярных основ обучения и памяти. Главное направление исследований в этой области нейробиологии вытекает из особенностей детерминации интегративной деятельности мозга, имеющей системный характер: ни один фактор сам по себе не обладает детерминирующей силой—он приобретает ее лишь во взаимодействии с другими факторами. Это относится и к нейрохимическим субстратам обучения и памяти. Поэтому исследование нейрохимических основ обучения и памяти—это изучение взаимодействия различных нейрохимических субстратов—«классических» нейромедиаторов, информационных макромолекул и неuropeптидов в реализации интегративных процессов. Однако не все направления такого взаимодействия равноценны. Учитывая, что в основе любых пластических перестроек, в том числе перестроек межнейронных связей, лежат изменения метаболизма информационных макромолекул, необходимо исследовать влияния, оказываемые на метаболизм макромолекул представителями других классов нейрохимических субстратов. Докладчик далее обратил внимание на то, что при исследовании нейрохимических основ обучения и памяти надо, наряду с детальным исследованием метаболизма мозга, учитывать и состояние «периферии», так как, по современным данным, состояние центральных процессов, в частности процесса консолидации, может модулироваться событиями «на периферии»: изменением содержания в крови некоторых гормонов, глюкозы и т. д. Проблема соотношений «центра» и «периферии» приобрела исключительную остроту применительно к проблеме неuropeптидов, плохо проникающих через ГЭБ. Многие центральные эффекты неuropeптидов, по-видимому, опосредованы периферическими механизмами, заслуживающими в связи с этим самого тщательного изучения. Р. И. Кругликов подчеркнул необходимость исследования метаболических эффектов различных нейрохимических субстратов как в состоянии покоя,

так и в условиях адекватной функциональной нагрузки, так как именно в этих условиях раскрывается функциональная роль исследуемого субстрата. Хотя в заслушанных докладах были представлены далеко не все направления исследований нейрохимических основ обучения и памяти, они явились свидетельством большого интереса к этой важнейшей проблеме и ее ведущей роли во всем комплексе нейронаук.

КРУГЛИКОВ Р. И.

## ВСЕСОЮЗНЫЙ СИМПОЗИУМ «ОБМЕН ВЕЩЕСТВ ПРИ ЗИМНЕЙ СПЯЧКЕ И ЕСТЕСТВЕННОМ СНЕ»

С 19 по 20 сентября 1985 г. в Махачкале на базе проблемной научно-исследовательской лаборатории нейрохимии Дагестанского ордена Дружбы народов государственного университета им. В. И. Ленина был проведен Всесоюзный симпозиум «Обмен веществ при зимней спячке и естественном сне», организованный Отделением биохимии, биофизики и физиологически активных соединений АН СССР, Дагестанским государственным университетом и Институтом биофизики АН СССР.

В работе симпозиума приняло участие около 60 ученых из Москвы, Ленинграда, Пушкино, Новосибирска, Ростова-на-Дону, Еревана, Фрунзе, Харькова, Владивостока, Петропавловска, Горького, Баку, Каунаса, Нальчика, Семипалатинска и других городов.

К открытию симпозиума был издан сборник материалов симпозиума «Биохимические механизмы зимней спячки и естественного сна» под редакцией чл.-кор. АН СССР Г. Р. Нваницкой и проф. Э. З. Эмирбекова.

Среди обсуждаемых проблем центральное место занимали вопросы метаболизма мозга при зимней спячке, гипотермии и естественном сне. Обсуждались различные стороны биохимических изменений как в структурах мозга, так и на субклеточном уровне. Рассматриваемые нейрохимические показатели (белки, нуклеиновые кислоты, азотистые, энергетические и липидные компоненты, медиаторы, нейротенгиды) были представлены в аспекте раскрытия единства происхождения, сходства динамики естественного сна, гипобноза пойкилотермных животных, зимней спячке, адаптированных механизмов мозга при гипотермии.

С пленарным докладом «Новые данные о метаболизме нейромедиаторных аминокислот при зимней спячке» выступил Э. З. Эмирбеков (Махачкала), который проанализировал современные данные литературы по обсуждаемой проблеме, изложил новые экспериментальные подходы раскрытия нейрохимических механизмов, лежащих в основе регуляции зимней спячки. Дальнейшее развитие в докладе получила существующая нейрохимическая теория зимней спячки, в которой значительное место занимает, по мнению автора, соотношение количества нейромедиаторов с одной стороны, соотношение метаболического, синаптического и модуляторного циклов нейромедиаторных аминокислот — с другой. Зимняя спячка характеризуется особой температурной регуляцией активности ферментов метаболизма нейромедиаторов и нейромедиаторных аминокислот.

В докладе И. Г. Кармановой (Ленинград) были приведены данные, подтверждающие функциональную гомологию гипобноза и зимней спячки у пойкилотермных и гетеротермных животных. На примере определения содержания белка и РНК в митохондриях нейронов и в глиоцитах докладчица обратила внимание на сохранение у гетеротермных млекопитающих механизмов регуляции метаболизма, характерных

для пойкилотермии, что обеспечивает их жизнедеятельность при температуре окружающей среды 4—6°.

Интересный фактический материал продемонстрировали сотрудники, работающие под руководством проф. *Н. К. Поповой* (Новосибирск). В частности, *А. В. Куликов* и *И. И. Войтенко* в своих докладах выдвинули предположение, что противоположная направленность изменений в активности основных ферментов синтеза и катаболизма серотонина и других биоаминов регулируют их уровень при впадении в спячку и пробуждении. Активность этих ферментов, по-видимому, является существенным фактором, влияющим на холодовую реакцию и у зимоспящих животных.

Убедительные данные, подтверждающие резистентность клеток мозга зимоспящих животных к низкой температуре тела, приводились в докладе *В. С. Шугаев* (Ростов-на-Дону) «Перекишенное окисление в тканях зимоспящих сусликов и крыс, адаптированных к холоду». Автор предполагает, что в тканях мозга зимоспящих животных имеются мощные системы, препятствующие образованию перекисей.

В докладе *С. П. Львовой* (Махачкала) «Утилизация гликогена в тканях эндо- и эктотермного организма при зимней спячке» были представлены данные по сравнительному исследованию содержания гликогена, фосфорилазной и глюкоз-6-фосфатазной активности в тканях (в том числе и в мозгу) эндо- (суслики малые) и эктотермных (лягушки озерные, ящурки разноцветные) животных при подготовке к зимней спячке, в ее динамике и при пробуждении. Результаты экспериментов позволяют заключить о значительном сродстве в динамике гликогена и ферментов его утилизации в тканях млекопитающих и пойкилотермных животных на разных этапах зимней спячки и подготовки к ней.

Большой интерес вызвали сообщения *Г. Л. Фельдмана* и *В. Н. Гусатинского* (Ростов-на-Дону), касающиеся изучения реакций мозга в цикле бодрствования—сон. Результаты проведенной работы позволили авторам заключить, что изменения АТФазной активности и динамические изменения температуры тела обеспечивают во время сна, особенно в его медленноволновой фазе значительное уменьшение энерготрат докусов, теменной коры, что указывает на роль сна в восстановлении функциональной активности головного мозга.

В докладе *Н. К. Поповой* (Новосибирск) и *Е. Л. Доведовой* (Москва) «К механизмам антиверотического действия пептида дельта-сна» приведены интересные данные по биохимическому изучению структур мозга (зрительные, слуховые и моторные поля больших полушарий, хвостатое ядро и вентролатеральные ядра таламуса) на субклеточном уровне при действии исследуемого пептида. Установлено, что пептид дельта-сна оказывает влияние на функциональное состояние сенсорных систем—слуховой и зрительный анализатор, не меняя кинестетическую чувствительность.

Ряд докладов был посвящен биохимическому изучению искусственной гипотермии. Участники симпозиума отметили важность проведения исследований нейрохимических основ зимней спячки как модели для раскрытия механизмов гипотермии, которая широко используется в сельскохозяйственной и медицинской практике. Среди этих сообщений большой интерес вызвал доклад *А. А. Симоняна* (Ереван) «Влияние гипотермии на некоторые стороны энергетического обмена мозга кур в онтогенезе». Были представлены данные, имеющие не только теоретическое, но и практическое значение. Автор показал, что кратковременное охлаждение яиц при инкубации ведет к стимулированию дыхания, то есть к увеличению теплопродукции, что является компенсаторной реакцией, обеспечивающей последующий выход птенца из состояния гипотермии.

Симпозиум продемонстрировал определенные достижения в анализе одной из ключевых проблем современной биологии и медицины—соотношения между обменными процессами и зимней спячкой, обменными процессами и естественным сном. Участники симпозиума отметили, что существенные данные по проблеме получены в работах нейрофизиологов, нейроморфологов и нейрохимиков и в области эволюционной физиологии. Была отмечена целесообразность дальнейшего развития комплексных исследований по проблеме естественного сна и зимней спячки.

Участники симпозиума выделили ряд проблем, решение которых будет способствовать выяснению механизмов устойчивости и сохранения высокой функциональной активности нейронов при зимней спячке и естественном сне, в том числе исследование аденилатциклазной системы, изоферментного состава мембранных белков, роли липидов и жирных кислот в регуляции работы ионных каналов и транспортных АТФаз, синаптической передачи, особенностей фосфорилирования и дефосфорилирования ферментов и др. Была подчеркнута важность прикладного значения теоретической и экспериментальной нейрохимии, в частности использования нейропептидов—триггеров зимней спячки в качестве протекторных веществ при создании искусственного состояния гипобноза.

В заключение участники симпозиума выразили благодарность Дагестанскому государственному университету и оргкомитету за хорошую организацию данного симпозиума. Принято решение следующий симпозиум провести в 1988 г. на базе Сибирского отделения АН СССР в Новосибирске.

ЭМИРБЕКОВ Э. З.

## ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

1. В журнале публикуются статьи, содержащие ранее не опубликованные результаты экспериментальных исследований по биохимии нервной системы, обзоры по важнейшим вопросам современной нейробиологии, рецензии на новые издания и актуальная научная хроника. Объем рукописей (включая резюме, список литературы и иллюстрации) не должен превышать 15 с., напечатанных на машинке через 2 интервала. Объем обзоров не более 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. Перед каждой статьей, кроме кратких сообщений, должно быть напечатано краткое резюме (через 1,5 интервала) объемом не более 0,5 с., которое должно отражать цель и основные результаты работы. Ко всем статьям без исключения на отдельном листе прилагается тот же текст на английском языке.

Экспериментальные статьи должны быть разбиты на разделы: материалы и методы, результаты и обсуждение, литература. Иногда более целесообразным являются разделы—результаты исследований и обсуждение результатов. В кратких сообщениях выделять указанные разделы не следует. Заглавие статьи должно быть ясным, кратким и информативным. Под заглавием следует указать фамилии и инициалы авторов, а в правом верхнем углу над ним индекс универсальной десятичной классификации (УДК).

3. Список литературы составляется в порядке цитирования. Все ссылки печатаются на машинке на языке оригинала через 1,5 интервала. 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.

Под списком литературы слева указывается полное название учреждения, в котором выполнена работа, а справа—дата ее поступления в редакцию.

4. 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 указывать достоверность данных.

Рисунки, отчетливо выполненные тушью на плотной белой бумаге или кальке, представляются в конверте в двух экземплярах. На обороте каждого рисунка карандашом следует указать фамилии авторов, сокращенное название статьи и порядковый номер, для фотографий (на глянцевой бумаге) обозначить ее верх и низ. Подписи к рисункам и фотографиям представляются на отдельном листе.

5. В приложении к правилам для авторов, которое публикуется в каждом первом номере нашего журнала, приводится список наиболее часто употребляемых сокращенных обозначений, разрешаемых применять без специальной расшифровки. Используемые авторами другие сокращенные слова при первом упоминании даются полностью и в скобках в сокращенном виде. Фамилии иностранных авторов даются на языке оригинала.

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

7. Редакция высылает автору второй экземпляр отредактированной рукописи для ознакомления и доработки. В случае познрага статьи для исправления датой поступления ее в редакцию считается день поступления исправленного текста.

8. Корректуру авторам редакция не высылает.

## СО Д Е Р Ж А Н И Е

<i>Грихожан А. В., Ковалев Г. И., Раевский К. С.</i> Ауто- и гетерорецепторная регуляция высвобождения нейротрансмиттера из глутамат/аспартатергических нейронов коры мозга крыс	341
<i>Годухин О. В., Буданцев А. Ю.</i> Пресинаптическая ауторегуляция высвобождения глутамата в стрiatуме крыс	348
<i>Галоян А. А., Срашоян Р. М., Карипетян Р. О., Абелян Ж. Г., Саакян Ф. М., Саакян С. А., Абрамян С. С., Григорян Л. А., Одабашян А. Б., Бочко Н. Ф.</i> Множественные формы кардиоактивных нейрогормонов гипоталамуса	354
<i>Карпалов А. А., Тюленев В. И., Белик Я. В.</i> О наличии нейроспецифического белка S-100 в ламинно-поровом комплексе ядер клеток мозга и его влиянии на фосфорилирование белков ядерной мембраны	365
<i>Канунникова Н. П.</i> Влияние этанола на восстановление янтарного полуальдегида в некоторых структурах мозга крыс	370
<i>Розанов В. А., Безамуга С.</i> Интенсивность процесса утилизации $\alpha$ -кетоглутарата и содержание некоторых связанных с ним субстратов в различных отделах головного мозга крыс	377
<i>Бадалян Н. А., Дагян М. А.</i> Амидные группы белков и аммиакообразование в головном мозгу крыс	381
<i>Остапенко И. А., Шабанова М. Е., Тюрин В. А., Борин М. Л., Горбунов Н. В., Этингер Р. И.</i> Об изменениях липидов мембран сетчатки при развитии наследственной дистрофии у крыс	391
<i>Зибелсинский С. А., Денисова Н. А.</i> Протеолипидный белок и липиды целого мозга и субклеточных фракций в ряду позвоночных	397

### Краткие сообщения

<i>Григорьев Н. П., Неоксарицкий А. А.</i> Na <sup>+</sup> -зависимое связывание 3H-ГАМК синапсомы коры больших полушарий головного мозга крыс после внутрижелудочкового введения 6-оксидофамина и аскорбиновой кислоты	404
<i>Кричевская А. А., Бондаренко Т. И., Горошинская Н. А., Ходакова А. А., Михалева И. И., Крупенинкова Е. Ю.</i> Влияние пептида дельта-сна на активность моноаминоксидазы и содержание гистамина в мозгу и крови крыс при действии холодового стресса	408
<i>Галстян Г. Г., Захарян Р. А., Хачатрян Г. С.</i> Влияние пуриновых и пиримидиновых циклических нуклеотидов на РНК-полимеразную активность ядер клеток головного мозга	413
<i>Загоскин П. П., Самарцев В. И.</i> Регуляция малатом скорости окислительного фосфорилирования в митохондриях головного мозга при использовании различных субстратов дыхания	416

### Письма в редакцию

<i>Галоян А. А., Гурвиц Б. Я.</i> Кальцийнезависимый пептидный активатор фосфолипазы циклических нуклеотидов мозга	420
--	-----

### Обзоры

<i>Шерстнев В. В., Рылов А. Л., Громов А. И.</i> Пептиды, мозгоспецифические белки и агрессивное поведение	423
--	-----

### Хроника

<i>Бархударян И. А.</i> О заседании Секции нейрохимии (2—3 июня 1986 г., Москва)	435
<i>Кругликов Р. И.</i> Научная сессия Отделения медико-биологических наук АМН СССР и Отделения физиологии АН СССР	436
<i>Эмирбеков Э. З.</i> Всесоюзный симпозиум «Обмен веществ при зимней спячке и естественном сне»	438

# CONTENTS

<i>Prikhozhan A. V., Kovalev G. I., Rayevsky K. S.</i> , Regulation of neurotransmitter release from glutamate/aspartate neurons of rat brain cortex by auto- and heteroreceptors . . . . .	341
<i>Godukhin O. V., Budantzev A. Yu.</i> , Presynaptic autoregulation of glutamate release in rat striatum . . . . .	348
<i>Galoyan A. A., Srapionyan R. M., Karapetyan R. O., Abelyan J. G., Saakyan F. M., Saakyan C. A., Abramyan S. S., Grigoryan L. A., Odabashyan A. B., Bochko I. F.</i> Multiple forms of cardiotropic neurohormones from hypothalamus . . . . .	354
<i>Kapralov A. A., Tyulenev V. I., Belik Ya. V.</i> Localization of a neurospecific S-100 protein in brain nuclear pore-lamina and its action on phosphorylation of nuclear membrane proteins . . . . .	365
<i>Kanunnikova N. P.</i> Effect of ethanol on succinic semialdehyde reduction in some rat brain regions . . . . .	370
<i>Pozanov V. A., Bezamahouta C.</i> The rate of 2-oxoglutarate utilization and some related compounds content in different regions of rat brain . . . . .	377
<i>Badalyan I. A., Davtyan M. A.</i> , Amide groups of proteins and ammonium formation in rat brain . . . . .	384
<i>Ostapenko I. A., Shabanova M. E., Tyurin V. A., Borin M. L., Gorhunov N. V., Etingof R. N.</i> Rat hereditary dystrophy and retinal membrane lipids . . . . .	391
<i>Zabelinsky S. A., Denisov N. A.</i> Protein of proteolipids and lipids in subcellular fractions and whole brain of vertebrata . . . . .	397

## Short communications

<i>Grigorev I. P., Neokesariyskiy A. A.</i> Na <sup>+</sup> -dependent <sup>3</sup> H-GABA binding to rat brain cortical synaptosomes after the intraventricular injection of G-hydroxydopamine and ascorbic acid . . . . .	401
<i>Krichevskaya A. A., Bondarenko T. I., Goroshinskaya I. A., Khodakova A. A., Mikhaleva I. I., Krupennikova E. Yu.</i> Effect of delta-sleep inducing peptide (DSIP) on the activity of MAO and histamine in rat brain and blood under cold stress conditions . . . . .	408
<i>Galsian H. G., Zakarian R. A., Khachatrian G. S.</i> The effect of purine and pyrimidine cyclic nucleotides on the activity of RNA-polymerase in brain cells nuclei . . . . .	416
<i>Zagoskin P. P., Samartsev V. N.</i> Effect of malate on the regulation of oxidative phosphorylation in brain mitochondria . . . . .	416

## Letters to Editor

<i>Galoyan A. A., Gurvits B. Ya., Sharova N. P.</i> Calcium-independent activator of cyclic nucleotides phosphodiesterase from brain . . . . .	420
--	-----

## Reviews

<i>Sherstnev V. V., Rylow A. L., Gromov A. I.</i> Peptides and aggressive behavior . . . . .	423
--	-----

## Chronicles

<i>Barkhudaryan N. N.</i> Meeting of the Neurochemistry Section June 2-3th, 1986, Moscow) . . . . .	435
<i>Kruglikov R. I.</i> Meeting of the Medical, Biological and Physiological Sections of the USSR Academy of Medical Sciences . . . . .	435
<i>Emirbekov E. Z.</i> All-Union Symposium "Metabolism in normal sleep and hibernation conditions" . . . . .	438

# СОДЕРЖАНИЕ

журнала «Нейрохимия», том 5, 1986 год

## Выпуск I

<i>Брусованик В. И., Ерин А. Н., Селищева А. А., Горбунов Н. В., Тюрин В. А., Прилико Л. Л., Каган В. Е.</i> Изменение физико-химических параметров синаптических мембран под действием фосфолипаз $A_2$ , C и D . . . . .	3
<i>Сергеева М. Г., Курочкин И. И., Склянкина О. А., Зайцев С. В., Варфоломеев С. Д.</i> Использование препаратов лиофилизированных мембран для радиорецепторного анализа опиатов и опиоидных пептидов . . . . .	11
<i>Мелешко О. В., Гензин М. Т., Рева А. Д.</i> Выделение, очистка и физико-химические свойства админотрипептидазы мозга кошек . . . . .	20
<i>Жерновиков Д. Д.</i> О гетерогенности энкефалингидролизующей мембраносвязанной аминотрипептидазы мозга человека . . . . .	29
<i>Кричевская А. А., Горошинская И. А., Федоренко Г. М., Ходакова А. А.</i> Активность MAO и ультраструктура головного мозга крыс при разных режимах гипероксии . . . . .	37

## Краткие сообщения

<i>Галоян А. А., Чифликян М. Д., Мурадян М. Ш., Едигарян А. К., Абрамян С. С.</i> Действие нейрогормона «С» на синтез, захват и высвобождение катехоламинов в мозгу крыс . . . . .	45
<i>Годухин О. В.</i> Влияние дибутирил сАМР и форсколина на высвобождение $^3H$ -глутамата и $^3H$ -дофамина из неостриатума мозга крысы . . . . .	49
<i>Худоерков Р. М.</i> Изменение обмена белков в отдельных структурах мозга крыс при воздействии тетрапептидамидом (цитохимическое исследование). . . . .	53
<i>Потанико Р. И.</i> Влияние ацетилхолина и норадреналина на активность $Na^+$ , $K^+$ -АТФазы синаптических мембран головного мозга взрослых и старых крыс . . . . .	57

## Обзоры

<i>Парфенова Е. В.</i> Эндогенные ингибиторы ГАМК-рецепторов постсинаптических мембран . . . . .	61
<i>Палбандян Р. М.</i> Медьсодержащие белки мозга и их значение в этиологии шизофрении . . . . .	74

## Хроника

<i>Николай Николаевич Демин</i> (к 75-летию со дня рождения). . . . .	85
<i>Таринова Н. П.</i> Симпозиум «Актуальные проблемы современной нейрохимии», посвященный 100-летию со дня рождения академика А. В. Палладина . . . . .	88
<i>Галоян А. А.</i> X Международное собрание по нейрохимии (Рива-дель-Гарда, Италия, 1985). . . . .	93

## Рефераты статей, направленных на депонирование в ВИННИТИ

<i>Герштейн Л. М., Абилова Г. А., Сергутина А. В.</i> Активность некоторых ферментов медиаторного и белкового метаболизма в структурах ЦНС при действии аргинилвазопрессина и шизофентидина . . . . .	101
<i>Никифоров А. Ф., Князев Г. Г., Михайлов В. В.</i> Влияние электрокоагуляции	

вентрального норадренергического пути на реактивность дофаминергических структур мозга при воспроизведении оборонительных условно-рефлекторных реакций.	102
Давыдов В. В., Скурыгин В. П., Жежа В. В., Ступницкий Ю. П., Якушев В. С. Обмен пирувата в больших полушариях головного мозга при экспериментальном инфаркте миокарда	103
Эмирбеков Э. З., Исмаилов И. А. Активность глутаминазы в головном мозгу зимоспящих и незимоспящих животных при самосогревании после перенесенной гипотермии	104
Колесниченко Л. С., Манторова Н. С. Ферменты метаболизма восстановленного глутатиона (ФМВГ) в головном мозгу и других тканях в норме и при голодании	104

## Выпуск 2

Городинский А. И., Дамбинова С. А. Влияние $Na^+$ и $Ca^{2+}$ на рецепторное связывание $^3H$ -L-глутамата с мембранами первых клеток	115
Третьяк Т. М., Архипова Л. В. Взаимодействие L-ДОФА с внутриклеточными структурами мозга и печени крыс	125
Зейналов Т. А., Ермолаев К. М., Позднеев В. Ф., Камышинская Н. С. Активация МАО типа Б головного мозга быка 2-изопропоксифенилметилкарбаматом и некоторыми его структурными аналогами	131
Галоян А. А., Гурвиц Б. Я., Шарова И. П. Об активации фосфодиэстеразы циклического гуанезин-3', 5'-монофосфата гипоталамуса метилксантинами и папаверином	139
Демин Н. Н., Шортанова Т. Х., Головина Т. Н., Рубинская Н. Л. Белки и РНК в системе нейрон-нейроглия супраоптического ядра гипоталамуса головного мозга суслика в динамике зимней спячки	149
Туманова С. Ю., Налбандян Р. М. Взаимодействие ганглиозидов с медью	160
Ростолян М. А. Гистохимическое исследование аденлатциклазы в мозжке крысы	167
Бизян А. С., Кругликов Р. И. Исследование секреции норадреналина методом переноса срезов коры мозга крыс	172

## Краткие сообщения

Чеботарева Т. Л., Герштейн Л. М. Действие тетрапептида тафцина на содержание белков в нейронах двигательной системы мозга крыс	180
Мовсесян В. А., Кондратьев А. Д., Магакян Ю. А., Колтухчева Н. А., Гаспарян Г. Г., Северин Е. С. Стимуляция пролиферации культивируемых фибробластов фактором роста нервов из семенной плазмы быка	185
Крупеникова Е. Ю., Юхананов Р. Ю., Михалева Н. Н., Бондаренко Т. И. Содержание пептид дельта-сна-подобного материала в головном мозгу крыс в норме и при холодовом стрессе	190
Асатрян Р. М., Бадалян Р. Б., Симонян А. А. Аннончувствительная АТРаза в субклеточных образованиях мозга кур в онтогенезе	194

## Письма в редакцию

Оганесян В. С., Бадалян Л. Л., Бебжанян К. Д. Влияние белков на активность растворимой формы фосфатзависимой глутаминазы мозга	200
--	-----

## Хроника

Аврова Н. Ф. Липиды нервной ткани (по материалам X Международного собрания по нейрохимии, Рива-дель-Гарда, Италия, май, 1985 г.)	203
Микеладзе Д. Г. Молекулярная организация рецепторных белков, механизмы	

### Рефераты статей, направленных на депонирование в ВИНТИ

- Мегостаев Г. И., Анисков Ю. З.* Анализ взаимодействия опиоидных пептидов и брадикинина на нейронах моллюсков и млекопитающих . . . . . 217
- Армениян А. Р., Аракелян Л. Н., Санасарян А. А., Анджоян Е. О., Галоян А. А.* Влияние гипоталамического гексапептида на высвобождение и захват <sup>3</sup>H-норадреналина, <sup>3</sup>H-серотонина и <sup>3</sup>H-ГАМК в синапсах мозга крыс . . . . . 218
- Капранов А. А., Тюленев В. И., Назаренко В. И.* Влияние белка S-100 на транспорт РНК в клеточных ядрах мозга крыс и активность АТФазы ядерных мембран . . . . . 219
- Бурназян Л. Б., Мовсисян Н. О., Урсанджян М. Г., Арутюнян А. В.* Влияние нуклеиновых нуклеотидов и их производных на активность и распределение множественных форм малакдегидрогеназы в мозгу крыс . . . . . 220
- Гастева С. В., Райзе Т. Е., Шарасина Л. М.* Обмен гидрофильной и гидрофобной частей молекулы фосфолипидов в субклеточных фракциях мозга крыс при ишемии . . . . . 222

### Выпуск 3

- Бизян А. С., Кругликов Р. И.* Регуляция высвобождения <sup>3</sup>H-норадреналина пресинаптическими  $\alpha$ - и  $\beta$ -адренорецепторами в срезах коры мозга крыс . . . . . 231
- Захарян Р. А., Рычков Г. Е., Дадалян С. С., Бакунц Н. С., Агабалян А. С., Рухляк Л. А., Айрапетян С. Н.* Действие двухпочечной РНК на мембранные процессы пейсмекерного нейрона . . . . . 239
- Хачатрян Г. С., Вартанян Г. Г.* Распределение гистамина в различных отделах головного мозга и активность диаминооксидазы при терминальных состояниях, восстановлении жизненных функций организма и действию физиологически активных веществ . . . . . 247
- Товмасын А. Х., Минеева М. Ф., Казарян Б. А.* Участие ГАМК в регуляции активности тирозингидроксилазы гипоталамуса крысы . . . . . 257
- Бресткин А. П., Ковалев Н. Н., Розенгарт Е. В., Хованских А. Е., Федоренко Ю. А., Эпштейн Л. М.* Субстратно-ингибиторная специфичность холинэстеразы нервной ткани командорского кальмара . . . . . 264
- Хватова Е. М., Гарсия А.* Кинетические характеристики очищенной и мембраносвязанной митохондриальной малакдегидрогеназы мозга . . . . . 270
- Хужамбердиев М., Сайдуллаев Т., Мамадиев М., Горкин В. З.* Нарушения катаболизма биогенных аминов и других азотистых соединений в головном мозгу при экспериментальном атеросклерозе . . . . . 277

### Краткие сообщения

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

### Методы исследования

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

## Обзоры

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

## Хроника

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

## Выпуск 4

- Прихожан А. В., Ковалев Г. И., Раевский К. С.* Ауто- и гетерорецепторная регуляция высвобождения нейропередатчика из глутамат/аспартатергических нейронов коры мозга крыс . . . . . 341
- Годухин О. В., Буданцев А. Ю.* Пресинаптическая ауторегуляция высвобождения глутамата в стриатуме крыс . . . . . 348
- Галоян А. А., Срациоян Р. М., Карапетян Р. О., Абелян Ж. Г., Саакян Ф. М., Саакян С. А., Абрамян С. С., Григорян Л. А., Одабабян А. Б., Бочко И. Ф.* Множественные формы кардиостимулирующих нейрогормонов гипоталамуса . . . . . 354
- Каприлов А. А., Тюленев В. И., Белик Я. В.* О наличии нейроспецифического белка S-100 в ламинно-поровом комплексе ядер клеток мозга и его влиянии на фосфорилирование белков ядерной мембраны . . . . . 365
- Канунникова И. П.* Влияние этанола на восстановление янтарного полуальдегида в некоторых структурах мозга крыс . . . . . 370
- Розанов В. А., Безамута С.* Интенсивность процесса утилизации α-кетоглутарата и содержание некоторых связанных с ним субстратов в различных отделах головного мозга крыс . . . . . 377
- Бадалян Н. А., Дагтян М. А.* Амидные группы белков и аммиакообразование в головном мозгу крыс . . . . . 384
- Остапенко Н. А., Шабанова М. Е., Тюрин В. А., Борин М. Л., Горбунов Н. В., Этингер Р. И.* Об изменениях липидов мембран сетчатки при развитии наследственной дистрофии у крыс . . . . . 391
- Забелдинский С. А., Денисова Н. А.* Протеолипидный белок и липиды целого мозга и субклеточных фракций в ряду позвоночных . . . . . 397

## Краткие сообщения

- Григорьев Н. П., Неокесарийский А. А.* Na<sup>+</sup> зависимое связывание 3H-ГАМК синаптосомами коры больших полушарий головного мозга крыс после внутрижелудочкового введения 6-оксидофамина и аскорбиновой кислоты . . . . . 401
- Кричевская А. А., Бондаренко Т. И., Горюшинская И. А., Ходакова А. А., Михалева И. И., Крупеникова Е. Ю.* Влияние пептида дельта-гена на активность моноаминоксидазы и содержание гистамина в мозгу и крови крыс при действии холодового стресса . . . . . 408
- Галстян Г. Г., Захарян Р. А., Хичатрян Г. С.* Влияние пуриновых и пиридиновых циклических нуклеотидов на РНК-полимеразную активность ядер клеток головного мозга . . . . . 413
- Загоскин П. П., Самарцев В. П.* Регуляция магнатином скорости окислительного фосфорилирования в митохондриях головного мозга при использовании различных субстратов дыхания . . . . . 416

## Письма в редакцию

- Галоян А. А., Гурец Б. Я.* Кальцийнезависимый пентидный активатор фосфо-  
диэстеразы циклических нуклеотидов мозга . . . . . 420

## Обзоры

- Шерстнев В. В., Рылов А. Л., Громов А. И.* Пептиды, мозгоспецифические бел-  
ки и агрессивное поведение . . . . . 423

## Хроника

- Бархударян П. А.* О заседании Секции нейрохимии (2—3 июня 1986 г., Москва) . . . . . 435
- Кругликов Р. И.* Научная сессия Отделения медико-биологических наук АМН  
СССР и Отделения физиологии АН СССР . . . . . 435
- Эмирбеков Э. З.* Всесоюзный симпозиум «Обмен веществ при зимней спячке  
и естественном сне» . . . . . 438

## К СВЕДЕНИЮ ЧИТАТЕЛЕЙ!

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

С 1984 г. журнал «НЕЙРОХИМИЯ» издается на английском языке издательством Harwood Academic Publishers GmbH and ORA Ltd

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

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

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

УКАЗАТЕЛЬ АВТОРОВ, ОПУБЛИКОВАННЫХ В ТОМЕ 5, 1986 г.

- Абелин Ж. Г. 354 (4)  
 Абилова Г. А. 101 (1)  
 Абрамян С. С. 45 (1), 354 (4)  
 Аврова А. Ф. 203 (2)  
 Агабальян А. С. 239 (3)  
 Азарян А. В. 333 (3)  
 Айрапетян С. П. 239 (3)  
 Акулов Н. Н. 302 (3)  
 Анисимов Ю. З. 217 (2)  
 Аракелян Л. Н. 218 (2)  
 Армениян А. Р. 218 (2), 286 (3)  
 Арутюнян А. В. 220 (2)  
 Архипова Л. В. 125 (2)  
 Асатрян Р. М. 194 (2)
- Бадалян Н. А. 384 (4)  
 Бадалян Л. Л. 200 (2)  
 Бадалян Р. Б. 194 (2)  
 Базян А. С. 172 (2), 231 (3)  
 Бакуш Н. С. 239 (3)  
 Бархударян Н. А. 435 (4)  
 Беджанян К. Д. 200 (2)  
 Безамаута С. 377 (4)  
 Белик Я. В. 365 (4)  
 Бондаренко Т. Н. 190 (2), 408 (4)  
 Борин М. Л. 391 (4)  
 Бочко И. Ф. 354 (4)  
 Бресткин А. П. 264 (3)  
 Брусованик В. Н. 3 (1)  
 Буданцев А. Ю. 348 (4)  
 Буриазян Л. Б. 200 (2)
- Вартанян Г. Г. 247 (3)  
 Варфоломеев С. Д. 11 (1)  
 Веретенников А. А. 314 (3)  
 Волощук С. Г. 302 (3)
- Галоян А. А. 45, 93 (1), 139 (2),  
 218 (2), 286 (3), 354 (4), 420 (4)  
 Галоян К. А. 297 (3)  
 Галстян Г. Г. 413 (3)  
 Гарсия А. 270 (3)  
 Гастева С. В. 222 (2)  
 Гаспарян Г. Г. 185 (2)  
 Генгин М. Т. 20 (1)  
 Герштейн Л. М. 101 (1), 180 (2)
- Годухин О. В. 49 (1), 348 (4)  
 Горбунов Н. В. 3 (1), 391 (4)  
 Горкин В. З. 277 (3)  
 Головинна Т. А. 149 (2)  
 Городицкий А. Н. 115 (2)  
 Горошинская И. А. 37 (1), 408 (4)  
 Григорьев Н. П. 404 (4)  
 Григорян Л. А. 354 (4)  
 Грищенко Е. Н. 290 (3)  
 Громов А. П. 423 (4)  
 Гурвич Б. Я. 139 (2), 420 (4)
- Давтян М. А. 297 (3), 384 (4)  
 Дадалян С. С. 239 (3)  
 Дамбинова С. А. 115 (2)  
 Денисова Н. А. 397 (4)  
 Демин Н. Н. 149 (2)  
 Демущкин В. П. 302 (3)  
 Долго-Сабуров В. В. 306 (3)
- Едигарян А. К. 45 (1)  
 Еркин А. Н. 3 (1)  
 Ермоляев К. М. 131 (2)
- Жерлосеков Д. Д. 29 (1)
- Забелинский С. А. 397 (4)  
 Загоскин П. П. 416 (4)  
 Зайцев С. В. 11 (1)  
 Захарян Р. В. 239 (3), 413 (4)  
 Зейналов Т. А. 131 (2)
- Каган В. Е. 3 (1)  
 Казарян Б. А. 257 (3)  
 Калман М. 284 (3)  
 Камышанская Н. С. 131 (2)  
 Канунникова Н. П. 370 (4)  
 Капралов А. А. 219 (2), 365 (4)  
 Каралетян Р. О. 354 (4)  
 Князев Г. Г. 102 (1)  
 Ковалев Г. Н. 341 (4)  
 Колтухчева Н. А. 185 (2)  
 Кондратьев А. Д. 185 (2)  
 Константинова М. С. 331 (3)  
 Кричевская А. А. 37 (1), 408 (4)  
 Кругликов Р. Н. 172 (2), 231 (3),  
 333 (3), 435 (4)

Крупенинкова Е. Ю. 190 (2), 408 (4)  
Курочкин И. Н. 11 (1)

Лантев А. В. 302 (3)  
Легостаев Г. Н. 217 (2)

Магакян Ю. А. 185 (2)  
Мамадиев М. 277 (3)  
Мелешко В. П. 20 (1)  
Микеладзе Д. Г. 211 (2), 293 (3)  
Микичур Н. П. 314 (3)  
Мишесва Н. Ф. 257 (3)  
Михалева Н. П. 190 (2), 408 (4)  
Михайлов В. В. 102 (1)  
Миджоян Е. О. 218 (2)  
Мовсесян В. А. 185 (2)  
Мовсесян Н. О. 220 (2)  
Мурадян М. Ш. 45 (1)

Назаренко В. И. 219 (2)  
Налбандян Р. М. 74 (1), 160 (2)  
Неокесарийский А. А. 404 (4)  
Никифоров А. Ф. 102 (1)

Оганесян В. С. 200 (2)  
Олабашян А. Б. 354 (4)  
Окон Е. Б. 290 (3)  
Остапенко И. А. 391 (4)

Парфенова Е. В. 61 (1)  
Позднеев В. Ф. 131 (2)  
Потанинко Р. И. 57 (1)  
Прилишко Л. Л. 3 (1)  
Прихожан А. В. 341 (4)

Раевский К. С. 341 (4)  
Райзе Т. Е. 222 (2)  
Рева А. Д. 20 (1)  
Розанов В. А. 377 (4)  
Розенгарт Е. В. 264 (3)  
Ростомян М. А. 167 (2)  
Рубинская Н. Л. 149 (2)  
Рылов А. Л. 423 (4)  
Рычков Г. Б. 239 (3)  
Рухкян Л. А. 239 (3)

Саакян С. А. 354 (4)  
Саакян Ф. М. 354 (4)  
Сайдуллаев Т. 277 (3)  
Самарцев В. Н. 416 (4)  
Санасарян А. А. 218 (2)  
Северин Е. В. 185 (2)  
Селищева А. А. 3 (1)  
Семенова Т. П. 290 (3)  
Сергюткина А. В. 101 (1)  
Сергеева М. Г. 11 (1)  
Симомян А. А. 194 (2)  
Склякчица О. А. 11 (1)  
Соломония Р. О. 293 (3)  
Срашоян Р. М. 297 (3), 354 (4)

Тарапова Н. П. 88 (1)  
Товмасян А. Х. 257 (3)  
Третьяк Т. М. 125 (2)  
Туманова С. Ю. 160 (2)  
Тюленев В. Н. 219 (2), 365 (4)  
Тюрин В. А. 3 (1), 391 (4)

Урганджян М. Г. 220 (2)

Федоренко Ю. А. 264 (3)  
Федоренко Г. М. 37 (1)

Хачатрян Г. С. 247 (3), 413 (4)  
Хватова Е. М. 270 (3)  
Хованских А. Е. 264 (3)  
Ходакова А. А. 37 (1), 408 (4)  
Худоевков Р. М. 53 (1)  
Хужамбердиев М. 277 (3)

Чеботарева Т. Л. 180 (2)  
Чифлакян М. Л. 45 (1), 286 (3)

Шарагина Л. М. 222 (2)  
Шабанова М. Е. 391 (4)  
Шарова Н. П. 139 (2)  
Шеретнев В. В. 423 (4)  
Шортанова Т. Х. 149 (2)  
Штарк М. Б. 314 (3)

Эмирбеков Э. З. 438 (4)  
Энштейн Л. М. 264 (3)  
Этингер Р. Н. 391 (4)

Юхананов Р. Ю. 190 (2)