

ТОМ 7, № 2, 1988

ISSN 0203-493X

НЕЙРОХИМИЯ

ՆԵՅՆՈՔԻՄԻԱ



АКАДЕМИЯ НАУК СССР  
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

АКАДЕМИЯ НАУК СССР  
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

# НЕЙРОХИМИЯ ՆԵՅՐՈՔԻՄԻԱ

ТОМ 7, ВЫП. 2  
АПРЕЛЬ—ИЮНЬ

Журнал основан в 1982 году  
Выходит 4 раза в год

ИЗДАТЕЛЬСТВО АН АРМЯНСКОЙ ССР  
ЕРЕВАН 1988

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

Сдано в набор 25.03.1988 г. Подписано к печати 13.07.1988 г. ВФ 05602.  
Бумага № 1, 70×108<sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Высокая печать. п. л. 9,88+1 вкл. Усл. печ. лист. 14,05.  
Учет.-изд. 10,88. Тираж 720. Заказ 247. Издат. 7388.  
Адрес редакции: 375044, Ереван-44, ул. П. Сезака 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** (отп. секретарь), **Я. В. БЕЛИК, Н. Н. ДЕМИН** (зам.  
главного редактора), **К. Г. КАРАГЕЗЯН, П. Г. КОСТЮК, А. А. КРИ-**  
**ЧЕВСКАЯ, В. К. ЛИШКО, Р. М. НАЛБАНДЯН, М. Ш. ПРОМЫС-**  
**ЛОВ, В. И. РОЗЕНГАРТ, Т. М. ТУРПАЕВ, А. Я. ТЯХЕПЫД,**  
**Г. С. ХАЧАТРЯН**

**Редакционный совет**

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

## 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, хромаффинных гранул и т. д. В работе журнала принимают участие, наряду с советскими нейрохимиками, известные зарубежные ученые.

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

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

Подписку на журнал «НЕЙРОХИМИЯ» можно осуществлять по всем отделениях «Связьпечати» (индекс для подписки—71637), а за границей—через агентство «Международная книга».

Журнал выходит 4 раза в год, цена одного номера—1 руб. 65 коп.



УДК 616.894.02:615.711.1

АУТОАДРЕНОРЕЦЕПТОРЫ И СТАБИЛЬНОСТЬ  
АДРЕНЕРГИЧЕСКОЙ ПЕРЕДАЧИ

БАЗЯН А. С., КРУГЛИКОВ Р. И.

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии АН СССР, Москва

Исследования проводили на 7—8- и 3—4-месячных крысах в зимний и весенний периоды. Используя многократную, с интервалом 30 мин, последовательную калиевую деполяризацию срезов коры мозга, определяли интенсивность секреции [ $^3\text{H}$ ]норадреналина (НА). Для определения стабильности секреции вычисляли коэффициенты вариации величин интенсивности первой секреции  $S_1$ , коэффициенты вариации средних величины интенсивности секреции  $S_{cp}$  и коэффициенты вариации величин соотношений последующих секреций к первой. Полученные результаты показали, что в весенний период интенсивность секреции [ $^3\text{H}$ ]НА достоверно увеличивается, повышаются также коэффициенты вариаций, что определяется как дестабилизация секреции. У крыс, исследованных в весенний период, активность аутоадренорецепторов приводит к отсутствию зоны стабильной секреции. Отмечена корреляция между активностью аутоадренорецепторов и изменениями интенсивности секреции [ $^3\text{H}$ ]НА при многократной калиевой деполяризации срезов коры мозга крыс с интервалом 30 мин. В зимний период, когда аутоадренорецепторы образуют зону стабильной секреции, наблюдали усиление и стабилизацию секреции [ $^3\text{H}$ ]НА. В весенний же период, когда зона стабильной секреции не образуется, и в аутоадренорецепторах превалирует тормозной  $\alpha$ -рецепторный эффект, имело место непрерывное уменьшение секреции [ $^3\text{H}$ ]НА без последующей стабилизации. Сделан вывод, что аутоадренорецепторы активируются секретлируемым из терминалей НА и регулируют секрецию медиатора при последующей деполяризации, подавляемой через 30 мин.

Ранее теоретически было обосновано [1, 2] и экспериментально показано [3—5], что при исследовании зависимости активности аутоадренорецепторов от концентрации НА выявляется концентрация, на которую уже не реагирует  $\beta$ -аутоадренорецептор и которая еще не активирует  $\alpha$ -аутоадренорецептор. Эта концентрация названа нами зоной стабильной секреции. В адренергических синапсах она обеспечивает реализацию таких нейрофизиологических процессов, как синаптическая депрессия и синаптическое облегчение, при последовательной серии пре-синаптической импульсации. Но главная функция зоны стабильной секреции сводится к стабилизации количества секретлируемого медиатора на каждый импульс, которое уже не меняется в следующих импульсах данной серии.

Целью данной работы служит исследование взаимосвязи между наличием зоны стабильной секреции в аутоадренорецепторах и стабильностью секреции [ $^3\text{H}$ ]НА.

### Методы исследования

Опыты проводили на самцах белых беспородных крыс в возрасте 7—8 месяцев, массой 300—350 г и в возрасте 3—4 месяцев, массой 180—230 г в зимний и весенний периоды. Для исследования основных параметров секреции НА был использован метод переноса срезов, описанный ранее [3].

Четыре (от одного животного) или восемь (от двух животных) тангенциальных срезов теменной коры толщиной 0,3 мм инкубировали в общем объеме (4 или 8 мл) двухбуферной (1 мМ Na-фосфатный и 15 мМ бикарбонатный) среды Кребса-Рингера, рН 7,25 в течение 15 мин, при 37°. Затем в ту же инкубационную среду добавляли 10 или 20 мкКи DL-[ $^3\text{H}$ ]НА («Amersham», Англия, У. А. 10 или 20 Ки/ммоль), с конечной концентрацией  $2,5 \cdot 10^{-10}$  М НА и инкубировали 10 мин. Срезы промывали чистой средой Кребса-Рингера в течение 30 мин и многократно, через каждые 30 мин, исследовали спонтанное и вызванное калиевой деполяризацией накопление радиоактивности в 1 мл среды при 2-минутной инкубации в них срезов. Деполяризацию срезов 7—8-месячных животных вызывали 20 мМ KCl при содержании 1,3 мМ CaCl<sub>2</sub> в среде Кребса-Рингера. У 3—4-месячных животных деполяризацию вызывали средой, содержащей 20 или 30 мМ KCl и 2,6 мМ CaCl<sub>2</sub>. Интенсивность секреции S определяли соотношением величины радиоактивности накопленной при K<sup>+</sup>-деполяризации к величине спонтанно накопленной радиоактивности. Для активации аутоадренорецепторов использовали экзогенный  $\alpha$ -НА («Sergal», ФРГ) в концентрации  $10^{-11}$ — $10^{-7}$  М и определяли коэффициент регуляции секреции С. Зону стабильной секреции определяли графически (подробнее см. [3—5]).

Стабильность секреции количественно определяли вычислением коэффициентов вариации интенсивности секреции [ $^3\text{H}$ ]НА. CV<sub>S</sub> — коэффициент вариации интенсивности секреции при первой деполяризации S<sub>1</sub> каждого из 4 параллельных срезов, CV<sub>Scp</sub> — коэффициент вариации средней величины интенсивности секреции, S<sub>cp</sub> — средняя арифметическая из 10 или 12 величин S от всех 4 параллельных срезов одного животного [3]. На одном срезе интенсивность секреции последовательно определяли 4 или 5 раз, с интервалом 30 мин, и вычисляли соотношение величин интенсивности секреции при последующей деполяризации к первой S<sub>n</sub>/S<sub>1</sub>, где n=2, 3, 4 и 5 [3]. CV<sub>S<sub>n</sub>S<sub>1</sub></sub> — коэффициент вариации данного соотношения.

Для статистической обработки полученных результатов использовали критерий Стьюдента—*t*<sub>p</sub> и Вилкоксона, для сопряженных пар—*P*<sub>z</sub>

## Результаты и обсуждение

Результаты проведенных исследований представлены в таблице, где средняя величина интенсивности секреции  $[^3\text{H}]\text{НА}$  из срезов коры мозга крыс в весенний период значительно выше, чем в зимний. Одновременно увеличивается и коэффициент вариации интенсивности секреции. Причем  $\text{CV}_S$ , в весенний период выше, чем в зимний, но изменения не достоверные. А  $\text{CV}_{\text{ср}}$  уже повышается достоверно как по отношению к  $\text{CV}_{\text{ср}}$  зимнего периода, так к  $\text{CV}_S$ , весеннего периода. Из таблицы видно, что средняя ошибка  $\text{CV}_S$  больше, чем средняя ошибка  $\text{CV}_{\text{ср}}$ . Это происходит вследствие того, что при вычислении  $\text{CV}_{S_1}$  используется 4 значения  $S_1$ , а при вычислении  $\text{CV}_{\text{ср}}$ —10—12 значений  $S$  от одного животного (см. „Методы исследования“).

На рис. 1 представлены величины соотношения  $S_n/S_1$  при  $n=2, 3, 4$  и  $5$  у обеих групп животных. Как видно из рисунка, при по-

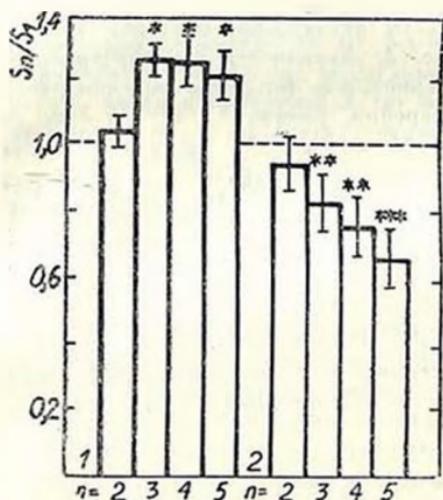


Рис. 1. Интенсивность секреции  $[^3\text{H}]\text{норадреналина}$  из срезов коры мозга 7—8-месячных животных в зимний (1) и весенний (2) период при многократной, с интервалом в 30 мин, последовательной деполяризации 20 мМ  $\text{KCl}$ , 1,3 мМ  $\text{CaCl}_2$ . По оси ординат отложены отношения интенсивности секреции  $[^3\text{H}]\text{норадреналина}$  при последующих деполяризациях к первой, принятой за 1 (пунктирная линия); \* $p_1 < 0,001$ , 0,01 и 0,05 для  $n=3, 4$  и 5 соответственно; \*\* $p_2 < 0,05$ ; \*\*\* $p_2 < 0,01$

следовательной деполяризации: срезь с интервалом в 30 мин в зимний период наблюдается усиление интенсивности секреции и ее стабилизация при  $n=3, 4$  и  $5$ . Разница между соотношениями  $S_1/S_1$  к  $S_2/S_1$  и  $S_3/S_1$  к  $S_1/S_1$  составляет 1 и 3% соответственно. Коэффициенты вариации для каждого соотношения  $S_n/S_1$  равны 17,1, 15,7, 19,6 и 15,9% соответственно. Эти величины значительно не отличаются друг от друга и соответствуют величинам  $\text{CV}$  для этой группы животных, приведенным в табл. Изменения соотношений  $S_n/S_1$  в весенний период имеют прямо противоположную направленность, выраженную в значительном уменьшении интенсивности секреции при последовательной деполяризации срезов с интервалом 30 мин. В этом случае коэффициент вариации для каждого соотношения  $S_n/S_1$  составляет 21,6, 22,3, 34,2 и 34,0% соответственно. Таким образом, многократная деполяризация срезов коры мозга крыс в весенний период приводит к повы-

шению коэффициента вариации  $S_n/S_1$  при увеличении  $n$  почти на 50%. Значительное возрастание коэффициента вариации указывает на дестабилизацию секреции [ $^3\text{H}$ ]НА из срезов коры мозга крыс в весенний период.

Таблица

Соотношение величин интенсивности секреции [ $^3\text{H}$ ]норадреналина из срезов коры мозга 7—8-месячных животных ( $n=13$ ) в зимний и весенний периоды

	Зимний период	Весенний период	$P_t$
$S_{\text{ср}}$	$2,19 \pm 0,09$	$4,06 \pm 0,39$	$< 0,001$
$CV_{S_1}, \%$	$14,8 \pm 2,6$	$19,3 \pm 3,1$	$< 0,001$
$CV_{S_{\text{ср}}}, \%$	$17,6 \pm 1,5$	$26,3 \pm 1,4$	
$P_t$		$< 0,05$	

Результаты исследований активности аутоадренорецепторов у этих групп животных представлены на рис. 2. Активность аутоадренорецепторов коры мозга крыс в зимний период, что подробно описано ранее [3—5], образует зону стабильной секреции, равной  $5,5 \cdot 10^{-9}$  М НА. А в весенний период ауторецепторы коры мозга крыс зону стабильной секреции не образуют. На достаточно большом диапазоне концентраций наблюдается только эффект уменьшения секреции [ $^3\text{H}$ ]НА при активации аутоадренорецепторов экзогенным НА. Причем отсутствует характерная для зимнего периода дозозависимая реакция. При концентрации экзогенного НА  $10^{-11}$  М  $S=0,76$ ,  $p_t < 0,001$ ;  $10^{-10}$  М  $S=0,79$ ,  $p_t < 0,001$ ;  $10^{-9}$  М  $S=0,91$  и  $10^{-8}$  М  $S=0,76$ ,  $p_t < 0,05$ . Величины  $S$  при концентрациях экзогенного НА  $10^{-11}$ — $10^{-9}$  М у весенних и зимних животных достоверно отличаются  $p_t < 0,001$  ( $10^{-11}$  и  $10^{-10}$ ) и  $< 0,05$  ( $10^{-9}$ ).

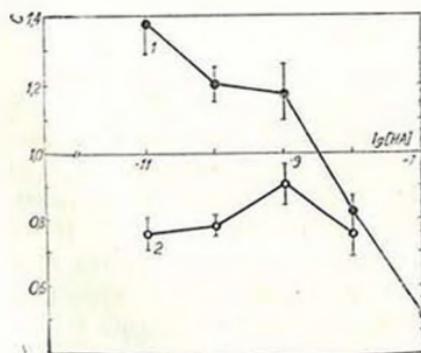


Рис. 2. Зависимость активности аутоадренорецепторов у 7—8-месячных животных от концентрации экзогенного норадреналина при деполяризации срезов коры мозга крыс 20 мМ КСl, 1,3 мМ СаСl<sub>2</sub> в зимний (1) и весенний (2) периоды. По оси абсцисс — логарифм концентрации норадреналина; по оси ординат — коэффициент регуляции секреции [ $^3\text{H}$ ]норадреналина аутоадренорецепторами

Сопоставление результатов, представленных на рис. 1 и 2, указывает на то, что при наличии в аутоадренорецепторах зоны стабильной секреции наблюдается стабилизация секреции [ $^3\text{H}$ ]НА при многократных последовательных деполяризациях срезов коры мозга крыс, а отсутствие зоны стабильной секреции приводит к дестабилизации

нии секреции [ $^3\text{H}$ ]НА. Кроме того, наблюдается соответствие между преобладающим тормозным эффектом аутоадренорецепторов и постепенным уменьшением секреции [ $^3\text{H}$ ]НА при последующих деполяризациях срезов коры мозга крыс в весенний период. Из всего сказанного можно сделать вывод, что даже в наших условиях эксперимента секретируемый из терминалей вследствие деполяризации НА активирует аутоадренорецепторы и регулирует секрецию медиатора при последующей деполяризации, несмотря на то, что интервал между деполяризациями составляет 30 мин. Для подтверждения приведенного вывода на рис. 3 представлены соотношения  $S_{II}/S_I$  у других групп животных, исследованных в зимний период, аутоадренорецепторы которых образуют зону стабильной секреции. Последовательная деполяризация срезов коры мозга 3—4-месячных крыс при добавлении 20 и 30 мМ КСl (8 и 11 животных соответственно) также приводит к усилению и дальнейшей стабилизации секреции [ $^3\text{H}$ ]НА. Разница между соотношениями  $S_3/S_1$  и  $S_4/S_1$  при 20 мМ КСl составляет 1%, а при 30 мМ КСl—4%,  $CV_{с.р.} = 18,7$  и 18,8%, а зона стабильной секреции— $2,4 \cdot 10^{-10}$  и  $6 \cdot 10^{-9}$  М НА соответственно [5]. Обнаруженные изменения исследованных показателей в весенний период воспроизводили в течение 3 лет в обеих возрастных группах животных при разных условиях деполяризации.

Таким образом, полученные результаты экспериментально подтверждают выдвинутую [6] и математически обоснованную [1, 2, 7] гипотезу о функциональной роли  $\alpha$ - и  $\beta$ -аутоадренорецепторов, заключающейся в стабилизации секреции медиатора в серии пресинаптической импульсации и дестабилизации секреции при нарушении нормального функционирования аутоадренорецепторов.

Общезвестно, что у животных в весенний период многие процессы отклоняются от нормы. Такие отклонения выявлены и в наших исследованиях—повышение интенсивности секреции [ $^3\text{H}$ ]НА при равной концентрации деполяризующего агента. Повышение интенсивности секреции при прочих равных условиях связано, по-видимому, с возбудимостью нервных клеток. Вероятно, в весенний период порог возбудимости нервных клеток снижен, поэтому одинаковые по силе деполяризующие агенты вызывают более интенсивную секрецию медиатора из срезов коры мозга по сравнению с зимним периодом. Изменение порога возбудимости нервных клеток связано с изменением внеклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , уменьшение которой понижает порог возбудимости клеток [8]. Но известно также, что внеклеточная концентрация поливалентных катионов, в том числе и  $\text{Ca}^{2+}$ , определяет поверхностный заряд возбудимых мембран и оказывает прямое стабилизирующее действие на структуру мембраны [8]. Поскольку аутоадренорецепторы являются структурными белками возбудимых мембран, появляется возможность соединить в единую цепь последовательных событий уменьшение внеклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , уменьшение порога возбудимости клеток, дестабилизацию структуры пресинаптических мембран и отсутствие зоны стабильной секреции в аутоадренорецепторах, наблюдаемые у животных

в весенний период. Анализ кривых активности аутоадренорецепторов индивидуально для каждого животного позволяет сделать вывод о том, что в весенний период происходит, по-видимому, «бесконтрольный» сдвиг активности аутоадренорецепторов по шкале концентраций НА. График активности рецепторов в весенний период, представленный на рис. 2, можно получить из теоретических кривых активности аутоадренорецепторов [1, 2, 7] наложением кривой  $\beta$ -рецептора на кривую  $\alpha$ -рецептора при условии, что активность  $\alpha$ -рецептора больше активности  $\beta$ -рецептора.

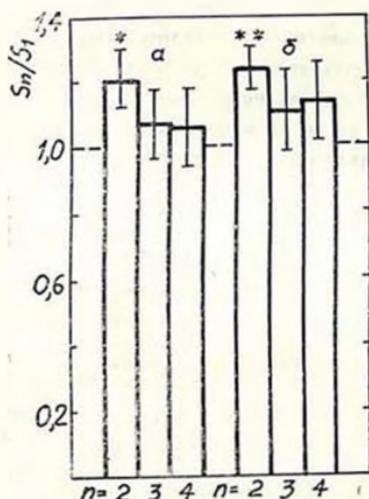


Рис. 3. Интенсивность секреции [ $^3$ H]норэдреналина из срезов коры мозга 3—4-месячных животных в зимний период при многократной, с интервалом 30 мин, последовательной деполяризации 20 (а) и 30 mM KCl (б); 2,6 mM CaCl<sub>2</sub>. Обозначения по оси ординат те же, что и на рис. 1; \*  $p_2 < 0,05$ ; \*\*  $p_2 < 0,01$

Величины  $CV_{S_1}$  и  $CV_{S_n/S_1}$  характеризуют диапазон случайных колебаний количества секретируемого медиатора в ответ на деполяризацию. Этот показатель имеет большое функциональное значение хотя бы потому, что его анализ позволил выдвинуть гипотезу о квантовом характере секреции АХ [9], свойственном также секреции НА [10]. Величина  $CV_{S_{ср}}$  характеризует диапазон как случайных колебаний количества секретируемого медиатора в ответ на деполяризацию, так и закономерных изменений количества секретируемого медиатора, вызванных активацией аутоадренорецепторов. Проведенные исследования показали, что в зимний период величины  $CV_{S_1}$  и  $CV_{S_n/S_1}$  практически не отличаются, а сами  $S_n$  меняются, и их изменения обеспечиваются функционированием аутоадренорецепторов. На основании всего сказанного можно сделать вывод, что в условиях *in situ* при последовательной серии пресинаптических импульсов аутоадренорецепторы реализуют процессы синаптической депрессии или синаптического облегчения и стабилизации секреции НА, не изменяя диапазона случайных колебаний количества секретируемого медиатора на каждый импульс из серии. В весенний же период, когда аутоадренорецепторы не образуют зону стабильной секреции, наблюдается дестабилизация секреции [ $^3$ H]НА. Практически любой исследователь поведения животных сталкивается с фактом затруднения выработки условного рефлекса в весенний период, что, по-

видимому, объясняется дестабилизацией секреции НА из адренергических терминалей коры мозга крыс, наблюдаемой в весенний период.

В проведенных исследованиях периодическая  $K^+$ -деполяризация изменялась как тестирующая стимуляция, и, как нам казалось, 30-минутный интервал был достаточен для снятия эффекта предыдущей деполяризации на последующую. Но полученные результаты опровергли наше предположение. Изменения секреции при многократной последовательной  $K^+$ -деполяризации с интервалом в 30 мин соответствуют активности аутоадренорецепторов (рис. 1, 2). В зимний период, когда аутоадренорецепторы образуют зону стабильной секреции, наблюдается очень сходный с синаптическим облегчением процесс (рис. 1, 3), описанный математической моделью [2]. Такое сохранение эффекта регуляции секреции во времени может иметь большое функциональное значение при процессах обучения и памяти.

## AUTOADRENORECEPTORS AND STABILITY OF ADRENERGIC TRANSMISSION

BAZYAN A. S., KRUGLIKOV P. I.

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

Experiments have been performed on 3—4- and 7—8-months-old rats in winter and spring. Intensity of  $^3H$ -NA secretion has been studied in brain cortex slices after  $K^+$ -depolarization. To establish the stability of secretion the coefficient of variation of middle values of first secretion  $S_1$  and secretion  $S_{middle}$  and that of the ratio of the subsequent secretions to the first one have been calculated. Data obtained indicate that in spring the intensity of  $^3H$ -NA secretion increases (the coefficients of secretion as well) that points to destabilization of secretion.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Базян А. С., Бродский Б. Л. Биофизика, т. 28, № 5, с. 858—862, 1983.
2. Базян А. С. Биофизика, т. 29, № 3, с. 470—472, 1984.
3. Базян А. С., Кругликов Р. И. Нейрохимия, т. 5, № 2, с. 172—179, 1986.
4. Базян А. С., Кругликов Р. И. Нейрохимия, т. 5, № 3, с. 231—239, 1986.
5. Базян А. С., Кругликов Р. И. Нейрохимия, т. 6, № 4, с. 488—494, 1987.
6. Базян А. С., Успехи соврем. биол., т. 92, № 4, с. 115—126, 1981.
7. Базян А. С., Беркинблит М. Б., Бродский Б. Л. Биофизика, т. 29, № 5, с. 895—898, 1984.
8. Холоров Б. И. Общая физиология возбудимых мембран, серия «Руководство по физиологии», М., Наука, 1975.
9. Кэндел Э. Ключевые основы поведения, М., Мир, 1980.
10. Blakeley A. G. H., Cunnane T. C. J. Physiol. (Gr. Brit.), v. 2, № 69, p. 85—96, 1979.

Поступила 12. I 1987



УДК 616.8.009.863+612.822+519.3±612.63

## ВЛИЯНИЕ ДЕПРИВАЦИИ ПАРАДОКСАЛЬНОЙ ФАЗЫ СНА У БЕРЕМЕННЫХ КРЫС НА СВЯЗЫВАНИЕ [<sup>3</sup>H]ДИАЗЕПАМА С СИНАПТИЧЕСКИМИ МЕМБРАНАМИ КОРЫ БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЙ МОЗГА НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ОНТОГЕНЕЗА ИХ ПОТОМСТВА

ЖУЛИН В. В., ЗАБЛУДОВСКИИ А. А.

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии АН СССР;  
\*Институт психиатрии МЗ РСФСР, Москва

Согласно клиническим наблюдениям, неврозы матерей во время беременности могут приводить к церебральным дисонтогенезам у детей—задержкам психического развития. В экспериментальных исследованиях для моделирования невротических реакций нередко применяют депривацию парадоксальной фазы сна (ПФС)—воздействием вызывающее срыв высшей нервной деятельности.

Нами было показано, что у потомства крыс, перенесших депривацию ПФС во время беременности, изменены ориентировочные реакции в «открытом поле», значительно ухудшено сохранение рефлекса пассивного избегания, снижен порог чувствительности к электрическому току, повышена судорожная готовность.

По современным представлениям, бензодиазепиновая (БД) система мозга принимает участие в организации ряда функций ЦНС. В частности, показано, что бензодиазепины влияют на память, вызывая антероградную амнезию [1], изменяют структуру сна, в особенности его парадоксальную фазу [2], воздействуют на судорожную готовность [3].

Исходя из этого, в настоящей работе исследовали влияние депривации ПФС во время беременности на характеристики связывания [<sup>3</sup>H]дiazепама с синаптическими мембранами мозга потомства крыс.

### Материалы и методы

Самки белых крыс в период с 14 по 20 дни беременности содержали в стеклянных резервуарах на небольших площадках, окруженных водой. Контрольные животные находились в обычных клетках. В обеих группах были синхронизированы периоды кормления. После рождения крыс пометы были выравнены по количеству животных.

По достижении 14-дневного (или двухмесячного) возраста в период между 10—12 ч дня самцов обеих групп декапитировали, извлекали кору больших полушарий и гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера

с тefлоновым пестиком (25—30 фрикций) в 20 объемах (по весу ткани) среды выделения (0,32 М сахараза, 0,05 М трис-НСl, рН 7,4 и 0,001 М ЭДТА). Гомогенат центрифугировали при 1000 g 10 мин, осадок отбрасывали, а супернатант центрифугировали при 20000 g 20 мин. Осадок Р<sub>2</sub> суспендировали в 20 мл 0,05 М трис-НСl, рН 7,4 и замораживали на ночь при —10°. На следующий день осаждали материал центрифугированием при 20000 g 20 мин и еще раз отмывали осадок 0,05 М трис-НСl, рН 7,4 при тех же условиях. Полученную грубую фракцию синаптических мембран Р<sub>2</sub> ресуспендировали в 15 мл 0,05 М трис-НСl, рН 7,4. На всех стадиях выделения поддерживали температуру —4°.

Реакцию связывания [<sup>3</sup>H]диазепама с БД-рецепторами начинали добавлением 0,4 мл суспензии мембран к 0,1 мл водного раствора [<sup>3</sup>H]диазепама (90 Ки/ммоль, «Amersham», Англия) и останавливали через 30 мин фильтрованием образца через фильтр GF/B и тремя промывками по 2 мл 0,05 М трис-НСl, рН 7,4 (выбрано 10 точек в интервале концентраций 0,3÷30 нМ; каждая точка взята в трех параллелях; время фильтрования одного образца составляло 10 с). Инкубацию проводили при температуре 1—2°. Высушенные фильтры помещали в сцинтилляционные флаконы с 8 мл жидкого сцинтиллятора ЖС-8 («Реакхим», СССР) и просчитывали на жидкостном сцинтилляционном счетчике «Rack Beta» («LKB», Швеция). Для учета неспецифического связывания изучали зависимость связывания [<sup>3</sup>H]диазепама с фракцией синаптических мембран Р<sub>2</sub> в присутствии 0,4·10<sup>-6</sup> М меченого 7-бром-десметилдиазепама [4]. Для концентрации 0,3 нМ меченого диазепама неспецифическое связывание не превышало 8%, а для концентрации 30 нМ—30% от общего связывания. В каждом эксперименте контролировали наклон прямой неспецифического связывания по нескольким точкам, а также вводили поправку на содержание белка. Затем вычисляли специфическое связывание как разность общего связывания и неспецифического, определенного из наклона соответствующей ему прямой (данный метод определения неспецифического связывания в условиях стандартизированных процедур выделения и связывания дает меньшую погрешность, чем традиционный). Концентрация белка, определенная по методу Lowry и соавт. [5], варьировала в пределах 0,2—0,4 мг/пробу.

В подопытной и контрольной группах было по 6 животных. Данные по связыванию усредняли и откладывали в координатах Скэтчарда. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента.

В большинстве работ по связыванию бензодиазепинов с синаптическими мембранами мозга график Скэтчарда имеет линейный характер. Вместе с тем, для построения графика часто рассчитывают линейную регрессию по 4÷6 точкам [6—8], иногда пренебрегая параметрами связывания в области малых концентраций лиганда [9], что в совокупности может иметь принципиальное значение для определения формы графика. Поэтому для построения графика Скэтчарда мы взяли 10 точек по различным концентрациям меченого диазепама, причем половину из них— в области малых концентраций (0,3÷2 нМ).

## Результаты и обсуждение

Проведенные нами исследования показали, что для двухмесячных животных, в отличие от двухнедельных, графики Скэтчарда носят нелинейный характер. Для анализа последних представлялось целесообразным воспользоваться моделью двух независимых участков связывания, поскольку этот метод дает возможность определить количественное соотношение и аффинности популяций независимо от того, являются ли они химически неоднородными рецепторами или различными конформационными формами рецептора одного типа. Разложение экспериментальных кривых в соответствии с моделью двух независимых участков связывания проводили по методу Кантор, Шиммель [10].

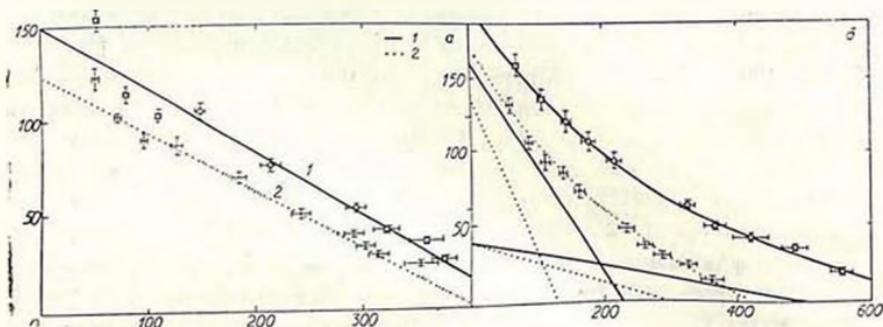


Рис. Графики Скэтчарда для связывания  $[^3\text{H}]$ диазепама с синаптическими мембранами мозга крыс в возрасте 14 дней (а) и 2 месяцев (б), матерн которых подвергались депривации ПФС во время беременности. 1—контроль, 2—опыт. По оси абсцисс—специфическое связывание (фмоль/мг белка), по оси ординат—
$$\frac{\text{несвязанная метка}}{\text{несвязанная метка} + \text{специфическое связывание}} \left( \frac{\text{фмоль}}{\text{мг белка} \cdot \text{нМ}} \right)$$

Общий уровень связывания  $[^3\text{H}]$ диазепама с синаптическими мембранами (рис. а, б) контрольных крыс увеличивается с возрастом животных (для двухнедельных— $442,2 \pm 18,7$  фмоль/мг белка, двухмесячных— $722,0 \pm 28,9$  фмоль/мг белка,  $p < 0,01$ ), что совпадает с данными, имеющимися в литературе [11]. Однако у 14-дневных крыс обнаружена одна популяция, а у двухмесячных—две популяции БД-рецепторов, что может свидетельствовать о неполной дифференциации рецепторов в раннем онтогенезе. В группе подопытных животных общий уровень связывания с возрастом практически не изменился (две недели— $406,7 \pm 15,9$  фмоль/мг белка; 2 месяца— $422,0 \pm 19,9$  фмоль/мг белка).

Лишение ПФС во время беременности привело у двухнедельного потомства к небольшому снижению сродства ( $K_d$ ) и доступных мест связывания ( $B_{\text{max}}$ ) по сравнению с контролем (контроль:  $K_d = 2,96 \pm 0,09$  нМ,  $B_{\text{max}} = 442,2 \pm 18,7$  фмоль/мг белка; опыт:  $K_d = 3,30 \pm 0,11$  нМ\*,  $B_{\text{max}} = 406,7 \pm 15,9$  фмоль/мг белка, \* $p < 0,05$ ). В группе двухмесячных животных снижение общего связывания составило 42% (контроль— $722,0 \pm 28,9$  фмоль/мг белка; опыт— $422,0 \pm 19,9$ \* фмоль/мг белка, \* $p < 0,01$ ), что было обусловлено комплексным изменением параметров связывания в обеих популяциях БД-рецепторов (таблица). Связывание

с низкоаффинной популяцией снизилось преимущественно за счет уменьшения аффинности рецепторов, тогда как для высокоаффинной популяции, в основном, за счет снижения числа мест связывания (удельный вес каждой популяции не изменился: высокоаффинная—31%, низкоаффинная—69%).

Функция БД-рецепторов тесно связана со сном. С одной стороны, известен выраженный снотворный эффект этой группы лекарств, опосредуемый БД-рецепторами, а с другой—показано, что в зависимости от времени суток и состояния организма (бодрствование—сон) изменяется плотность БД-рецепторов [12]. Сходная ситуация (опосредование действия лекарств и изменение в ответ на физиологические нагрузки) обнаруживается и при исследовании БД-рецепторов потомства животных, перенесших фармакологическое или физиологическое воздействие во время беременности. Так, пренатальное воздействие хлордиазепоксида привело у крыс к достоверному снижению связывания [<sup>3</sup>H]флуниотразапама с мембранами неокортекса [13]. Значительное снижение связывания [<sup>3</sup>H]флуниотразапама выявлено у потомства крыс, подвергавшихся стрессу во время беременности [14]. Хорошо видно, что эти данные сходны с результатами, полученными нами при изучении влияния на потомство депривации ПФС и других сопровождающих ее патогенных факторов (стресс, ограничение подвижности).

Таблица 3

Влияние депривации парадоксальной фазы сна во время беременности на параметры связывания [<sup>3</sup>H]диазепама с синаптическими мембранами неокортекса потомства крыс в возрасте двух месяцев (n=6)

Количество животных	Высокоаффинная популяция		Низкоаффинная популяция	
	Kd, нМ	Vmax, $\frac{\text{фмоль}}{\text{мг белка}}$	Kd, нМ	Vmax, $\frac{\text{фмоль}}{\text{мг белка}}$
Контроль	1,42±0,06	225,8±9,1	12,35±0,54	496,2±19,9
Опыт	0,96±0,04*	130,0±6,1*	7,58±0,30*	292,0±13,8*

Примечание. \*p<0,01, n—количество опытов.

Могут ли эти явления иметь общий механизм? Как известно, бензодиазепины, модулируя ГАМК-сргическую систему, оказывают успокаивающее и снотворное действие. Поэтому не исключено, что депривация ПФС, связанный с ней стресс в качестве компенсаторной реакции вызывают в мозгу усиленную секрецию эндогенного нейромедиатора. Последнее, в свою очередь, равно как и хроническое применение бензодиазепинов, может стать причиной снижения доступных мест связывания (феномен десенситизации). Принципиальная возможность вышеизложенного механизма подтверждается, с одной стороны, данными о том, что бензодиазепины являются агонистами, а не антагонистами БД-рецепторов [15] и, с другой—сведениями о выделении с помощью метода моноклональных антител вещества с близкими к бензодиазепинам свойст-

вами [16]. Описанная схема может реализоваться в системе мать-плод, так как показано, что патологические изменения в результате пренатального воздействия диазепама устраняются при параллельном применении конкурентного антагониста бензодиазепинов—Ro15-1788 [17]. Следовательно, диазепам воздействует на плод, взаимодействуя с рецепторами «центрального» типа мозга матери.

В заключение следует отметить, что диазепам является неселективным лигандом БД-рецепторов: он связывается с рецепторами и «центрального», и «периферического» типов. Последние не опосредуют фармакологических эффектов бензодиазепинов, а их плотность в мозгу приблизительно в 4 раза ниже, чем плотность рецепторов «центрального» типа [18]. Представляется маловероятным, что рецепторы «периферического» типа вносят какой-либо значимый вклад в общую перестройку всей популяции БД-рецепторов мозга крыс, матери которых подвергались депривации ПФС во время беременности.

## EFFECT OF RAPID EYE MOVEMENT SLEEP DEPRIVATION DURING PREGNANCY ON [<sup>3</sup>H]-DIAZEPAM BINDING TO SYNAPTOSOMAL MEMBRANES OF RAT NEOCORTEX ON THE DIFFERENT STAGES OF POSTNATAL DEVELOPMENT

ZHULICH V. V., \*ZABLUDOVSKY A. L.

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

\*Psychiatry Research Institute, Ministry of Public Health of the RSFSR Moscow

Rapid eye movement sleep deprivation during pregnancy results in alteration of <sup>3</sup>H-diazepam binding to the synaptosomal neocortex membranes from rat offsprings. Binding level diminished for 9% in 14-day old males. In two months old animals Scatchard plots were not straight lines, because the analysis of experimental curves was carried out in accordance with the model of two independent binding sites. It has been shown that prenatal treatment leads to significant decrease (42%) of the total level of binding caused by complex changes in the high- and low-affinity populations of the benzodiazepine receptors. Possible modes of brain benzodiazepine system disturbance are discussed.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Bixler E. O., Scharf M. B., Soldatos C. R., Mitsky D. J., Kales A. *Life Sci.*, v. 25, p. 1379—1388, 1979.
2. Воронина Т. А., Неробкова А.Н. *Фармакология и токсикология*, т. XLIV, с. 18—20, 1980.
3. Paul S. M., Syapin P. J., Paugh B. A., Moncada V., Scolnick P. *Nature*, v. 281, p. 688—689, 1979.
4. Андронатти С. А., Чепелева В.М., Якубовская Л. Н., Вальдман А. В., Рожанец В. В., Жушин В. В., Коротков К. О. *Биоорганическая химия*, т. 9, с. 1357—1361, 1983.

5. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265—275, 1951.
6. Tallman J. F., Thomas J. W., Gallager D. W. *Nature*, v. 274, p. 383—385, 1978.
7. Braestrup C., Albrechtsen R., Squires R. F. *Nature*, v. 269, p. 702—704, 1977.
8. Guidotti A., Toffano G., Costa E. *Nature*, v. 275, p. 553—555, 1978.
9. Marangos P. J., Patel J. *Life Sci.*, v. 29, p. 1705—1714, 1981.
10. Кантор Ч., Шиммель П. *Биофизическая химия*, т. 3, с. 13—14, М., Мир, 1985.
11. Candy J. M., Martin I. L. *J. Neurochem.*, v. 32, p. 655—658, 1979.
12. Brennan M. J. W., Volicer L., Moore-Edo M. C., Borsook D. *Life Sci.*, v. 36 p. 2333—2337, 1985.
13. Gavish M., Avnimelech-Gigus N., Feldon J., Myslobodsky M. *Life Sci.*, v. 36, p. 1693—1698, 1985.
14. Fride E., Dan Y., Gavish M., Veinstock M. *Life Sci.*, v. 36, p. 2103—2109, 1985.
15. Concas A., Salis M., Biggio G. *Life Sci.*, v. 32, p. 1175—1182, 1983.
16. Sangameswaran L., de Blas A. L. *PNAS USA*, v. 82, p. 5560—5564, 1985.
17. Simmons R. D., Miller M. K., Kellog C. K. *Brain Res.*, v. 307, p. 39—46, 1984.
18. Marangos P. J., Patel J., Boulenger J.-P., Clark-Rosenberg R. *Mol. Pharmacol.*, v. 22, p. 26—32, 1982.

Поступила 4. I. 1988



УДК 577.17:547.953:612.8.015:612.822.1

## ЛИПИДНАЯ КОМПОНЕНТА СИНАПТОСОМ ГОЛОВНОГО МОЗГА МЫШЕЙ КАК МОДУЛЯТОР АКТИВНОСТИ СЕРОТОНИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

### 1. ИЗМЕНЕНИЯ ЛИПИДНОЙ КОМПОНЕНТЫ СИНАПТОСОМ ГОЛОВНОГО МОЗГА МЫШЕЙ ПРИ АКТИВАЦИИ СЕРОТОНИНЕРГИЧЕСКОЙ НЕЙРОМЕДИАТОРНОЙ СИСТЕМЫ *n*-ХЛОРАМФЕТАМИНОМ И ВВЕДЕНИИ АНТИОКСИДАНТА

БОРОВОК Н. В., МОЛОЧКИНА Е. М., ДУБИНСКАЯ Н. И., БУРЛАКОВА Е. Б.

Институт химической физики АН СССР, Москва

Мышам внутривенно вводили *n*-хлорамфетамин (*n*-ХА), усиливающий выброс серотонина в синаптическую щель и вызывающий у животных специфический синдром встряхивания головы. В процессе развития названного синдрома обнаружен ряд изменений параметров липидной компоненты синапсосом: увеличение соотношений общие липиды/белок, фосфолипиды/белок, повышение содержания отдельных фракций фосфолипидов, уменьшение количества холестерина. Найдено увеличение скорости ПСА в суспензии синапсосом; в то же время количество малонового диальдегида в синапсосомах мозга мышей после введения *n*-ХА было ниже, чем в контроле. Микровязкость липидного бислоя синапсосом, которую определяли методом спинного зонда, существенно повышена после введения *n*-ХА. Наблюдали характерные сдвиги температур структурных перестроек в мембране. Действие *n*-ХА сравнивали с влиянием антиоксиданта инола через 18 ч после его введения *in vivo*. Установлено, что большая часть характеризующих липиды параметров изменялась в ту же сторону, что и под действием *n*-ХА. Введение животным инола за 18 ч до *n*-ХА существенно усиливало серотонинергический синдром, вызываемый *n*-ХА. Этот факт в совокупности с полученными биохимическими данными свидетельствует о возможной роли липидной компоненты нервных окончаний головного мозга как модулятора активности серотонинергической системы *in vivo*.

В настоящее время активно изучается роль липидов мембран нервных клеток в функционировании нейромедиаторных систем, в частности серотонинергической. Актуальность изучения последней определяется ее важной ролью в активности ЦНС и жизнедеятельности организма в целом [1, 2]. Исследованию роли липидов в работе серотонинергической системы был посвящен ряд публикаций, в которых демонстрируется вклад отдельных липидов и свойств липидной компоненты в те или иные этапы рассматриваемой нейромедиаторной передачи [3—8]. Однако

необходимо отметить, что в основном эти работы проводили в условиях *in vitro* на препаратах синапсом и мембран, часто с применением «инвазивных» методов модификации последних. В 70—80 годы Бурлаковой и соавт. был выполнен цикл исследований, посвященных выявлению роли липидов в функционировании мембраносвязанных белков (главным образом ферментов) при модификации липидной компоненты мембран *in vivo* [9—12]. Такой подход сохраняется и в изучении роли липидов в активности нейромедиаторных систем.

Целью настоящей работы было выявить, может ли липидная часть мембран нервных окончаний играть роль модулятора активности серотонинергической системы *in vivo*. Для решения этой задачи было необходимо: во-первых, определить наличие изменений в составе и свойствах липидов синапсом головного мозга при модификации активности серотонинергической передачи введением в организм соответствующего фармакологически активного вещества; во-вторых, изучить влияние направленной модификации *in vivo* состава и свойств липидной фазы синапсом на активность серотониновой системы.

В качестве модификатора активности исследуемой системы использовали *n*-ХА, являющийся ее активатором за счет усиления процесса выброса медиатора в синаптическую щель [13]. Для направленной модификации липидной фазы синапсом применяли антиоксидант 4-метил-2,6-дитретбутилфенол (ионол), исходя из представлений о наличии регуляторной взаимосвязи между интенсивностью ПОЛ и составом и структурой липидной компоненты мембран [14].

### Материалы и методы

В работе использовали беспородных мышей массой 18—23 г, содержащихся на общевиварном рационе (всего 520 животных). Мышам внутрибрюшинно вводили *n*-ХА (хлорид) в виде водного раствора в дозах 10 и 20 мг/кг массы животных. Мышам контрольной группы вводили дистиллированную воду.

Ионол вводили внутрибрюшинно в дозе 20 мг/кг в дистиллированной воде. В качестве солюбилизатора использовали Твин-80.

Тестирование активности серотонинергической системы проводили по так называемому серотонинергическому синдрому встряхивания головой у мышей, подсчитывая через определенное время после введения препарата число характерных «поклонов» в мин.

Для выделения фракции синапсом мышей быстро декапитуировали, извлекали головной мозг и помещали на лед. Гомогенизацию и все дальнейшие операции проводили при 4° [15].

Содержание белка определяли по методу Lowry и соавт. [16], используя в качестве стандарта сывороточный альбумин крови человека.

Скорость ПОЛ оценивали по накоплению малонового диальдегида (МДА) при окислении синапсомных липидов в процессе инкубации суспензии синапсом при 37° с продуванием воздуха. Количество МДА определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [17].

Экстракцию липидов проводили методом, описанным Кейтсом [18]. Состав фосфолипидов определяли методом ТСХ на силикагеле. В качестве системы растворителей использовали смесь хлороформ/метанол/уксусная кислота/вода (50:30:8:4). Количество отдельных фракций оценивали по содержанию Р<sub>1</sub> в снятых с пластинок пятнах [19]. Количество общих липидов определяли весовым методом после упаривания липидного экстракта. Содержание общего холестерина в липидах определяли спектрофотометрическим методом [20].

Мерой микровязкости липидной компоненты синаптосом было время корреляции вращения ( $\tau_c$ ) спиновых зондов 2,2,6,6-тетраметил-4-пальмитилоксилипиперидин-1-оксида (C<sub>15</sub>) и 2,2,6,6-тетраметил-4-каприлоксилипиперидин-1-оксида (C<sub>7</sub>). Регистрацию спектров ЭПР проводили на спектрометре „Bruker“ (США).  $\tau_c$  рассчитывали по формуле для быстровращающихся зондов [21]:

$$\tau_c = 6,65 \cdot \Delta H_{\perp} \cdot \left( \frac{1}{U_{+1} U_{-1}} - 1 \right) \cdot 10^{-11} \text{ с,}$$

где  $U_{+1}$  и  $U_{-1}$  — интенсивности низко- и высокопольной компонент дифференциального спектра поглощения,  $\Delta H_{\perp}$  (гаусс) — расстояние между экстремумами низкопольной компоненты.

Статистическую обработку данных проводили, используя *t*-критерий Стьюдента [22].

### Результаты и обсуждение

Вызываемый *n*-ХА серотонинергический синдром встряхивания головы у мышей, связанный с активацией С<sub>2</sub>-серотониновых рецепторов [23], проявляется уже через 5 мин после введения препарата. Максимальный эффект наблюдается через 15—20 мин и остается практически на одном уровне в течение 30—40 мин, затем начинается спад активности (постепенное снижение числа «поклонов» в мин). На рис. 1, а показано развитие серотонинергического синдрома у мышей во времени после введения *n*-ХА в дозе 10 мг/кг, на рис. 1, б представлена зависимость числа «поклонов» от дозы препарата через 15 мин после введения. Дальнейшие исследования проводили при введении 10 и 20 мг/кг *n*-ХА. Максимальное число «поклонов» в первом случае составляло  $23,7 \pm 1,7$  ( $n=24$ ), во втором —  $32,7 \pm 1,9$  ( $n=18$ ) в мин.

В табл. 1—3 представлены изменения параметров, характеризующих состояние липидной фазы синаптосом через 15 и 45 мин после введения *n*-ХА в дозах 10 и 20 мг/кг. Из приведенных данных видно, что при активации серотонинергической системы *n*-ХА имеют место следующие изменения: увеличение соотношения липиды/белок, выраженная тенденция к снижению содержания холестерина в расчете на мг белка, некоторая тенденция к уменьшению соотношения холестерин/липиды и холестерин/фосфолипиды. Суммарное содержание фосфолипидов в общих липидах практически не меняется. Существенно увеличивается по сравнению с контролем количество общих и отдельных фосфолипидов в рас-

чете на мг белка. Интересно отметить, что содержание таких фракций, как фосфатидилсерин (ФС) и фосфатидилинозит (ФИ) увеличивается в большей степени, чем соотношение общие фосфолипиды/белок (табл. 3). Изменение именно их суммарного содержания в синапсосах головного мозга оказалось характерным при модификации активности ГАМК-ергической и холинергической нейромедиаторных систем [24].

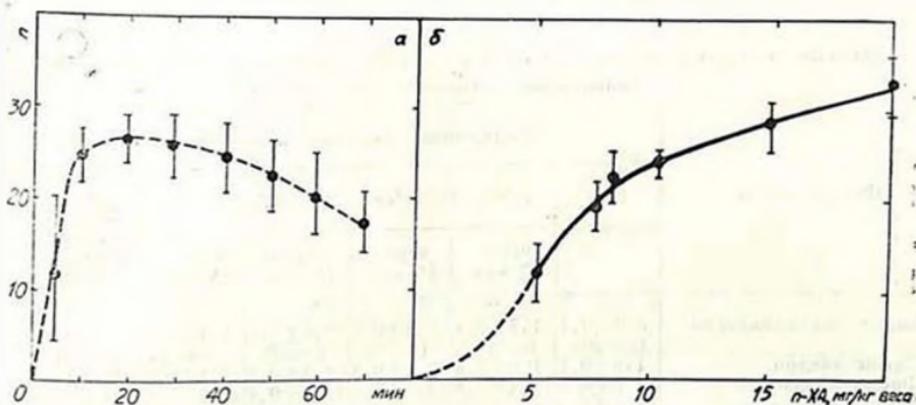


Рис. 1. Развитие серотонинергического синдрома встряхивания головой у мышей после внутрибрюшинного введения п-ХА: а—во времени, по оси абсцисс—время после введения препарата, по оси ординат—число «поклонов» в минуту; б—в зависимости от дозы введенного п-ХА. По оси ординат—число «поклонов» в минуту через 15 мин после введения препарата

Таким образом, введение *in vivo* п-ХА приводит к изменению ряда параметров, характеризующих липидный состав синапсосом головного мозга мышей. Наряду с изменениями в составе липидов были обнаружены различия в системе ПОЛ. Из табл. 2, 3 видно, что количество МДА в синапсосах, выделенных через 15 и 45 мин после введения п-ХА, снижено по сравнению с контрольными образцами. В то же время скорость накопления МДА в процессе инкубации синапсосом с продуванием воздуха существенно повышена (примерно в 2 раза для обеих доз) в случае введения животных п-ХА (через 15 мин после введения). Данные по увеличению скорости накопления МДА свидетельствуют, на наш взгляд, об интенсификации ПОЛ. Пониженный уровень МДА может быть связан с «компенсаторной» активацией ферментных систем, утилизирующих продукты ПОЛ. Не исключено также прямое или опосредованное действие п-ХА на процессы метаболизма эндогенных ТБК-активных продуктов.

Поскольку ПОЛ, состав липидов, структура мембраны взаимосвязаны в единой регуляторной системе [14], можно было ожидать, что введение п-ХА, вызвавшее описанные выше изменения в составе липидов синапсосом и интенсивности ПОЛ, приведет также к изменениям микровязкости липидного бислоя мембран синапсосом. Нами были исследованы изменения микровязкости липидного бислоя синапсосом после

введения 20 мг/кг п-ХА. На рис. 2, а и б приведены температурные зависимости  $\tau_c$  для зондов  $C_{15}$  и  $C_7$ . Как видно из рисунка, введение животным п-ХА практически не влияет на величину  $\tau_c$  зонда  $C_{15}$  во всем интервале температур. Вид температурной зависимости  $\tau_c$  для зонда  $C_{15}$  в «опытных» синапсоммах также мало отличается от контроля. Что касается зонда  $C_7$ , то  $\tau_c$  для него во всем исследованном интервале темпе-

Таблица 1

Влияние п-хлорамфетамина (п-ХА) и инола на содержание фосфолипидов в синапсоммах головного мозга мышей

Фосфолипиды	Содержание фосфолипидов, мкг $p_i$ /мг белка					
	контроль	п-ХА, 10 мг/кг		п-ХА, 20 мг/кг		Инол 20 мг/кг через 18 ч после введения
		через 15 мин	через 45 мин	через 15 мин	через 45 мин	
Лизофосфатидилхолин	0,9±0,1 (n=20)	1,7±0,1 (n=9)	1,5±0,2 (n=9)	0,6±0,1 (n=7)	1,4±0,2 (n=9)	2,2±0,1 (n=4)
Сфинг-миелин	1,5±0,1	1,9±0,4	3,1±0,3	2,3±0,5	3,1±0,5	3,5±0,5
Фосфатидилхолин	11,0±0,5	10,5±0,6	14,2±0,6	14,2±0,4	16,8±1,6	17,1±0,7
Фосфатидилинозит	1,5±0,3	1,6±0,5	2,1±0,2	1,8±0,4	3,1±0,5	4,5±0,4
Фосфатидилсерин	2,8±0,1	3,6±0,5	5,1±0,1	3,8±0,2	5,4±0,2	5,9±0,5
Фосфатидилэтаноламин	9,2±0,3	9,8±0,4	13,0±0,3	12,5±0,5	15,9±0,1	17,4±0,4
Фосфатидная кислота + кардиолипин	2,1±0,2	2,9±0,5	4,4±0,3	2,0±0,5	4,2±0,2	3,4±0,8
Фосфолипиды (сумма)	29,0±1,6	32,0±2,5	43,4±2,6	37,2±2,6	49,9±2,9	54,0±4,6

Примечание. n-число опытов.

ратур было выше, чем в контроле. При 37° оно в 2,4—2,9 раза превышало контрольный уровень. Температурная зависимость  $\tau_c$  зонда  $C_7$  для «опытных» синапсомм существенно отличалась от контроля и имела сложный характер (рис. 2, а). Можно было предположить, что такой характер изменения  $\tau_c$  с температурой обусловлен зависящим от температуры перераспределением зонда в модифицированной мембране между областями с различной полярностью. Однако анализ спектров ЭПР показал, что изотропная константа сверхтонкого взаимодействия  $A_{\text{инт}}$ , величина которой зависит от полярности окружения радикала [21], остается практически неизменной (15,95—16,02 гаусс) при всех температурах и такой же, как для контрольных синапсомм. Следовательно, наблюдаемые в опыте температурные изменения  $\tau_c$  скорее всего отражают особенности липид-белковых взаимодействий, обусловленных воздействием п-ХА. Различия в поведении двух спиновых зондов можно объяснить их разной локализацией в мембране. Зонд  $C_7$  является более «поверхностным», зонд  $C_{15}$  погружен более глубоко в гидрофобную часть бислоя. О менее полярном окружении зонда  $C_{15}$  в исследуемых синапсоммах свидетельствует константа  $A_{\text{наб}}$ , которая составляет 13,9—14,2 гаусс по сравне-

Влияние *p*-хлорамфетаминна (*p*-ХА) и ионола на характеристики липидного  
бислоя синапсом головного мозга мышей

Липидные характеристики	Контроль	<i>p</i> -ХА, 10 мг/кг		<i>p</i> -ХА, 20 мг/кг		Ионол, 20 мг/кг через 18 ч после введения
		через 15 мин	через 45 мин	через 15 мин	через 45 мин	
Липиды/белок (мг/мг)	1,2±0,1 n=20	1,2±0,1 n=9	1,8±0,3 n=9	1,4±0,2 n=7	2,1±0,3 n=9	1,8±0,2 n=4
Фосфолипиды/липиды ( $\frac{\text{мкгР}}{\text{мг}}$ )	25,1±2,6	27,6±3,1	24,8±2,5	26,1±2,7	24,3±2,6	30,5±3,5
Холестерин/белок ( $\frac{\text{мкг}}{\text{мг}}$ )	255±12 n=12	229±5 n=4	221±14 n=3	236±8 n=3	180±6 n=3	242±11 n=3
Холестерин/фосфолипиды (мкг/мкг Р <sub>i</sub> )	10,3±1,2	6,4±1,1	10,1±1,4	9,5±0,9	9,8±0,9	6,2±0,8
Холестерин/общие липиды (мкг/мг)	259±12	177±9	251±11	248±17	238±8	189±8
Микровязкость при 37° (η <sub>c</sub> ×10 <sup>10</sup> ) (зонд С <sub>2</sub> )	0,38	—	—	0,93	1,10	1,01
Уровень ТБК-активных продуктов $\frac{\text{нмоль МДА}}{\text{мг белка}}$	8,3±06 n=3	2,4±0,4 n=3	4,5±0,3 n=3	1,9±0,1 n=3	4,1±0,3 n=3	12,2±1,1 n=4
$\frac{\text{нмоль МДА}}{\text{мг липидов}}$	7,2±0,7	2,1±0,3	2,6±0,3	1,3±0,1	2,0±0,2	6,9±0,6
Скорость накопления МДА (инкубация при 37°; нмоль МДА/мг белка·мин· 10 <sup>3</sup> )	3,4±0,3	7,4±0,7	2,3±0,2	7,6±0,8	2,9±0,3	4,7±0,5

нию с 15,95—16,02 гаусс для зонда  $C_7$ . Казалось бы, сходство по величине  $\tau_c$  и характеру температурных кривых  $\tau_c$  для зонда  $C_{15}$  в опыте и в контроле свидетельствует о том, что структура этой области мало затронута воздействием  $n$ -ХА. Однако, проанализировав температурную зависимость другого параметра спектра ЭПР спиновых зондов, более чувствительного к изменению структуры окружения,  $U_0/U_{+1}$  (отношение интенсивностей центральной и низкопольной компонент спектра) [25], мы установили, что для зонда  $C_{15}$  резкие изменения  $U_0/U_{+1}$  (а значит структуры мембраны) происходят в областях  $31^\circ$  (увеличение),  $37^\circ$  (уменьшение),  $41^\circ$  (увеличение) для контрольных образцов и при  $25$  и  $51^\circ$  (уменьшение) в синапсосомах, выделенных соответственно через  $15$  и  $45$  мин после введения  $n$ -ХА. Таким образом, и в области локализации зонда  $C_{15}$  структура липидной фазы мембраны также претерпевает изменения после введения животным  $n$ -ХА.

Таблица 3

Относительные изменения (опыт/контроль) в липидной компоненте синапсом головного мозга мышей после внутрибрюшинного введения  $n$ -хлорамфетамина ( $n$ -ХА) и ионола

Воздействие / Липидная характеристика	$n$ -ХА, 10 мг/кг		$n$ -ХА, 20 мг/кг		Ионол, 20 мг/кг 18 ч после введения
	через 15 мин	через 45 мин	через 15 мин	через 45 мин	
Липиды/белок	1,00	1,53*	1,29*	1,80*	1,54*
Фосфолипиды/белок	1,10	1,50*	1,30*	1,70*	1,85*
Фосфолипиды общие липиды	1,10	0,98	1,04	0,97	1,21
ФС + ФИ/белок	1,23*	1,67*	1,30*	2,00*	2,40*
Холестерин/белок	0,90	0,85	0,92	0,70*	0,95
Холестерин общие липиды	0,70*	0,97	0,96	0,92	0,70*
Холестерин/фосфолипиды	0,50*	0,98	0,92	0,95	0,60*
Микровязкость при $37^\circ$ (зонд $C_7$ )	—	—	2,40*	2,90*	2,60*
МДА/белок	0,29*	0,54*	0,23*	0,49*	1,47*
МДА/липиды	0,29*	0,36*	0,18*	0,28*	0,96
Скорость накопления МДА (инкубация при $37^\circ$ )	2,20*	0,70*	2,20*	0,85	1,28*

Примечание. \* $p \leq 0,05$ ; ФС—фосфатидилсерин; ФИ—фосфатидилинозит; МДА—малоновый диальдегид.

Все вышеописанные экспериментальные данные позволяют сделать заключение, что при активации серотонинергической системы головного мозга  $n$ -ХА имеют место выраженные изменения состава и свойств липидной компоненты синапсом. При рассмотрении выраженности изме-

нений в липидной компоненте в зависимости от дозы *n*-ХА и времени после его введения можно отметить следующее: с увеличением дозы *n*-ХА увеличиваются изменения в соотношениях липиды/белок, фосфолипиды/белок, ФС + ФИ/белок, холестерин/белок, в количестве МДА в липидах; уменьшается степень изменения соотношений холестерин/общие липиды и холестерин/фосфолипиды; в одинаковой степени изменяется интенсивность ПОЛ. При одной и той же дозе во времени нарастают изменения соотношений липиды/белок; фосфолипиды/белок; ФС + ФИ/бе-

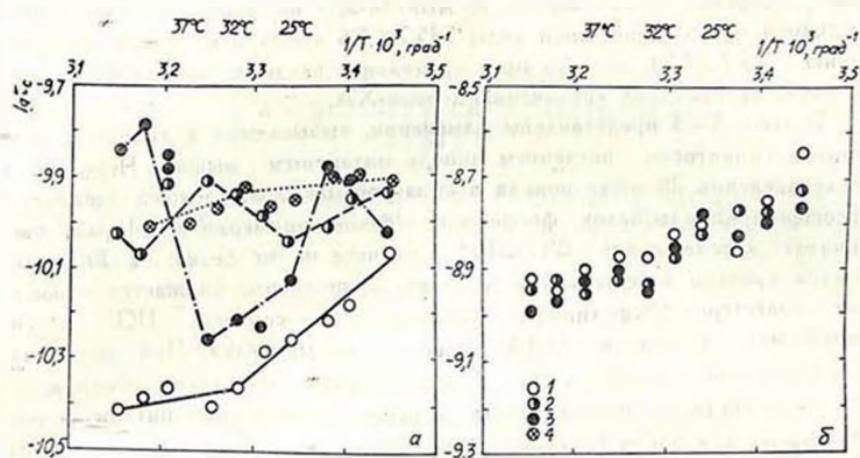


Рис. 2. Температурные зависимости  $T_c$  для спинного зонда  $C_2$  (а) и спинного зонда  $C_{15}$  (б) в синапсосамах головного мозга мышей. 1—контрольная группа, 2—через 15 мин после внутрибрюшинного введения *n*-ХА, 20 мг/кг, 3—через 45 мин после введения *n*-ХА, 20 мг/кг, 4—через 18 ч после введения инола, 20 мг/кг

лок и холестерин/белок. Через 45 мин после введения 20 мг/кг *n*-ХА более сильно, чем через 15 мин, изменена микровязкость липидного бислоя. Изменения же таких параметров, как соотношения холестерин/липиды и холестерин/фосфолипиды, а также уровень МДА в синапсосах через 45 мин после введения *n*-ХА выражены в меньшей степени, чем через 15 мин. Относительно скорости ПОЛ можно сказать, что после значительного увеличения, наблюдаемого через 15 мин, к 45-ой мин после введения препарата она возвращается к норме и даже имеет тенденцию к понижению. Временные и дозовые различия в степени изменений отдельных параметров после введения *n*-ХА могут объясняться тем, что одни изменения (нарастающие с дозой и во времени) сопровождают процессы, связанные с активацией серотонинергической передачи, другие изменения отражают, вероятно, компенсаторные (адаптационные) процессы в синапсосах, способствующие возвращению системы к нормальному уровню активности.

Возникает вопрос, являются ли описанные изменения липидов значимыми для функционирования данной нейромедиаторной системы. Для

ответа на него мы воспользовались методом направленной модификации состава и свойств мембран путем введения *in vivo* ионола, исходя из регуляторной взаимосвязи между интенсивностью ПОД, составом липидов, структурой мембран и функциональной активностью мембраносвязанных белков [14]. Прежде всего мы проверили, как влияет ионол на активность серотонинергической системы. Оказалось, что внутрибрюшинное введение мышам ионола за 18 ч до действия *n*-ХА приводит к более чем в 1,5 раза усиленному серотонинергическому синдрому по сравнению с мышами, получавшими 10 мг/кг *n*-ХА на фоне предварительно введенной дистиллированной воды ( $35,7 \pm 1,6$  «поклонов» в мин по сравнению с  $23,7 \pm 1,7$ ), то есть предварительное введение ионола было равносильно двукратному увеличению дозы *n*-ХА.

В табл. 1—3 представлены изменения, вызываемые в липидной компоненте синапсом введением ионола интактным мышам. Через 18 ч после введения 20 мг/кг ионола в синапсомы мозга мышей увеличены отношения липиды/белок, фосфолипиды/белок, примерно в 2,4 раза увеличивается содержание ФС+ФИ в расчете на мг белка, на 30% снижается уровень холестерина в липидах; существенно снижается отношение холестерин/фосфолипиды, увеличивается скорость ПОЛ в синапсомы, количество МДА в расчете на мг белка. При исследовании изменений микровязкости липидной фазы синапсом обнаружено, что после введения мышам ионола во всем исследованном интервале температур  $t_c$  для зонда  $C_7$  существенно выше, чем в контроле (рис. 2, а). При  $37^\circ$  оно в 2,6 раза превышает контрольный уровень, то есть имеет место односторонняя направленность изменений микровязкости окружения спинного зонда при введении *n*-ХА и ионола.

Таким образом, большинство изученных нами параметров липидной фазы синапсом после введения ионола изменяются односторонне с изменениями, вызванными активацией серотонинергической нейромедиаторной системы *n*-ХА. Учитывая усиление серотонинергического синдрома под действием ионола, можно сделать заключение, что изменения в липидах нервных окончаний головного мозга, вызванные введением мышам *n*-ХА, не просто сопровождают активацию исследуемой нейромедиаторной системы, а являются для нее существенными.

В проведенных *in vitro* работах выявлен вклад отдельных липидов в свойства липидной фазы в те или иные этапы рассматриваемой нейромедиаторной передачи, в частности, показана роль микровязкости липидного окружения в рецепторном связывании серотонина [3—5], установлена роль микровязкости и отдельных фракций фосфолипидов (например ФС и фосфонозитидов) в трансдукции «серотонинового» сигнала [6], роль изменений интенсивности ПОЛ в выбросе и обратном захвате медиатора [7, 8]. Полученные нами при модификации липидов синапсом *in vivo* данные не противоречат сведениям, полученным *in vitro*. Совокупность описанных выше результатов наших исследований и имеющихся в литературе данных позволяет, как нам кажется, вполне обоснованно рассматривать состояние липидной компоненты мембран в качестве мо-

дулятора активности серотонинергической нейромедиаторной системы в живом организме. Мы не можем выделить того или иного параметра, наиболее существенного для активации серотонинергической передачи. Все изменения липидной фазы синапсом укладываются в регуляторную схему, связывающую уровень ПОЛ, состав, структуру липидов, функциональную активность клеточных мембран [14]. Важен весь комплекс изменений параметров, характеризующих липиды, который необходим для перехода системы из одного метаболического состояния в другое.

## LIPID COMPONENT OF MICE BRAIN SYNAPTOSOMES MODULATES ACTIVITY OF SEROTONINERGIC SYSTEM

### 1. CHANGES IN MICE BRAIN SYNAPTOSOMAL LIPIDS UNDER THE ACTIVATION OF SEROTONINERGIC NEUROTRANSMITTER SYSTEM BY P-CHLOROAMPHETHAMINE INJECTIONS AND AFTER ANTIOXIDANT ADMINISTRATION

BOROVOK N. V., MOLOTCHKINA Ye. M., DUBINSKAYA N. I.

BURLAKOVA Ye. B.

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

Mice were injected intraperitoneally with p-chloramphethamine (PCA). This substance is known to increase serotonin release in synaptic cleft thus resulting in specific serotonergic syndrom of head nodding. During the development of syndrom following changes were detected in the synaptosomal lipid phase: increased lipid protein, phospholipid/protein ratios, increased content of individual phospholipid fractions, decreased cholesterol amount.

Increase in peroxidation rate was found in synaptosome suspension after PCA injection while MDA level became, on the contrary, lower compared with the control group. PCA injection resulted in a significant increase in synaptosomal lipid bilayer microviscosity which was evaluated by spin probe technique. Structure rearrangement temperatures revealed characteristic shifts. PCA action was compared with that of antioxidant (AO) appearing 18 hours after AO administration to mice. In the latter case it was established that the most of synaptosomal lipid parameters changed in the same direction as they did after PCA injection. Preliminary (18 h before PCA) administration of AO enhanced significantly PCA-induced serotonergic head nodding syndrom. This result together with biochemical data suggests that brain synaptosomal lipid phase may play role of a modulator of serotonergic neurotransmitter system activity *in vivo*.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Попова И. К., Науменко Е. В., Колпаков В. Г. Серотонин и поведение. Новосибирск, Наука, 1978.
2. Нейротрансмиттерные системы (под ред. Дж. Лэгга). М., Медицина, 1982.
3. Giesing M.—In: Principles and Methods of Receptor Binding. p. 195—213. N.—Y., London, 1984.
4. Heron D. S., Shinitzky M., Hershkovitz M., Samuel D. Proc. Nat. Acad. Sci., USA, Biol. Sci., v. 77, p. 7463—7467, 1980.
5. Rosenberg P. H. Arch. Pharmacol., v. 307, p. 199—203, 1979.
6. Roth B. L., Nakaki T., Chuang D. M., Costa E. Neuropharmacology, v. 23, № 10, p. 1223—1225, 1984.
7. Либс М. А., Болданова Е. Д., Розенберг А. Е., Прилипо А. П., Казан В. Е., Козлов Ю. П. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 92, № 11, с. 552—554, 1981.
8. Ковалева Е. С., Прилипо А. А., Муранов К. О., Казан В. Е. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 94, № 10, с. 55—58, 1983.
9. Бурлакова Е. Б., Джалябова М. И., Молочкина Е. М. Докл. АН СССР, т. 227, № 4, с. 991—994, 1976.
10. Бурлакова Е. Б., Молочкина Е. М.—В кн.: Регуляция биохимических процессов у микроорганизмов. Материалы симпозиума, с. 23—33, Пушкино, 1979.
11. Бурлакова Е. Б., Джалябова М. И., Гахария В. О., Глущенко Н. И., Молочкина Е. М., Штолько В. Н.—В сб.: Биогенные амины в регуляции метаболизма в норме и патологии, с. 113—140, М., Наука, 1982.
12. Бурлакова Е. Б., Кайранс Ч. Б., Молочкина Е. М., Хохлов А. П. Вопр. мед. химии, т. 30, № 1, с. 66—72, 1984.
13. Trulson M. E., Jacobs V. L. Eur. J. Pharmacology, v. 36, p. 143—254 1976.
14. Бурлакова Е. Б.—В сб.: Биохимия липидов и их роль в обмене веществ, с. 23—35, М., Наука, 1981.
15. Whittaker V. P. Progr. biophys. molec. biol., v. 15, p. 37—95, 1965.
16. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., v. 193, № 1, p. 423—431, 1951.
17. Buege J. A., Aust St. D.—In: Methods Enzymol., v. 52, p. 302—310, 1978.
18. Кейтс М. Техника липидологии, М., Мир, 1975.
19. Биохимическое исследование мембран (под ред. Э. Мэдди), М., Мир, 1979.
20. Ferry W. H., Webb M. J. Biol. Chem., v. 187, p. 95—106, 1950.
21. Кузнецов А. Н. Метод спиновой зонды, М., Наука, 1976.
22. Бэйли Н. Статистические методы в биологии, М., ИЛ, 1962.
23. Вальдман А. В.—В кн.: Нейрофармакология антидепрессантов (сб. трудов НИИ фармакологии), с. 9—49, М., 1984.
24. Бурлакова Е. Б., Архипова Г. В., Каипова Г. Д., Молочкина Е. М., Никашин А. В., Хохлов А. П., Чернявская Л. И. Труды 16-й конференции ФЕБО, с. 363, Москва, 1984.
25. Лихтенштейн Г. И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии, М., Наука, 1974.

Поступила 2. III 1988



УДК 547.963

## ДЕЙСТВИЕ АНТИФЕИНОВ НА ЭНДОГЕННОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ ХРОМАТИНА НЕЙРОНОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА

КУЛИКОВА О. Г., БОГДАНОВА Н. А., РАЗУМОВСКАЯ Н. И.

Институт экспериментальной медицины АМН СССР, Ленинград

Стимулятор памяти этилнорантифени (этимизол), активирующий синтез РНК в нейронах мозга, избирательно повышает уровень фосфорилирования негистоновых белков хроматина, экстрагируемых 0,35 М NaCl. Увеличение фосфорилирования происходит за счет низкомолекулярной фракции ( $\sim 10$  кД) с высокой электрофоретической подвижностью. Аналог этимизола—аллилнорантифени, не оказывающий положительного действия на память и синтез РНК, не изменяет фосфорилирование белков хроматина. Показано, что этимизол активирует сАМР-независимую протеникиназу II хроматина нейронов. Предлагается, что миестические эффекты антифенинов связаны с их действием на синтез РНК, опосредованным сАМР-независимой системой фосфорилирования хромосомных белков.

Моноциклические производные кофенина из группы антифенинов—этилнорантифени (этимизол) и аллилнорантифени противоположным образом действуют на долговременную память: этимизол стимулирует, а аллилнорантифени нарушает ее. Нами было обнаружено и противоположное влияние этих препаратов на синтез РНК, активация которого является необходимым метаболическим этапом в процессе консолидации [1]. Действие этих веществ на синтез РНК наблюдалось как при их введении, так и в бесклеточных системах [1]. Стимулирующий эффект этимизола опосредован негистоновыми белками: их удаление из хроматина приводит к исчезновению эффекта [2]. Известно, что в регуляции экспрессии важную роль играет фосфорилирование ядерных белков [3]. Этот процесс может не только контролировать функциональную активность ЦНС, но и, по мнению ряда авторов, лежать в основе «долговременной модуляции нейрона» [4, 5]. Однако конкретные пути вовлечения ядерных протеникиназ в процесс сохранения следа памяти, а также многие вопросы участия фосфорилирования белков хроматина в регуляции синтеза РНК все еще остаются открытыми. Выяснение их тесно связано с исследованием функциональной роли протеникиназ нерв-

ной ткани при действии препаратов, обладающих определенными местными эффектами. С этой целью в настоящей работе было предпринято изучение влияния этил- и аллилнорантефиеина на интенсивность фосфорилирования белков хроматина.

## Материалы и методы

Нейрональные клетки из коры головного мозга белых крыс-самцов массой 200—220 г получали по методу, описанному Витвицким [6]. Выделение ядер из нейронов проводили с использованием 0,5%-ного раствора тритона X-100; их идентификацию проводили согласно Lovigur-Rein, McEwen [7]. Препараты содержали в среднем 94% нейрональных ядер. Хроматин получали, как описано ранее [8]. Все среды выделения содержали 1 мМ фенолметилсульфонилфторида (ФМСФ). Экстракцию белков хроматина раствором, содержащим 0,35 М NaCl, 0,01 М трис-HCl (pH 7,6), 0,001 М MgCl<sub>2</sub>, 0,001 М ФМСФ, проводили в течение 1 ч при 4° с последующим центрифугированием при 12000g 20 мин [9]. Белки, растворимые в 0,35 М NaCl, содержались в надосадочной жидкости. Для электрофоретического анализа проводили анализ этой фракции против деионизированной воды в присутствии 1 мМ ФМСФ, после чего белковый раствор лиофилизировали. В ряде случаев к 0,35 М NaCl-растворимым белкам добавляли ТХУ до конечной концентрации 2%, затем центрифугировали при 20000g 20 мин. Концентрацию ТХУ в полученной надосадочной жидкости довели до 25% и вновь центрифугировали. Осадок, содержащий НМГ-белки, промывали ацетоном [10]. Для получения гистонов хроматин после удаления 0,35 М NaCl-растворимых белков дважды экстрагировали 0,4 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 30 мин при 4° с последующим центрифугированием при 20000 g 20 мин. Осадок, содержащий прочно связанные негистоновые белки, обрабатывали 5%-ной ТХУ при 90° 30 мин с последующим центрифугированием для удаления нуклеиновых кислот, а затем промывали смесью метанола-хлороформа для удаления липидов, конечный осадок растворяли в 2,5%-ном NaOH. Из полученных фракций отбирали аликваты для электрофоретического анализа, определения содержания белка и уровня фосфорилирования. О величине эндогенного фосфорилирования судили по уровню включения [<sup>33</sup>P] в белки после инкубации хроматина в течение 1 мин при 30°. Инкубационная среда в объеме 0,5 мл содержала (в ммоль): трис-HCl (pH 8,0)—50; MgCl<sub>2</sub>—10; дитиотреитол (ДТТ)—1; АГР(ГТР)—10; 0,74 МБк [<sup>33</sup>P]АТР (ГТР) (У. А. 60—90 ПБк/моль), 0,1 мл хроматина (до 100 мг белка) и необходимые количества исследуемых препаратов. Контролем служили пробы, не содержащие антифеинон. Реакцию останавливали во льду добавлением равного объема 30%-ной ТХУ, содержащей 10%-ный РРi-Na, 0,5 мМ АТР (ГТР), и 0,2 мл 0,5%-ного раствора альбумина. Осадок промывали 3 раза 20%-ной ТХУ и растворяли в 2,5%-ном KOH. В опытах с фракционированием хро-

тина инкубационная среда содержала не менее 2 мг белка; реакцию оставляли во льду добавлением среды инкубации, содержащей 0,5 мМ АТР (ГТР), с последующим центрифугированием. Осадок промывали дважды аналогичным способом, а затем экстрагировали белки, как описано выше. Радиоактивность подсчитывали в сцинтилляторе Брея на счетчике «Rack Beta» («ЛКВ», Швеция). Включение метки выражали в имп/мин/мг белка·мин или в пмоль/мг белка·мин.

Электрофоретический анализ белков проводили на вертикальных пластинах 18%-ного ПААГ (рН 8,8) в присутствии 0,1%-ного ДДС-На по методу Laemmli [11], концентрирующий и разделяющий гели содержали мочевины (0,5 М) и ЭДТА (5 мМ) по модификации Bhogjee [12]. Для получения электрофоретических препаратов фракции белков суспендировали в растворе 0,065 М трис-НСl (рН 6,8), 2%-ного ДДС-На, 5%-ного ДТТ, 3%-ной мочевины, 10%-ной сахарозы и выдерживали при 37° 18 ч. После электрофореза гели фиксировали в 70%-ном этаноле 18 ч, окрашивали 4 ч в растворе 0,1%-ного Кумасси голубого G-250, 0,9%-ной уксусной кислоты, 25%-ного этанола, 25%-ного изопропанола, а затем отмывали растворами 7%-ной уксусной кислоты и 10%-ного изопропанола. Гели денситометрировали при 570 нм на денситометре «Leitz Wetzlar», разрезали на участки по 2 мм и определяли радиоактивность в толуоловом сцинтилляторе. Окраску на гликопротеиды проводили по методу Маурера [13]. Содержание белка определяли по Lowry и соавт. [14]. Статистическую обработку данных проводили с использованием критерия Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

В последние годы появились данные о том, что предпочтительным субстратом протеникиназ хроматина является группа белков с высокой электрофоретической подвижностью в ПААГ—НМГ-белки, а степень их фосфорилирования выше в активном хроматине, чем в неактивном, что позволяет предполагать важную роль этого процесса в регуляции транскрипции [15, 16]. НМГ-белки входят в состав негистоновых белков, растворимых в 0,35 М NaCl [15]. Мы показали, что при удалении этой фракции фосфорилирование белков хроматина из коры головного мозга крыс снижалось в 5 раз (с  $51 \pm 2$  до  $10 \pm 1,2$  пмоль/мг белка·мин). Стимулирующий эффект этимизола на синтез РНК также исчезал при экстракции белков 0,35 М NaCl. Поэтому мы сосредоточили основное внимание при изучении влияния антифеннов на фосфорилирование белков именно этой фракции. На долю белков, растворимых в 0,35 М NaCl, приходится 11% белков хроматина, а растворимые в 0,4 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (главным образом, гистоны) и прочно связанные белки составляли соответственно 47 и 42%. Наиболее высокой, как и следовало ожидать, оказалась степень фосфорилирования белков, экстрагируемых 0,35 М NaCl: она в 3 раза превышала фосфорилирование прочносвязанных белков и в 15 раз фосфорилирование гистонов (табл. 1). Изучение действия эти-

мизела на фосфорилирование различных фракций хроматина показало, что препарат, не влияя на интенсивность фосфорилирования гистонов и прочносвязанных белков, стимулирует этот процесс во фракции белков, экстрагируемых 0,35 М NaCl: при концентрации  $10^{-5}$  М фосфорилирование достоверно возрастало на 25%.

Таблица 1

Действие этимизола на уровень эндогенного фосфорилирования белков хроматина нейронов головного мозга крыс в присутствии [ $^{32}$ P]АТР (приведены средние результаты 3 опытов)

Исследуемая фракция	Контроль	Уровень эндогенного фосфорилирования или мин. мг белка · мин · $10^{-6}$ . Этимизол, М		
		$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$
0,35 М NaCl-растворимые белки	$2,30 \pm 0,13$	$2,51 \pm 0,17$ $p > 0,05$	$2,85 \pm 0,15$ $p < 0,01$	$2,19 \pm 0,18$
0,4 М H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -растворимые белки	$0,150 \pm 0,006$	$0,160 \pm 0,005$	$0,160 \pm 0,008$	$0,160 \pm 0,007$
Прочносвязанные белки	$0,86 \pm 0,02$	$0,70 \pm 0,015$	$0,83 \pm 0,01$	$0,81 \pm 0,02$

С помощью электрофореза в ПААГ в присутствии ДДС-Na мы попытались определить, какие именно белки хроматина ответственны за стимуляцию процесса фосфорилирования при действии этимизола. Определение радиоактивности разных по электрофоретической подвижности белков исследуемых препаратов хроматина нейронов показала, что метка включается, главным образом, в наиболее высокоподвижные белки, а значительное снижение степени фосфорилирования при экстракции белков 0,35 М NaCl происходит, в основном, за счет именно этой фракции (рис. 1). Обнаружено, что, как и при разделении суммарных белков хроматина, низкомолекулярные белки ( $\sim 10$  кД) обладают наиболее высоким уровнем фосфорилирования (рис. 2). Этимизол увеличивал фосфорилирование белков хроматина также за счет этой высокоподвижной электрофоретической фракции на 12,5% (рис. 2, а). Как мы уже упоминали, часть белков, экстрагируемых 0,35 М NaCl, относится к группе НМГ-белков, характерными особенностями которых являются растворимость в 2%-ной ТХУ, низкая величина  $M_r$ , высокая подвижность при электрофорезе [15]. Анализ той части 0,35 М NaCl-экстрагируемых белков, которые растворимы в 2%-ной ТХУ, показал, что они наиболее отчетливо выявляются при электрофорезе в ПААГ на месте расположения высокоподвижной зоны (рис. 3). Интересно отметить и тот факт, что окраску на гликопротеиды дали белки этой же низкомолекулярной фракции (рис. 3), а в последнее время появились сведения, что НМГ-белки являются гликопротеидами [17]. Вопрос о возможной идентичности выявленных фракций с белками НМГ будет решен в ходе дальнейших исследований по выделению и изучению их аминокислотного состава

Эндогенное фосфорилирование белков хроматина представляет собой суммарный процесс, осуществляемый сАМР-независимыми протеинкиназами (ПКазами) I и II [18]. Действительно, и в наших опытах сАМР ни в одной концентрации ( $10^{-6}$ — $10^{-3}$  М) не влиял на эндогенное фосфорилирование белков хроматина из нейрональных клеток коры

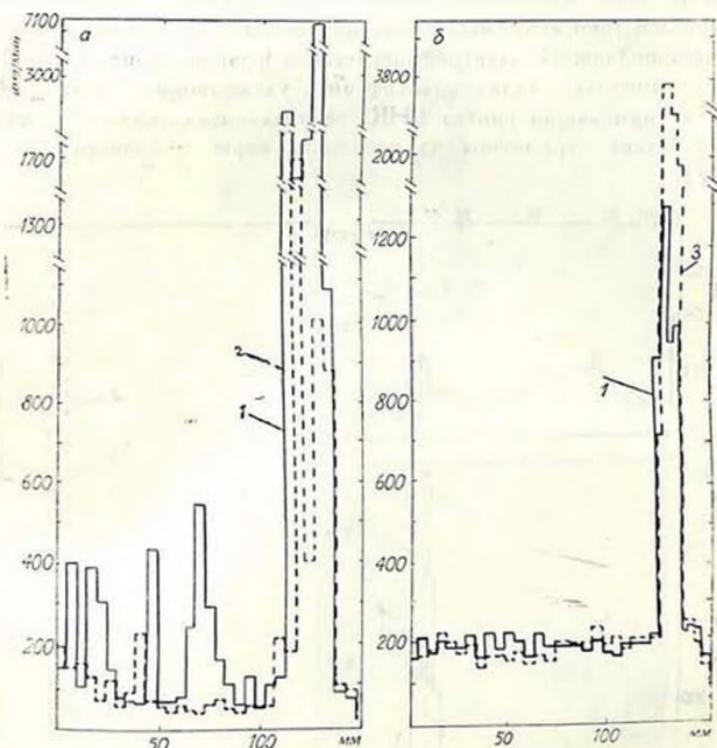


Рис. 1. Электрофоретическое разделение фосфорилированных белков хроматина из нейронов коры головного мозга крысы: а—в присутствии  $[^{33}\text{P}]\text{АТР}$ , б—в присутствии  $[^{33}\text{P}]\text{GTP}$ . 1—хроматин (контроль); 2—хроматин после экстракции белков 0,35 М  $\text{NaCl}$ ; 3—хроматин после фосфорилирования в присутствии  $10^{-5}$  М этимизола. По оси абсцисс—длина геля в мм. Представленные на рисунках результаты являются наиболее типичными в среднем из 3 независимых электрофоретических разделений каждого препарата

головного мозга крысы. ПКазы II, в отличие от ПКазы I, в качестве донора фосфата способна в равной степени использовать не только АТР, но и GTP [19]. Чтобы выяснить, какая из этих ПКаз активировалась этимизолом, мы заменили в инкубационной среде  $[^{33}\text{P}]\text{АТР}$  на  $[^{33}\text{P}]\text{GTP}$  (такие условия специфичны для измерения ПКазы II [19]). При этом стимулирующий эффект этимизола на фосфорилирование 0,35 М  $\text{NaCl}$ -растворимых белков возрос в  $\frac{1}{4}$  раза: в концентрации  $10^{-5}$  М он увеличивал интенсивность фосфорилирования на 90% (табл. 2). Столь значи-

тельно увеличение активации, вероятно, объясняется тем, что в присутствии АТР эффект этимизола мог в значительной степени маскироваться участием в фосфорилировании нечувствительной к препарату ПКазы I, активность которой в ткани мозга в 1,5 раза превышает активность ПКазы II [18]. Увеличение уровня фосфорилирования в присутствии ГТР при действии этимизола также происходило за счет низкомолекулярной высокоподвижной электрофоретической фракции (рис. 1, 2). В отличие от этимизола, аллиланрантифени, ухудшающий долговременную память и тормозящий синтез РНК, не увеличивал скорость фосфорилирования белков хроматина из нейронов коры головного мозга крыс (табл. 2).

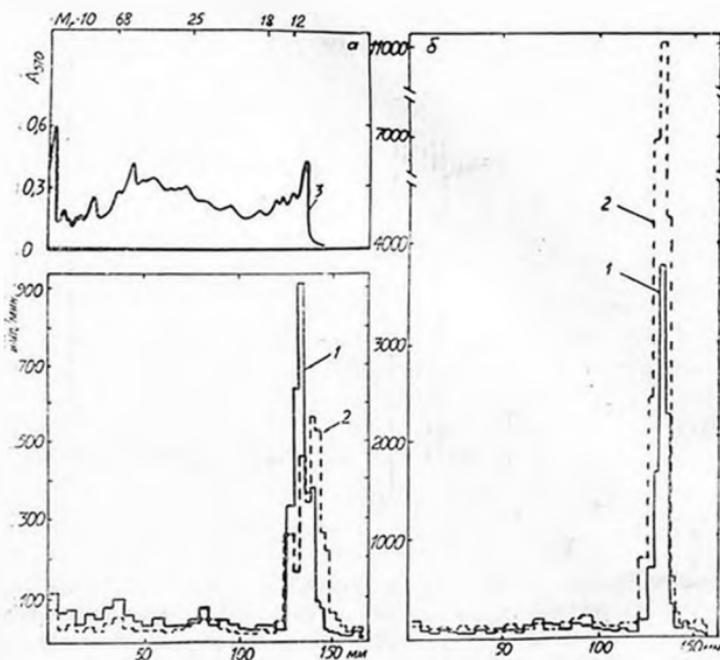


Рис. 2. Радиоактивность белковых электрофоретических компонентов 0,35 М NaCl-растворимой фракции после фосфорилирования хроматина нейронов: а—в присутствии  $[^{33}\text{P}]\text{АТР}$ , б—в присутствии  $[^{33}\text{P}]\text{ГТР}$ . 1—контроль (30 мкг белка); 2—влияние этимизола (10-5); 3—денситограмма электрофореза (на верхней абсциссе величина  $M_r$  стандартных белков в кД): бычий сывороточный альбумин—68, химотрипсिनоген—25, миоглобин—17,8, цитохром—12,3.

Полученные результаты дают основание предполагать, что наиболее вероятной молекулярной мишенью действия этимизола на хроматин является ядерная ПКазы II, которая преимущественно фосфорилирует наиболее высокоподвижные белки группы НМГ [15, 20]. Поскольку удаление из хроматина растворимых в 0,35 М NaCl белков полностью снимает стимулирующий эффект этимизола на его матричную активность,

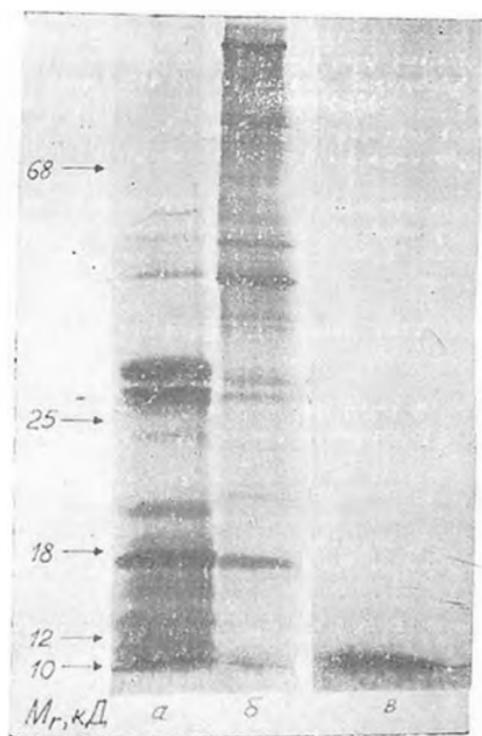


Рис. 3. Электрофореграмма белков 0,35 М NaCl-фракции, растворимых в 2%-ной ТХУ (а); 0,35 М NaCl-экстрагируемых белков хроматина (450 мкг белка) (б); окраска 0,35 М NaCl-растворимых белков на гликопротеиды (в). Цифры у стрелок—величина  $M_r$  маркеров

очевидно, этот эффект связан с активацией сАМР-независимой ПКазы II. Принято считать, что действие нейромедиаторов и других нейроактивных веществ на синтез РНК реализуется через сАМР- и сGMP-зависимое фосфорилирование белков хроматина [4]. Однако наши данные показывают, что активация синтеза РНК таким нейроактивным препаратом,

Таблица 2

Влияние антифеинов на эндогенное фосфорилирование 0,35 М NaCl-растворимой фракции белков хроматина нейронов в присутствии  $[^{32}\text{P}]\text{GTP}$  (приведены средние результаты 3 опытов;  $\text{M} \pm \text{m}$ )

Исследуемый препарат	Контроль	Уровень эндогенного фосфорилирования имп/мин/мг белка $\cdot \text{мин} \cdot 10^{-6}$ , Этимизол, М		
		$10^{-6}$	$10^{-5}$	$10^{-4}$
Этимизол	$2,98 \pm 0,13$	$0,19 \pm 0,42^*$ +41% $p < 0,05$	$5,63 \pm 0,71^*$ +90% $p < 0,01$	$4,10 \pm 0,60^*$ +38% $p < 0,05$
Аллилнорантифеин	$2,84 \pm 0,34$	$2,83 \pm 0,27$	$2,81 \pm 0,11$	$2,79 \pm 0,20$

Примечание. \* $p < 0,05$ .

как этимизол, стимулирующим память, может быть опосредован сАМР-независимой системой фосфорилирования хромосомных белков. Это может находить свое выражение и в изменении функциональной активности ЦНС, в частности в процессе сохранения следа памяти.

## EFFECTS OF ANTIFEINES ON ENDOGENOUS PROTEIN PHOSPHORYLATION IN RAT BRAIN CHROMATIN

KULIKOVA O. G., BOGDANOVA N. A., RAZUMOVSKAYA N. I.

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

Stimulant of long-term memory ethylnorantifeine (ethymizol), that activates RNA synthesis in brain neurons, selectively increases the rate of endogenous phosphorylation of chromatin proteins soluble in 0,35 M NaCl. This increase was mainly due to the phosphorylation of low-M<sub>r</sub> (10 kD) proteins with high electrophoretic mobility. Allyl-norantifeine, the analog of ethymizol, exerting no positive effects on memory or RNA synthesis, did not change the phosphorylation of chromosomal proteins. The activation of сАМР-independent chromatin protein kinase II of neurons by ethymizol has been demonstrated. It is proposed that memory effects of antifeines are related to their action on RNA synthesis occurring through сАМР-independent system of chromosomal protein phosphorylation.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Белявцева Л. М., Борисова Г. Ю., Рейхардт Б. А., Куликова О. Г.—В кн.: Актуальные вопросы фармакологии и токсикологии нейротропных средств, с. 16—19, Рига, РМИ, 1986.
2. Белявцева Л. М., Куликова О. Г., Разумовская Н. И., Бородин Ю. С. Докл. АН СССР, т. 283, с. 490—492, 1985.
3. Северин Е. С., Кочеткова М. Н. Роль фосфорилирования в регуляции класточной активности, с. 1—287, М., Наука, 1985.
4. Микеладзе Д. Г. Циклические нуклеотиды, кальций и протеинкиназные реакции в нервной ткани, с. 1—183, Тбилиси, Мецниереба, 1983.
5. Nestler E. G., Greengard P. Nature, v. 305, p. 583—588, 1983.
6. Витвицкий В. Н. Журн. общ. биол., т. 64, с. 83—93, 1983.
7. Löttrup-Rein H., McEwen B. J. Cell Biol., v. 30, p. 405—415, 1966.
8. Куликова О. Г., Белявцева Л. М., Разумовская Н. И., Бородин Ю. С. Нейрохимия, т. 4, с. 3—9, 1985.
9. Буракова Т. А., Корж В. П., Шостакович Н. А., Нейфах А. А. Молекуляр. биология, т. 14, с. 922—927, 1980.
10. Sahyoun N., LeVine H., Bronson D., Cuatrecasas P. J. Biol. Chem., v. 259, p. 9341—9344, 1984.
11. Laemmli U. K. Nature, v. 227, p. 680—685, 1970.
12. Bhorjee J. S. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci., v. 78, p. 6944—6948, 1981.
13. Маурер Г.—В кн.: Диск-электрофорез (под ред. Е. Д. Левина, с. 94—95, М., Мир, 1971.
14. Lowry O. H., Rosebrough J. N., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
15. HMG chromosomal proteins (ed. E. W. Johns), p. 1—257, London—N. Y., Academic Press, 1982.
16. Saffer J. D., Glazer R. I. J. Biol. Chem., v. 257, p. 4655—4663, 1982.
17. Reeves R., Chang D. J. Biol. Chem., v. 258, p. 679—687, 1983.
18. Yutani Y., Tei Y., Yukioka M., Inoue A. Arch. Biochem. and Biophys., v. 218, p. 409—420, 1982.
19. Friedman D. L., Kleiman N. J., Capony J. P. Biochim et biophys. acta, v. 847, p. 165—176, 1985.
20. Linnala-Kankkunen A., Palvimo J., Maenpaa P. H. Biochim. et biophys. acta, v. 799, p. 122—127, 1984.

Поступила 17. XII 1987

УДК 616.89—008.441—12.577.1.612.015

ВЛИЯНИЕ ПИРАЦЕТАМА НА ВКЛЮЧЕНИЕ МЕЧЕНЫХ  
АМИНОКИСЛОТ В БЕЛКИ МОЗГА ЖИВОТНЫХ,  
ПЕРЕНЕСШИХ ВНУТРИУТРОБНЫЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ  
ЭТИЛОВОГО АЛКОГОЛЯМАГИЗЕЛИС М. Я., ЗАБАУДОВСКИЙ А. Л., ШИХОВ С. Н.  
НИИ психиатрии МЗ РСФСР, Москва

Исследованы показатели белкового метаболизма в мозгу пренатально алкоголизированных крыс, получавших в раннем постнатальном периоде курс пирацетама (500 мг/кг). В возрасте 3 месяцев у подопытных животных содержание суммарных и водорастворимых белков в отдельных структурах мозга снижается по сравнению с крысами, не получавшими препарата, уровень водонерастворимых белков в коре полушарий и гиппокампе возрастает. У крыс, получавших пирацетам, включение меченых аминокислот ( $^3\text{H}$ лейцин,  $^{35}\text{S}$ метионин) было значительно увеличено и водонерастворимых белках этих структур. В большинстве других отделов мозга показатели синтеза и содержание разных групп белков имеют тенденцию к нормализации. У подопытных крыс наблюдали также особенности поведенческих реакций и условнорефлекторной деятельности. Применение пирацетама способствует частичной компенсации нарушений функции и метаболизма мозга в результате пренатальной алкоголизации.

Многочисленными клиническими наблюдениями установлено повреждающее действие этилового алкоголя в антенатальном периоде на развивающийся мозг [1—3]. На экспериментальных моделях алкогольной эмбриопатии показаны нарушения функции, структуры, некоторых видов метаболизма мозга животных, подвергавшихся антенатальным воздействиям этанола [4—6].

Ранее нами показано, что у половозрелых крыс, подвергавшихся пренатальной алкоголизации, обнаруживаются существенные особенности белкового метаболизма—нарушения синтеза белков в структурах мозга. В суммарных белках они выявлялись лишь при интенсивных функциональных нагрузках. Такие изменения особенно характерны для водонерастворимой фракции белков и наиболее выражены в коре полушарий и гиппокампе [7, 8]. Наряду с этим, у подопытных крыс отмечены изменения спонтанного поведения и условнорефлекторной деятельности, чувствительности к судорожным агентам.

С целью коррекции отмеченных нарушений нами был использован

препарат из группы ноотропов—пирацетам. Известно, что препарат обладает противогипоксическим действием, облегчает процессы обучения, предохраняет от амнезии, вызванной различными патогенными факторами [9, 10]. Пирацетам нашел применение в клинике при лечении задержек психического развития и умственной отсталости в результате внутриутробной патологии [11, 12]. В последнее время он начал использоваться в комплексной терапии недоношенных новорожденных с гипоксическими и травматическими повреждениями мозга [13].

В литературе имеются данные о стимулирующем влиянии пирацетама на белковый метаболизм в мозгу. Под влиянием пирацетама возрастает содержание полирибосом, изменяется активность катепсина и лизосомных ферментов [14], увеличено содержание [15] и ускорен синтез РНК в мозгу [16]. Пирацетам способствовал увеличению включения меченого лейцина в ткань [14] и белки мозга [17, 18]. Действие препарата особенно эффективно в условиях экспериментальной патологии. После введения циклогексимида, вызывающего угнетение синтеза белка и РНК в мозгу, применение пирацетама нормализовало содержание ДНК и РНК в отдельных его структурах [15]. У половозрелых крыс, которым циклогексимид вводили в раннем постнатальном периоде, пирацетам улучшал показатели условнорефлекторной деятельности [19].

Приведенные данные позволили предположить, что пирацетам может оказаться эффективным для коррекции нарушений поведения и белкового метаболизма в мозгу животных, перенесших внутриутробные воздействия этанола.

### Материалы и методы

Крысам-самцам с 5 по 20 день беременности вводили желудочным зондом ежедневно 40%-ный раствор этанола (суточная доза 6—8 г/кг). Интактные животные получали изокалорийный раствор сахарозы. Новорожденные пренатально алкоголизированные крысы подопытной серии были разделены на 2 группы: одной группе с 5 по 30 день производили подкожные инъекции 20%-ного раствора пирацетама в дозе 500 мг/кг 5 раз в неделю, другой группе в те же сроки вводили физиологический раствор. Подопытные (получавшие пирацетам) и контрольные животные содержались в стандартных условиях вивария. В возрасте 3 месяцев после предварительного исследования ряда поведенческих тестов определяли интенсивность включения меченых аминокислот в белки разных структур мозга. Через 1 ч после внутрибрюшинного введения [<sup>3</sup>H]лейцина и [<sup>35</sup>S]метионина крысы декапитировали. Из навесок ткани коры полушарий, гиппокампа, стриатума, мозжечка, ствола, гипоталамуса после гомогенизации выделяли суммарные, водорастворимые и водонерастворимые белки, осаждали их 10% ТХУ с последующей сработкой 5% ТХУ, 96% этанолом, смесью этанол-эфир (1:3) и эфиром. Сухой белок обрабатывали трипсином и химотрипсином, гидролизат вносили в счетные флаконы со сцинтиллятором ЖС-8. Радиоактивность белков и ТХУ-супернатантов определяли на жидкостном сцинтилляционном счетчике

«Rack Beta» («ЛКВ», Швеция), рассчитывали их отношение как относительную У. А. белков. Содержание белка в ткани определяли по Лоури. Результаты исследований обрабатывали статистически по критериям Стьюдента и Вилкоксона-Манна-Уитни. В опытах использовано 40 беспородных белых крыс.

### Результаты и обсуждение

У подопытных крыс, перенесших пренатальную алкоголизацию и получавших пирацетам в постнатальном периоде, содержание разных групп белков в отделах мозга изменялось неодинаково. Уровень суммарных белков в большинстве структур мозга существенно не отличался как от контрольных животных, так и от алкоголизированных, не получавших пирацетама. По отношению к последней группе крыс лишь в мозжечке и стволе мозга содержание белков у опытных крыс было достоверно снижено (рис. 1, а).

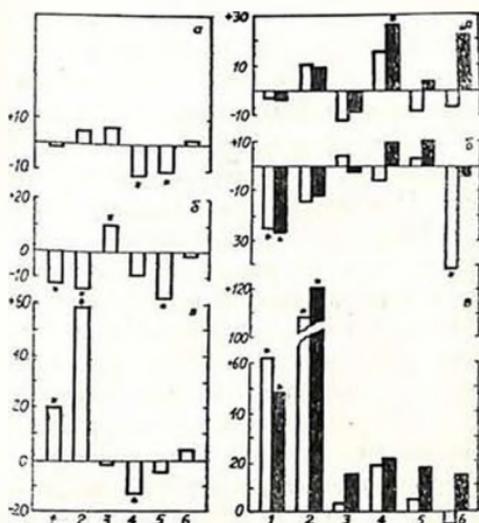


Рис. 1. Изменение содержания суммарных (а), водорастворимых (б) и водонерастворимых (в) белков мозга крыс, подвергавшихся пренатальной алкоголизации под влиянием пирацетама (в % к не получавшим препарата): 1—кора полушарий; 2—гиппокамп; 3—стриатум; 4—мозжечок; 5—ствол; 6—гипоталамус

Рис. 2. Изменение включения  $[^3\text{H}]$ лейцина ( $\square$ ) и  $[^{35}\text{S}]$ метионина ( $\blacksquare$ ) в белки мозга пренатально алкоголизированных крыс, получавших пирацетам. Обозначения те же, что и на рис. 1

Количество водорастворимых белков в ряде отделов (кора, гиппокамп, ствол) также было уменьшено ( $p < 0.05$ ) и возросло лишь в подкорковых отделах (рис. 1, б). Наиболее выраженные изменения характерны для водонерастворимых белков. Их уровень был увеличен в

коре полушарий (на 21%) и гиппокампе (на 50%). Вместе с тем, содержание белков в мозжечке было снижено, а в остальных исследованных структурах не изменено. Аналогичного характера изменения уровня водонерастворимых белков в структурах мозга у крыс, получавших пиррацетам, отмечены и по отношению к интактным животным: в коре полушарий содержание белков было увеличено на 34%, в гиппокампе на 49%. В других отделах мозга приближалось к значениям контрольной серии.

На рис. 2 показаны особенности включения [ $^3\text{H}$ ]лейцина и [ $^{35}\text{S}$ ]метионина в белки 6 структур мозга у пренатально алкоголизированных крыс, получавших в постнатальном периоде пиррацетам, по отношению к подопытным животным, которым препарат не вводили. Как видно из приведенных данных, изменения синтеза суммарных белков (рис. 2, а) в ряде структур были невелики и лишь в мозжечке и гипоталамусе включение [ $^{35}\text{S}$ ]метионина было достоверно увеличено. Аналогичная тенденция для обоих предшественников отмечена в гиппокампе.

При раздельном исследовании синтеза белков в водорастворимой и водонерастворимой фракциях было показано, что изменения включения меченых предшественников в белки этих структур существенно отличались. Так, в водорастворимых белках коры полушарий включение обеих аминокислот было достоверно снижено (в опытах с [ $^3\text{H}$ ]лейцином и в гипоталамусе). Аналогичные, но менее выраженные сдвиги наблюдали также в гиппокампе. Изменения синтеза водонерастворимых белков носили иной характер (рис. 2, в). У подопытных животных, получавших пиррацетам, обращает внимание резкая активация включения меченых аминокислот в белки коры полушарий и гиппокампа. При этом в неокортексе такая активация составляла 48—63%, а в гиппокампе 109—130% по сравнению с крысами, подвергавшимися пренатальной алкоголизации без применения пиррацетама, то есть включение аминокислот в белки этих структур было увеличено более чем в 1,5—2 раза. Почти в такой же степени по отношению к интактным животным возрастало включение предшественников в водонерастворимые белки коры полушарий, а в гиппокампе активация составляла 96—115%. В остальных структурах она была значительно менее выражена. При этом в большей степени возрастало включение в белки [ $^{35}\text{S}$ ]метионина. В гипоталамусе изменения синтеза водонерастворимых белков были наименее значимы.

Результаты опытов показывают, что применение пиррацетама в раннем постнатальном периоде у пренатально алкоголизированных крыс существенно отражается на состоянии белкового метаболизма в мозгу. У крыс, получавших пиррацетам, содержание и показатели синтеза разных групп белков (особенно суммарных и водорастворимых) в ряде церебральных структур приближались к величинам, характерным для контрольной группы, то есть наблюдалась тенденция к их нормализации. Наряду с этим, под влиянием препарата отмечена значительная активация синтеза водонерастворимых белков, которая была наиболее значи-

тельной в гиппокампе и коре полушарий. Содержание белков в указанных структурах также было увеличено.

Приведенные факты заслуживают особого внимания в свете установленных нами ранее особенностей метаболизма белков в мозгу у крыс, перенесших воздействие этанола в антенатальном периоде. Как было показано [7, 8], у подопытных животных нарушения синтеза белков отмечались преимущественно в водонерастворимой их фракции и были наиболее выражены в гиппокампе и неокортексе. Поэтому нам представляется, что селективная активация синтеза этой фракции белков в указанных отделах мозга под влиянием пирацетама является одним из важных звеньев в механизме его терапевтического действия.

Как видно из полученных результатов, влияние пирацетама на метаболизм белков мозга обнаруживается в отдаленном периоде спустя 2 месяца по окончании курса его применения. Хотя механизм отставленного действия препарата на белковый метаболизм в мозгу пренатально алкоголизированных крыс еще не вполне ясен, можно предполагать, что существенное значение при этом имеют антигипоксические свойства пирацетама [9, 10]. В механизме повреждающего действия этанола на развивающийся мозг определенная роль принадлежит тканевой гипоксии, которую многие авторы рассматривают как общее звено для ряда патогенных факторов в антенатальном периоде.

В последнее время получены данные, указывающие на способность пирацетама угнетать процессы свободнорадикального перекисного окисления [20]. Это свойство препарата, по-видимому, является одним из компонентов его антигипоксического действия. Нарушения перекисного окисления липидов и энергетического обмена могут отражаться на энергозависимых процессах белкового синтеза. Поэтому надо полагать, что в механизме активирующего действия пирацетама на показатели белкового метаболизма мозга определенная роль принадлежит угнетению препаратом процессов перекисного окисления липидов и нормализации энергетического обмена.

Изменения белкового метаболизма в мозгу подопытных крыс, получавших пирацетам, отражались и на поведенческих реакциях: наблюдали увеличение двигательной активности, более быстрое угашение двигательных реакций, изменения других показателей спонтанного поведения. Отмечались также особенности условнорефлекторной деятельности, в частности, улучшение сохранения условного рефлекса активного избегания. Эти данные соответствуют современным представлениям о ключевой роли синтеза белков в мозгу в осуществлении высших интегративных функций—обучения и памяти [21, 22].

Нам представляется, что активация белкового метаболизма в структурах мозга, вызванная применением пирацетама, может в известной мере способствовать компенсации нарушений функции и метаболизма мозга, вызванных пренатальной алкоголизацией.

# INFLUENCE OF PYRACETAM ON BRAIN PROTEIN METABOLISM IN ANIMALS WITH PRENATAL EXPOSURE TO ETHANOL

MAIZELIS M. Ya., ZABLUDOVSKY A. L., SHIKHOV S. N.

Institute of Psychiatrics, Moscow

Specificity of brain protein metabolism in rats with prenatal exposure to alcoholization, subjected to a course of pyracetam treatment (500 mg/kg) in early postnatal period, has been studied. In such animals at the age of 3 months the levels of total and water-soluble proteins in isolated brain structures reduced, while those of the water-insoluble proteins in cortex and hippocampus increased significantly compared with non-premedicated animals. Increase in trace amino acids inclusion into water-insoluble proteins of these structures in experimental animals has been detected. Changes in the brain protein metabolism influence the behavioral reactions and conditioned reflex activity in rats.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бадалян Л. О., Мاستюкова Е. М. Журн. невропатол. и психиатрии, т. 86, с. 1448—1454, 1986.
2. Куниковская Л. С. Журн. невропатол. и психиатрии т. 80, № 3, с. 417—422, 1980.
3. Усова Е. В., Сазонова Н. С., Рассадина Э. А. Журн. невропатол. и психиатрии, т. 81, № 10, с. 152—155, 1981.
4. Попова Э. Н. Журн. невропатол. и психиатрии, т. 83, № 7, с. 1053—1056, 1983.
5. Скосырева А. М., Смольникова Н. М. Фармакол. и токсикология, т. 6, с. 66—68, 1982.
6. Collangelo W., Jones D. G. Progress in neurobiol., v. 19, № 3, p. 271—314, 1982.
7. Майзелис М. Я., Заблудовский А. Л., Шихов С. Н. Нейрохимия, т. 2, № 3 с. 288—295, 1983.
8. Майзелис М. Я., Заблудовский А. Л., Шихов С. Н. Журн. невропатол. и психиатрии, т. 83, с. 74—79, 1983.
9. Машковский М. Д. Сб. научных трудов ВНИХФИ, вып. 9, с. 110—120, 1982.
10. Островская Р. У.—В сб.: Антидепрессанты и ноотропы, т. 101, с. 101—113, Л., Труды Ленинградского НИИ психоневрологии, 1982.
11. Аарудкая И. Г., Бармин В. В.—В кн.: Вопросы психофармакологии, т. 74, с. 225—230, М., Труды Московского НИИ психиатрии, 1976.
12. Fiegel G. Fortschr. med., v. 93, № 25, p. 1183—1186, 1975.
13. Стреланова В. А., Лобзин В. С., Макарова Э. К., Гаврилова Т. К. Журн. невропатол. и психиатрии, т. 86, № 10, с. 1463—1466, 1986.
14. Platt D., Hering H., Hering F. Arzneimittelforsch., v. 24, № 10, p. 1588—1590 1974.
15. Kubik V., Benesova O., Pavlik A. Activ. nerv. super., v. 23, № 1, p. 51—53, 1981.
16. Тунсва С., Тенчева Ц., Тютюлкова Н., Николова М. Мед.-биол. информация, вып. 6, с. 22, 1980.

17. Тунсва С., Темсва Ц. Мед.-биол. информация, вып. 6, с. 8, 1980.
18. Nickolsen V. I., Wolthius O. L. Biochem. pharmacol., v. 25, p. 2224—2244, 1976.
19. Буров Ю. В., Островская Р. У., Смольникова Н. М., Трфимов С. С., Молодацкий Г. М. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 51, № 4, с. 447—449, 1986.
20. Гукасов В. М., Расулов М. М., Ефуни С. Н. Бюл. эксперим. биол. и мед., № 6, с. 683—685, 1987.
21. Hyden H., Lange P. Science, v. 159, p. 1370—1373, 1968.
22. Крузликос Р. И. Нейрохимические механизмы обучения и памяти, М., Наука, 1981.

Поступила 14. XII 1987

## В ИЗДАТЕЛЬСТВЕ «НАУКА»

готовится к печати в 1989 г. монография Демина Н. Н., Шортановой Т. Х. и Эмирбекова Э. Э. «Нейрохимия зимней спячки млекопитающих» (План выпуска литературы на 1989 г., кн. 2, Естественно-научная литература, № 618), около 10 п. л., библиограф.—275 назв.

В монографии впервые с большой полнотой сведены литературные данные и результаты собственных исследований авторов в области биохимических процессов в головном мозгу при зимней спячке млекопитающих. Рассмотрены сдвиги содержания и метаболизма нейромедиаторов (и нейромодуляторов), белков, РНК, низкомолекулярных азотистых метаболитов, липидов и биоэнергетических субстратов, активности соответствующих ферментов. Описана сложная динамика этих изменений по ходу спячки. Подчеркнуто отличие такого естественно регулируемого гипобоза млекопитающих от пассивного холодового оцепенения холоднокровных животных. Намечены перспективные направления дальнейших нейрохимических исследований зимней спячки.

Книга предназначена для специалистов-нейрохимиков, нейрофизиологов, нейрофармакологов, а также всех биологов, интересующихся цирканнуальными процессами жизнедеятельности и адаптационными механизмами.

Предварительные заказы (со ссылкой на № 618 указанного выше плана издательства «Наука» на 1989 г.) можно направлять по адресу: 197345, г. Ленинград-345; Петрозаводская ул., 7; магазин «Книга-почтой» Северо-западной конторы «Академкнига» (ориент. цена—1 р. 60 к.).



УДК 577.157:577.152

ОСОБЕННОСТИ МАО МОЗГА СЕРЕБРИСТО-ЧЕРНЫХ  
ЛИСИЦ С НАСЛЕДСТВЕННО ЗАКРЕПЛЕННОЙ  
НИЗКОЙ АГРЕССИВНОСТЬЮ

ВОЙТЕНКО Н. Н., САВИНКОВА А. К., МОСКВИТИНА Т. А., ГОРКИН В. Э.

Институт цитологии и генетики СО АН СССР, Новосибирск;  
\*Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

С применением метода колоночной хроматографии на аффинном сорбенте АН-сефароза-4В проведено сравнительное исследование препаративно разделяемых множественных форм МАО (I, II $\alpha$ , II $\beta$ , III) солюбилизованных митохондриальных фракций гомогенатов стволовой части мозга животных, существенно различающихся по особенностям поведения: диких лисиц промышленной популяции и ручных лисиц, селекционированных на отсутствие агрессии к человеку. По сравнению с дикими лисицами, у ручных лисиц обнаружена убыль МАО-III при одновременном нарастании суммарной МАО-II ( $\alpha$  и  $\beta$ ) головного мозга. Предполагается возможное участие множественных форм МАО головного мозга (МАО-II, МАО-III) в регуляции поведения животных.

Ранее были получены указания на существование в тканях головного мозга быка [1] и человека [2] ряда множественных форм МАО (КФ 1.4.3.4), обозначенных символами I, II $\alpha$ , II $\beta$ , III. По субстратной специфичности [3] и чувствительности к действию ингибиторов [4] эти формы МАО, полученные в очищенном от балластных белков виде, не идентичны постулируемому общепринятой «бинарной» классификацией МАО типов А и Б [5]. Нарушения функций ЦНС, например, при шизофрении, приводят к существенному изменению ряда физико-химических и каталитических свойств МАО-II $\beta$  головного мозга человека [6, 7]. В тканях головного мозга людей, которые при жизни страдали шизофренией, МАО-III либо отсутствовала полностью, либо была резко (в среднем, на 75%) снижена по сравнению с головным мозгом людей, не страдавших психическими заболеваниями [8].

Известно, что процессы метаболизма биогенных аминов и активность непосредственно участвующих в этих процессах ферментов (в частности МАО) значительно изменяются в зависимости от особенностей поведения человека [9] и животных [10—13].

Целью настоящей работы было исследование множественных форм МАО (I, II $\alpha$ , II $\beta$ , III) головного мозга животных, существенно различающихся между собой по особенностям поведения. Поскольку моде-

лирование патологических форм поведения у животных, обычно используемых в биохимических лабораториях, сопряжено с большими трудностями [14], в наших экспериментах были проведены сравнительные исследования MAO митохондриальных фракций стволовой части головного мозга диких лисиц, котрым свойственно агрессивное поведение по отношению к человеку, и ручных (доместицированных) лисиц с генетически детерминированным отсутствием агрессии по отношению к человеку [11, 12]. Ранее у доместцированных лисиц, по сравнению с лисицами, агрессивными по отношению к человеку, было отмечено снижение серотониндезаминазной активности в тканях мозга [13].

### Материалы и методы

Работа была проведена на 9-месячных самцах серебристо-черных лисиц, четко различающихся по их отношению к человеку. В первую группу были включены ручные животные, селекционированные на протяжении 25 поколений на отсутствие агрессивной реакции по отношению к человеку. Во вторую группу были включены дикие, полученные из промышленной популяции животные, которые не были селекционированы на отсутствие агрессивной реакции по отношению к человеку.

Митохондриальную фракцию гомогената ствола головного мозга, извлеченного через 5—10 мин после умерщвления животных, получали путем дифференциального центрифугирования [15]. Осадки митохондрий промывали 0,01 М  $K^+$ ,  $Na^+$ -фосфатным буфером, pH 7,4, и хранили при  $-20^\circ$ . В каждом эксперименте (2—с дикими и 3—с ручными лисицами) использовали объединенные митохондриальные фракции гомогенатов ствола головного мозга 6 особей.

Солюбилизацию мембраносвязанных MAO осуществляли обработкой суспензии митохондриальных фракций (10 мг белка в 1 мл; 0,01 М  $K^+$ ,  $Na^+$ -фосфатный буфер, pH 7,4) смесью неионного детергента тритон X-100 («Serva», ФРГ) и мочевины (конечные концентрации 1,3% и 1,3 М соответственно) в течение 30 мин при  $2^\circ$  с последующим центрифугированием (4000 g, 60 мин) и отделением осадка [1]. Разделение множественных форм MAO проводили путем колоночной хроматографии на биоспецифическом сорбенте АН-сефарозе-4В («Pharmacia», Швеция), при скорости элюции 60 мл/ч. После промывания 0,01 М  $K^+$ ,  $Na^+$ -фосфатным буфером pH 7,4 колонки (К-16/40, «Pharmacia», Швеция), содержащей 60 мл сорбента, на который наносили 60 мг белка, элюировали MAO-I при помощи 0,1 М  $K^+$ ,  $Na^+$ -фосфатного буфера, pH 7,4, MAO-II (MAO-II $\alpha$  и MAO-II $\beta$ ) элюировали 0,1 М  $K^+$ ,  $Na^+$ -фосфатным буфером, pH 7,4, и градиентом концентрации тритона X-100 (от 0 до 0,25%). MAO-III элюировали 0,4 М  $K^+$ ,  $Na^+$ -фосфатным буфером, pH 7,4, и 0,25%-ным тритоном X-100 [1]. В собранных фракциях (по 5 мл) определяли содержание белка [16] с поправками на присутствие неионного детергента в пробах), а также активность MAO с 4-нитрофенилэтиламиноом·HCl (отечественного производства) в качестве

субстрата. Пробы (конечный объем 3 мл), содержавшие  $K^+$ ,  $Na^+$ -фосфатный буфер, рН 7,4—0,22 ммоль, тритон X-100—75 мг, субстрат  $5 \cdot 10^{-5}$  М, инкубировали при 37° в течение 30—60 мин. Единицей активности MAO считали такое количество фермента, в присутствии которого отмечали повышение оптической плотности при 450 нм на 0,01 ( $l = 10$  мм), что соответствует освобождению 1 нмоль аммиака на пробу за время инкубации [1, 5].

### Результаты и обсуждение

Судя по величинам У. А. MAO, в исходной митохондриальной фракции гомогената стволовой части мозга ручных лисиц скорость дезаминирования 4-нитрофенилэтиламина в среднем на 20% ниже, чем скорость этой реакции в митохондриях стволовой части мозга диких лисиц (таблица).

Таблица

Множественные формы MAO в стволовой части мозга диких ( $n = 12$ ; над чертой) и ручных ( $n = 18$ ; под чертой) лисиц

Фракции	Общий объем, мл	Белок, мг/общий объем	Активность MAO		
			ед/общий объем	ед/мг белка	ед/мл
Митохондрии	80,5	841	16462	19,5	204,5
	62,6	768	11956	15,5	191
Солюбилизованная MAO	43,5	103	2044	17,9	47
	45,6	155	1232	10,9	27
MAO-II (x-3)	55	4,8	277	57,7	5,0
	70	6,0	333	87,5	7,6
MAO-III	50	5,5	1290	236,7	25,8
	42	5,6	564	100,2	13,3

Полученные данные согласуются с результатами исследований активности MAO головного мозга серебристо-черных лисиц при селекции по поведению [12]. В этих исследованиях было отмечено, что у ручных лисиц, по сравнению с дикими, скорость дезаминирования серотонина была снижена в среднем на 17,5%, а бензиламина—на 35%.

Использование методики препаративного разделения множественных форм митохондриальных MAO головного мозга путем хроматографирования солюбилизованных митохондриальных фракций на колонке с аффинным сорбентом АН-сефароза-4В позволило не только подтвердить данные, полученные в экспериментах с нефракционированными митохондриальными фракциями, но и получить совершенно новую информацию. Так, сопоставление величин У. А. MAO-III у диких и ручных животных указывает на снижение скорости дезаминирования 4-нитрофенилэтиламина у ручных лисиц в среднем на 57%. Но наиболее разительное отли-

чисе MAO головного мозга диких и ручных лисиц, которое не могло быть обнаружено без препаративного разделения множественных форм MAO, было установлено путем сопоставления общей активности фермента во фракциях MAO-III и MAO-II ( $\alpha$  и  $\beta$ ) (таблица). Если у диких лисиц соотношение MAO-III/MAO-II было равно в среднем 4,65, то у ручных лисиц эта величина составляла в среднем 1,06.

Во фракции MAO-I ни у диких, ни у ручных лисиц в опытах с 4-нитрофенилэтиламином в качестве субстрата ферментативной активности обнаружить не удалось. Ранее подобные результаты были получены при исследованиях MAO-I стволовой части мозга быка [3] и человека [2].

Таким образом, у ручных лисиц в солюбилизированном препарате митохондриальных MAO была обнаружена значительно более высокая активность MAO-III (почти в 5 раз), чем MAO-II, хотя содержание белка во фракции MAO-III лишь в 1,14 раз выше, чем в MAO-II.

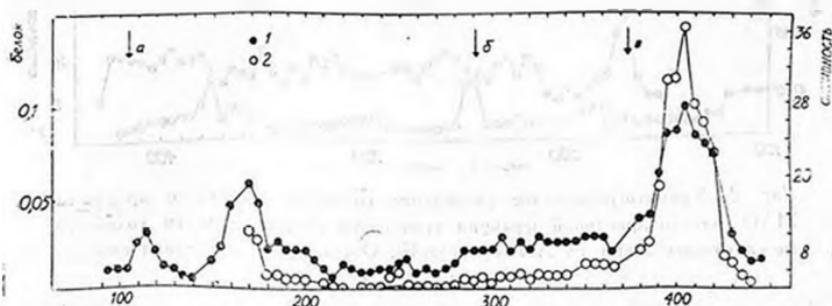


Рис. 1. Хроматографическое разделение солюбилизированного препарата MAO митохондриальной фракции гомогената стволовой части головного мозга диких лисиц на АН-сефарозе-4В. По оси абсцисс—номера фракций; по оси ординат: слева—содержание белка, мг/мл (●); справа—активность MAO; субстрат: 4-нитрофенилэтиламин, ед/мл (○). Стрелками указаны моменты начала элюции: а—0,1 М  $K^+$ ,  $Na^+$ -фосфатным буфером, рН 7,4 и градиентом концентрации тритона X-100 от 0 до 0,25% (MAO-II;  $\alpha$  и  $\beta$ ); б—0,1 М  $K^+$ ,  $Na^+$ -фосфатным буфером рН 7,4 и 0,25% тритоном X-100; в—0,4 М  $K^+$ ,  $Na^+$ -фосфатным буфером, рН 7,4 и 0,25% тритоном X-100 (MAO-III). Представлены результаты опыта с объединенным материалом от 6 лисиц

Эту закономерность подтверждают опыты, представленные на рис. 1 и 2. На хроматограмме солюбилизированного препарата MAO митохондриальной фракции гомогената стволовой части головного мозга диких лисиц (рис. 1) при измерениях содержания белка были обнаружены отчетливо выраженные пики, соответствующие фракциям MAO-II ( $\alpha$  и  $\beta$ ) и MAO-III, при этом активность MAO была сосредоточена преимущественно в MAO-III. На хроматограмме солюбилизированного препарата MAO митохондриальной фракции гомогената стволовой части головного мозга ручных лисиц (рис. 2) белковый пик, соответствующий MAO-III, не был выражен; активность MAO была представлена во фракциях MAO-II ( $\alpha$  и  $\beta$ ) и MAO-III в приблизительно равной мере.

Таким образом, изменения особенностей поведения (доместикации) животных сопровождались как снижением активности MAO-III, так и повышенным суммарной активностью MAO-II ( $\alpha$  и  $\beta$ ). Снижение активности MAO-III было отмечено ранее [8] при сравнительных исследованиях разделяемых методом колоночной аффинной хроматографии на АН-сефарозе-4В митохондриальных MAO головного мозга людей, страдавших, по данным Института клинической психиатрии ВЦ психического здоровья АМН СССР, шизофренией, в сопоставлении с MAO головного мозга людей, у которых при жизни не были диагностированы психические заболевания. Одновременное повышение суммарной активности MAO-II ( $\alpha$  и  $\beta$ ) у животных, характер поведения которых был коренным образом изменен в результате селекции на отсутствие оборонительной реакции на человека [12], обнаружено нами в настоящей работе впервые.

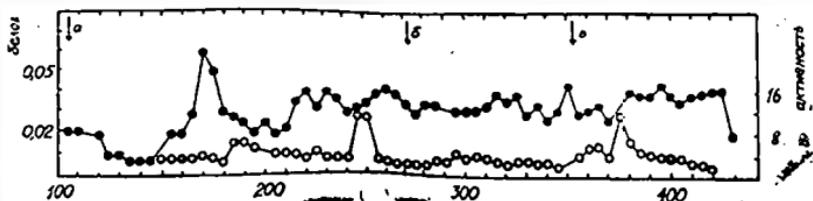


Рис. 2. Хроматографическое разделение солюбилизованного препарата MAO митохондриальной фракции гомогената стволовой части головного мозга ручных лисиц на АН-сефарозе-4В. Обозначения и условия опыта — как на рис. 1

Повышение в тканях головного мозга общей активности MAO-II ( $\alpha$  и  $\beta$ ) (особенности MAO-II $\alpha$ ) при одновременной убыли активности MAO-III могло бы привести, судя по особенностям субстратной специфичности этих форм MAO [2, 3], к изменению соотношений скоростей дезаминирования серотонина и фенилалкиламинов (тирамин,  $\beta$ -фенилэтиламин, дофамин) и, следовательно, к изменению функций серотонинергических и дофаминергических нейронов.

Значение полученных нами данных трудно определить, поскольку химическая природа и биологические свойства множественных форм MAO головного мозга изучены пока лишь в самых общих чертах [17, 18]. Тем не менее, учитывая хорошо обоснованные положения о роли MAO в синдромах изменений нарушениями метаболизма серотонина [10, 19], сведения о воздействии селекции по поведению на реакции ферментативного дезаминирования моноаминов в тканях головного мозга животных [11—13] и данные о каталитических свойствах MAO-II ( $\alpha$  и  $\beta$ ) и MAO-III [2, 3], можно предположить, что препаративно разделяемые путем аффинной хроматографии на биоспецифическом сорбенте АН-сефароза-4В множественные формы MAO стволовой части головного мозга, воздействуя на состояние серотонинергических систем головного мозга, участвуют в регуляции поведения животных.

# PECULIARITIES OF MAO FROM THE BRAIN OF GRAY FOXES WITH HEREDITARY LOW AGGRESSIVENESS

VOITENKO N. N., SAVINKOVA L. K., MOSKVITINA T. A., \*GORKIN V. Z.

Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk

\*Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Comparative study has been carried out by means of affinity chromatography on AH-Sepharose 4B of multiple forms of monoamine oxidase (MAO) (I, IIa, II<sup>b</sup>, III) in solubilized mitochondrial fractions from brain stem homogenates of animals which were quite different in their behavioural patterns: wild foxes and domesticated foxes. As compared with the wild foxes, in the domesticated foxes we have noted a decrease in activity of MAO-III and, at the same time, an increase in the total activity of MAO-II (MAO-IIa and MAO-II<sup>b</sup>) in the brain stem. Data obtained suggest that the multiple forms of brain MAO (MAO-II, MAO-III) may be involved in the regulation of animal behaviour.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Moskvitina T. A., Kamyshanskaya N. S., Garishvili T. G., Gorkin V. Z. Preparative Biochemistry, v. 9, № 2, p. 171—196, 1979.
2. Камышанская Н. С., Москвитина Т. А. Вопр. мед. химии, т. 27, № 2, с. 261—266, 1981.
3. Москвитина Т. А., Кучина Н. Е., Горкин В. З. Вопр. мед. химии, т. 28, № 5, с. 127—130, 1982.
4. Москвитина Т. А., Кучина Н. Е., Горкин В. З. Биохимия, т. 48, № 1, с. 119—124, 1983.
5. Горкин В. З. Аминоксидазы и их значение в медицине, М., Медицина, 1981.
6. Москвитина Т. А., Камышанская Н. С., Смирнов А. В., Прилипко Л. Л., Горкин В. З. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 99, № 6, с. 671—672, 1985.
7. Gorkin V. Z., Moskvitina T. A., Kamyshanskaya N. S., Smirnov A. V., Prilipko L. L., Lideman R. R. Biogenic Amines, v. 3, № 3, p. 229—240, 1985.
8. Горкин В. З., Москвитина Т. А., Камышанская Н. С. Вести. Акад. мед. наук СССР, № 8, с. 55—59, 1984.
9. Fowler C. J., von Knorring L., Orelund L. Psychiatry Res, v. 3, № 2, p. 273—279, 1980.
10. Попова Н. К., Науменко Е. В., Колпаков В. Г. Серотонин и поведение, Новосибирск, Наука, 1978.
11. Попова Н. К., Войтенко Н. Н., Трунг Л. Н. Докл. АН СССР, т. 223, № 6, с. 1489—1500, 1975.
12. Войтенко Н. Н. Докл. АН СССР, т. 252, № 1, с. 245—248, 1980.
13. Войтенко Н. Н. Изв. Сиб. отд. АН СССР. Серия биол.-мед. наук, № 3, с. 114—119, 1985.
14. Kolpakov V. G., Barykina N. N., Shepkasov I. L., Alekhina T. A., Parvez H. — In: Methods in Biogenic Amine Research (ed. S. Parvez, T. Nagatsu, J. Nagatsu H. Parvez), p. 997—1020. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1983.

15. Gray E. C., Whittaker V. P. *J. Anat.*, v. 96, № 1, p. 77—87, 1962.
16. Lowry O. H., Rosebrugh N. J., Farr A. L., Randall R. J. *J. Biol. Chem.*, v. 193, № 1, p. 265—275, 1951.
17. Горкин В. З. *Нейрохимия*, т. 4, № 1, с. 68—79, 1985.
18. Smith D., Filipowicz C., McCauley R. *Biochim. et biophys. acta.*, v. 831, № 1, p. 1—7, 1985.
19. Kahn D. M., Murphy D. L., Youdim M. B. H.—In: *Structure and Functions of Amide Oxidases* (ed. B. Mondovi), p. 231—248, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1985.

Поступила 3. X 1987

---

В издательстве «НАУКА» в IV квартале 1989 г. (№ 673) выйдет книга Перцевой М. Н. «Молекулярные основы развития гормонокомпетентности» (отв. ред. чл.-корр. АН СССР Ю. В. Наточин).

Книга посвящена актуальной проблеме современной биологии—молекулярным механизмам передачи в клетку эндокринной информации. В ней излагаются достижения последних лет в изучении мембранных гормонокомпетентных систем в эукариотической клетке, а также закономерности их становления в ходе онто- и филогенеза, выявленные впервые автором.

В первой части книги рассматриваются принципы организации системы трансмембранной передачи гормонального сигнала. Во втором разделе излагаются закономерности ее этапного формирования в процессе онтогенеза. Третья часть посвящена проблеме возникновения и эволюции системы гормон-гормональный рецептор, рецепторно-циклазного комплекса, а также вторичных мессенджеров в ряду позвоночных и беспозвоночных животных. В заключительной главе анализируются принципы эволюции функции гормонокомпетентной системы.

Книга предназначена для биохимиков, физиологов, эндокринологов, биологов, исследующих процессы развития и других специалистов, занимающихся возрастными и эволюционными аспектами проблемы механизмов гормонального действия.

Заказы направлять по адресу: 117192, Москва, Мичуринский проспект, 12, магазин «Книга—почтой» центральной конторы «Академкнига»; 197345, Ленинград, Петрозаводская ул., 7, магазин «Книга—почтой» Северо-западной конторы «Академкнига» или в ближайший магазин «Академкнига», имеющий отдел «Книга—почтой».



УДК 577.15.0.253

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЭЗЕРИНА И БАЙГОНА С  
АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗОЙ МОЗГА МЫШЕЙ  
IN VIVO И IN VITROБАЛАШОВА Е. К., КУГУШЕВА Л. И.,  
РОЗЕНГАРТ В. И., ШЕРСТОБИТОВ О. Е.Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова  
АН СССР, Ленинград

Установлено, что при внутрибрюшинном введении мышам карбаматов эзерина и байгона в максимально переносимой дозе развивается торможение АХЭ мозга на 70—80%. Спонтанное восстановление активности происходит значительно медленнее при торможении фермента эзеринном по сравнению с байгоном (период полувосстановления 60 и 23 мин соответственно). При этом относительное содержание в мозгу эзерина было значительно выше, чем байгона. Восстановление активности АХЭ мозга мыши в опытах *in vitro* после угнетения эзеринном и байгоном при разбавлении в 300 раз происходило с одинаковой скоростью (период полувосстановления 14 мин);

К инсектоакарицидам, в основе действия которых лежит угнетение активности АХЭ в НС, относятся эфиры замещенных фосфорных кислот и эфиры метил- или диметилкарбаминового кислоты [1]. Хотя обе группы соединений имеют сходный механизм действия, который состоит в необратимом ацилировании серинового гидроксила активного центра фермента, между ними есть существенное различие. Фосфорилированная АХЭ, которая образуется в результате угнетения фосфорорганическими соединениями, представляет собой очень прочное соединение, которое в подавляющем большинстве случаев спонтанно не распадается и активность фермента не восстанавливается. В отличие от этого карбамилированная АХЭ, которая возникает при воздействии карбаматами, сравнительно легко декарбамилируется при разведении или отмывании избытка ингибитора и АХЭ вновь становится активной.

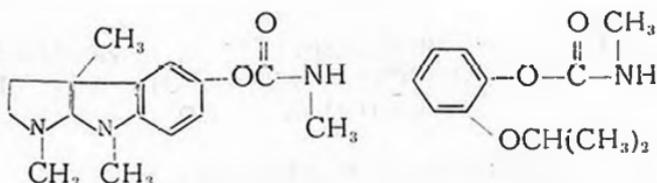
Вопросы декарбамилирования холинэстераз частично обсуждены в литературе [2, 3], однако почти нигде не производилось сопоставление данных, полученных *in vitro* и *in vivo* и совершенно отсутствуют сведения о связи изменения активности АХЭ мозга с содержанием карбаматов в мозгу.

Именно эти проблемы и явились предметом изучения в данной работе. Их значение не ограничивается теоретическими рамками, но имеет

и определенное практическое значение, так как позволяет приблизиться к пониманию закономерностей избирательности действия карбаматных инсектицидов.

### Материалы и методы

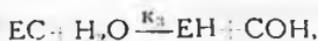
Опыты ставили на беспородных белых мышах. Объектами исследования служили эзерин (физостигмин) и байгон (пропоксур), имеющие следующее химическое строение:



Как видно из формул, оба вещества являются эфирами монометилкарбаминной кислоты, поэтому получающийся в результате их действия на АХЭ карбамиллированный фермент имеет одинаковое строение.

В опытах *in vitro* гомогенат мозга (300 мг/мл) смешивали с эзеринном (конечная концентрация  $1,5 \cdot 10^{-7}$  М) или с байгоном ( $1,5 \cdot 10^{-5}$  М) и выдерживали 45 мин при  $30^\circ$ . В результате АХЭ оказывалась угнетенной на 70—80%. Ингибированный фермент разводили фосфатным буфером (рН 8,0) в 300 раз и инкубировали при  $37^\circ$  для реактивации. Предварительными опытами было установлено, что при таком разбавлении дополнительного угнетения АХЭ не происходит. Пробы для определения активности АХЭ брали каждые 5 мин в течение 30 мин. Активность фермента определяли методом Ellman и соавт. [4]. Субстратом служил ацетилтихолин бромид. Инкубацию с ним проводили 15 мин при  $30^\circ$ , рН 7,9.

Для оценки скорости декарбамиллирования угнетенной АХЭ использовали два критерия: время полувосстановления активности, которое находили из графика зависимости активности АХЭ после разведения от времени; псевдомолекулярная константа скорости декарбамиллирования ингибированной АХЭ из уравнения реакции.



где ЕС—карбамиллированный фермент, ЕН—активный фермент, СОН—карбаминная кислота (разлагается). Величину  $k_3$  определяли графически из зависимости  $\ln \frac{V_0 - V_t}{V_0 - V_1}$  от времени  $t$ . Здесь  $V_0$ —исходная активность АХЭ;  $V_1$ —активность фермента при максимальном угнетении карбаматом,  $V_t$ —активность ко времени  $t$  после разбавления угнетенной АХЭ. Получаемый график носит прямолинейный характер и при этом

$$k_3 = \frac{1}{t} \cdot \ln \frac{V_0 - V_i}{V_0 - V_t} \quad [2].$$

Антихолинэстеразную эффективность карбаматов выражали в виде биомолекулярной константы ( $k_{II}$   $M^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ ) скорости ингибирования фермента [1].

В опытах *in vivo* эзерин и байгон вводили в эквитоксических дозах, примерно соответствующих максимально переносимым (эзерин—1,25  $\mu\text{моль/г}$ , байгон—25  $\mu\text{моль/г}$ ). Через разное время мышей декапитировали и в мозгу определяли активность АХЭ и содержание карбаматов разработанным нами методом [5]. При этом для экстрагирования эзерина применяли воду, а для извлечения байгона—0,05%-ный раствор ТХУ. В качестве тест-фермента для определения антихолинэстеразной активности полученных экстрактов использовали препарат АХЭ из голов мух [5] и по калибровочным кривым оценивали содержание карбаматов в ткани мозга.

### Результаты и обсуждение

*Опыты in vitro.* На рис. 1 представлен прямолинейный участок кривой восстановления активности АХЭ мозга мышей после ее угнетения байгоном и эзеринном и 300-кратного разведения. За 100%-ное угнетение принимали максимальное подавление активности фермента, которое удавалось достигнуть в выбранных условиях, и в соответствии с этим по графику определяли время, через которое активность АХЭ восстанавливалась на 50%. Для обоих ингибиторов оно оказалось одинаковым и составляло  $14,0 \pm 0,5$  мин. Это совпадение не было неожиданностью, так как оба вещества являются эфирами монометилкарбаминовой кислоты и, как уже указывалось, образующиеся карбамилированные ферменты имеют одинаковое строение.

Точно также одинаковыми оказались и константы декарбамилирования  $k_3$ , вычисленные на основании данных рис. 2. Для обоих карбаматов они были равны  $0,050 \pm 0,002 \text{ мин}^{-1}$ . В доступной нам литературе не удалось найти сведений о декарбамилировании мозга мышей, но данные для АХЭ бычьих эритроцитов, голов мух и электрического органа электрического угря [2, 3, 6, 7] оказались сходными, хотя и несколько отличались от наших. Во всех примерах, перечисленных в литературе, время полувосстановления было несколько выше: в зависимости от температуры и рН: от 19 мин до 1,2 ч, а величина  $k_3$  соответственно ниже: от 0,01 до  $0,037 \text{ мин}^{-1}$ .

*Опыты in vivo.* Данные об изменении активности АХЭ мозга после отравления мышей изученными карбаматами представлены на рис. 3, из которого видно, что, в отличие от опытов на гомогенатах мозга, здесь существуют выраженные различия между эффектами эзерина и байгона. После введения байгона максимальное угнетение АХЭ наступало через 2 мин и составляло  $70 \pm 2\%$ . Восстановление активности фермента на

50% происходило через 22 мин, то есть мало отличалось от данных, полученных *in vitro*. Совершенно иная картина наблюдалась после отравления мышей эзеринном: максимальное угнетение АХЭ происходило позже (через 7 мин), было несколько более высоким ( $80 \pm 6\%$ ), а главное, значительно медленнее протекало восстановление активности угнетенной АХЭ—ее декарбамилирование. Полувосстановление достигалось только через 60 мин.

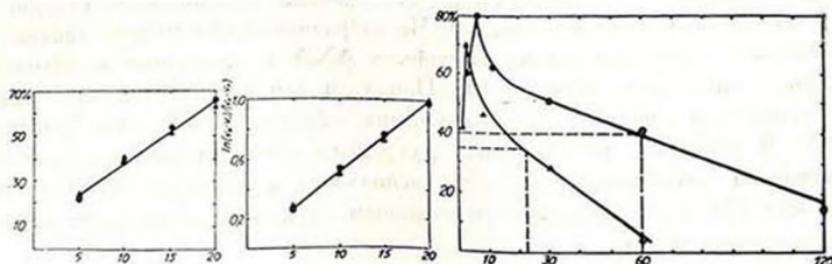


Рис. 1. Восстановление активности АХЭ мозга мыши (в %) после угнетения эзеринном (●) и байгоном (▲). Здесь и на рис. 2, 3 по оси ординат—время в мин

Рис. 2. Определение константы декарбамилирования после угнетения АХЭ мозга мыши эзеринном (●) и байгоном (▲)

Рис. 3. Угнетение АХЭ мозга мышей (в %) после внутрибрюшинного введения эзерина (●) или байгеса (▲)

При анализе полученных результатов мы руководствовались следующими соображениями. В целом организме, как и в гомогенатах мозга, декарбамилирование АХЭ может происходить только при условии удаления избытка ингибитора из среды. В условиях *in vitro* мы достигали этого разведением реакционной смеси в 300 раз, разведение же *in vivo* невозможно, и для удаления ингибитора можно использовать следующие способы: вымывание избытка ингибитора из мозга циркулирующей кровью и ферментативное разрушение ингибитора. Возможность второго способа была проверена нами с помощью 30-минутной инкубации эзерина и байгона с гомогенатами мозга и последующего определения антихолинэстеразной эффективности. В указанных условиях оба вещества совершенно не утрачивали своей способности ингибировать АХЭ. Это говорит о том, что по крайней мере гидролитического разложения обоих карбаматов не происходит, хотя выбранные условия опыта не позволяют исключить возможности окислительных превращений.

Для проверки первой возможности (удаление ингибитора путем циркуляции) мы поставили следующую серию опытов. Сразу после введения ингибиторов мышей декапитировали и отрезанные головы оставляли при комнатной температуре в течение 60 мин, после чего в мозгу определяли активность АХЭ. Оказалось, что при этом никакого восстановления активности фермента не происходит. Напомним (рис. 3), что у неповрежденных мышей за это время активность АХЭ после введения

байгона восстанавливалась полностью, а после введения эзерина—наполовину. Из этих опытов следует, что сохранение нормальной циркуляции является необходимым условием для удаления избытка ингибитора и связанного с этим декарбамиллирования угнетенной АХЭ.

Для выяснения причин различий между байгоном и эзериним, наблюдаемых *in vivo*, мы предприняли попытку определить содержание ингибиторов в мозгу через разное время после их введения в организм. Результаты этой серии опытов представлены в таблице. Как было указано, вещества вводили мышам в эквитоксических дозах, близких к максимально переносимым. Следует отметить, что существует соответствие между антихолинэстеразной эффективностью исследованных карбаматов и их токсичностью для мышей. Так, бимолекулярная константа ингибирования АХЭ мозга мышей для эзерина равнялась  $1,6 \cdot 10^6$ , а для байгона— $1,0 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$

Таблица

Содержание карбаматов в мозгу мышей через разное время после внутрибрюшинного введения

Вводимое вещество	Доза нмоль/г	Абсолютное содержание в мозгу (нмоль/г)		Относительное содержание (% от равномерного распределения)	
		через 10 мин	через 30 мин	через 10 мин	через 30 мин
Байгон	25,0	$0,54 \pm 0,10$ (7)	0,07 (4)	2,2	0,3
Эзерин	1,25	$0,31 \pm 0,10$ (8)	$0,060 \pm 0,007$ (6)	24,8	4,8

Примечание. В скобках указано число опытов.

Так как эзерин значительно токсичнее байгона, его доза в абсолютном выражении была существенно ниже дозы байгона, поэтому трудно сравнивать абсолютное содержание введенных карбаматов. Для сопоставления результатов мы выбрали относительную величину—% от равномерного распределения. При этом за 100% принимают совершенно равномерное распределение, при котором содержание вещества в любой ткани равно введенной дозе (в нашем случае 25 нмоль/г для байгона и 1,25 нмоль/г для эзерина).

Из таблицы видно, что относительное содержание эзерина в мозгу значительно выше, чем байгона—примерно в 10 раз, а исчезновение байгона из мозга происходит быстрее, чем эзерина: за 20 мин содержание байгона уменьшается более чем в 7 раз, а эзерина—в 5 раз. Можно предположить, что более высокое относительное содержание эзерина и его медленное удаление из мозга служат причиной сравнительно медленного восстановления активности АХЭ мозга после введения этого карбамата.

# REACTION OF EZERIN AND BIGONE WITH MICE BRAIN AChE IN VIVO AND IN VITRO

BALASHOVA E. K., KUGUSHEVA L. I., ROSENGART V. I.,  
SHERSTOBITOV O. E.

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

Intraperitoneal injection of carbamates of ezerin or bigone (maximally tolerated dose) results in 70–80% inhibition of brain AChE in mice. Spontaneous recovery of enzyme activity takes place much more slowly in the case of ezerin compared to bigone ( $t_{1/2}$  60 and 23 min respectively); the relative level of ezerin in brain being much higher than that of bigone. In vitro studies recovery of AChE activity in mice brain tissue takes place with identical rate for ezerin and bigone— $t_{1/2}$  14 min.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Голиков С. Н., Розенгарт В. И. Холинэстеразы и антихолинэстеразы насекомых. Л., 1964.
2. Aldridge W. N., Reiner E. Enzyme Inhibitors as Substrates (eds. A. Neuberger, E. L. Tatum), North-Holland Publ. Co, Amsterdam, London, 1972.
3. Main A. R. Pharm. Ther. v. 6, p. 529–629, 1979.
4. Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V., Featherstone R. M. Biochem. Pharmacol., v. 7, p. 88–95, 1961.
5. Балашова Е. К., Розенгарт В. И., Шерстобитов О. Е. Нейрохимия, т. 6, с. 303, 1987.
6. Greenspan C. M., Wilson J. B. Mol. Pharmacol. v. 6, p. 266–272, 1970.
7. Reiner E., Simeon-Rudolf V. Biochem. J. v. 98, p. 501–505, 1966.

Поступила 17 III 1988.



УДК 616—008.939.633.2—02

## О ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ ФОСФОДИЭСТЕРАЗОЙ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ И 5'-НУКЛЕОТИДАЗОЙ ГИПОТАЛАМУСА БЫКА

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

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Обнаружено, что множественные формы ФДЭ циклических нуклеотидов (КФ 3.1.4.17) и 5'-нуклеотидазы (5'-НК; КФ 3.1.3.5) из растворимых фракций гипоталамуса быка элюируются совместно на всех этапах многостадийной очистки этих ферментов, включающих ИОХ на ДЭАЭ-ТСК, аффинную хроматографию на фенил-сефарозе, голубой сефарозе, сАМР-силикагеле и конканавалин А-сефарозе, гель-фильтрацию на сефакриле S-200, а также ВЭЖХ.

Показана функциональная взаимосвязь между ФДЭ и 5'-НК, проявляющаяся в эффективном ускорении суммарной реакции, катализируемой этими ферментами: сАМР → 5'-АМР → аденозин.

Высказано предположение о существовании в мозгу сопряженной системы ФДЭ и 5'-НК).

Имеющиеся в литературе данные о возможности существования мультиферментной системы, катализирующей последовательное превращение сАМР → 5'-АМР → аденозин → инозин, носят противоречивый характер. В 1976 г. Nakatuga, выделив при помощи аффинной хроматографии на 5'-АМР-сефарозе из плазматических мембран печени крысы 5'-НК, обнаружил, что она наряду с 5'-мононуклеотидами гидролизует и фосфодиэфирную связь сАМР [1]. В 1982 г. Montero и Fes, используя тот же метод очистки, выделили из мозга быка гомогенную 5'-НК, которая не гидролизовала циклические нуклеотиды [2]. Однако методикой выделения 5'-НК в этой работе было предусмотрено нагревание фракций ферментов до 60° в течение 5 мин, что послужило, вероятно, причиной потери активности ФДЭ. Сообщалось также о существовании комплекса ФДЭ и 5'-НК в коре надпочечников и о возможности разделения его на индивидуальные ферменты [3]. Некоторыми авторами было высказано предположение о том, что 5'-НК и аденозиндезаминаза (КФ 3.5.4.4) мозга крысы являются составными частями одного и того же белка [4]. Однако оказалось, что эти ферменты могут быть разделены в процессе очистки [3].

Недавно нами было обнаружено, что 5'-НК, выделенная из гипота-

ламуса крупного рогатого скота, обладает фосфодиэстеразной активностью [5].

Настоящая работа посвящена изучению взаимодействия ФДЭ и 5'-НК, осуществляющих реакции превращения сАМР→5'-АМР→аденозин.

### Материалы и методы

В работе были использованы следующие реактивы: сАМР («Calbiochem», США); дибутирил-сАМР и сGMP («Serva», ФРГ); 5'-АМР, 5'-GMP, дитиотреитол и  $\text{NaN}_3$  («Reanal», Венгрия); меркаптоэтанол («Merck», ФРГ); ЭГТА («Calbiochem», США); трис («Serva», ФРГ); пластины «Силуфол» («Kavalier», ЧССР); хроматографические сорбенты: TSK DEAE-Toyoppearl 650 M («Toyo Soda», Япония); фенол-сефароза, голубая сефароза, конканавалин А (Con A)-сефароза, сефакрил S-200 («Pharmacia», Швеция); анионообменная смола амберлит CG-400, 100—200 меш («Serva», ФРГ); [ $^{14}\text{C}$ ] 5'-АМР и [ $^{14}\text{C}$ ] 5'-GMP («Chemapol», ЧССР);  $\alpha$ -метилманноза ( $\alpha$ -ММ) была предоставлена сотрудником нашей лаборатории Возным Я. В. Остальные препараты коммерческие марок х. ч. и с. ч. отечественного производства.

Ферменты выделяли из гипоталамуса быка в соответствии с методом, использованным ранее для очистки ФДЭ [6] в модификации Бобрускина и соавт. [7], на основе аффинной хроматографии на фенол-сефарозе [8]. При очистке ФДЭ использовали также оригинальный аффинный сорбент на основе сАМР, иммобилизованного нами на эпоксиактивированном силикагеле [9]. Была применена также хроматография на голубой сефарозе [10], а также на Con A-сефарозе.

Ткань гомогенизировали в 25 мМ трис-НСl буфере, рН 7,0 (1:2,5), содержащем 0,1 мМ  $\text{NaN}_3$ , 5 мМ дитиотреитол или меркаптоэтанол и 1 мМ  $\text{MgCl}_2$ . Супернатант гомогената (75000 г, 60 мин) наносили на колонку (4×6 см) с ДЭАЭ-TSK. Колонку промывали тем же буфером, содержащим 0,05 М NaCl. Элюцию проводили с использованием линейного и ступенчатого градиентов NaCl (0,05—0,35 М). Суммарный элюат каждого из пиков, содержащих ферментативную активность, наносили на колонку с фенол-сефарозой (4×6 см), предварительно уравновешенную буфером, включающим 1 мМ  $\text{CaCl}_2$ . После промывки колонки элюцию осуществляли буфером, в котором  $\text{Ca}^{2+}$  был заменен на 0,2 мМ ЭГТА, в присутствии 0,15 М NaCl, а затем в его отсутствие.

Элюат подвергали аффинной хроматографии на колонках с Con A-сефарозой (1,2×1,5 см), голубой сефарозой (2×4 см), или сАМР-силикагелем (1,2×2 см). Колонку с Con A-сефарозой предварительно уравновешивали, а также промывали после нанесения фермента 25 мМ трис-НСl буфером, рН 7,0, содержащим 0,1 М NaCl, 1 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 1 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 1 мМ  $\text{MnCl}_2$ . При использовании голубой сефарозы или сАМР-силикагеля для этого применяли тот же буфер, содержащий 1 мМ  $\text{MgCl}_2$ . Элюцию фермента осуществляли с Con A-сефарозы с по-

мощью 0,1 М  $\alpha$ -ММ, с сАМР-силикагеля—0,15 М NaCl или 5 мМ сАМР, с голубой сефарозы—с использованием линейного и ступенчатого градиентов NaCl (0,05—1 М). Фермент, элюированный 5 мМ сАМР, подвергали далее анализу против 25 мМ трис-НСl буфера, содержащего 1 мМ MgCl<sub>2</sub>. Гель-фильтрацию проводили на колонке (1,5×100 см) с сефакрилом S-200 со скоростью 10 мл/ч в 25 мМ трис-НСl буфере в присутствии с 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,1 М NaCl и 0,1 мМ ЭГТА. Для определения величины M<sub>r</sub> фермента колонку калибровали с помощью стандартных белков («Sevva», ФРГ). Все указанные операции проводили при 4°. Выход белка контролировали по изменению УФ-поглощения при длине волны 280 нм. ВЭЖХ проводили на колонках ДЭАЭ-TSK (21,5×150 мм) («LKB», Швеция) и SW-3000 (7,5×600 мм) («Altex Spherogel TSK», США) с использованием хроматографа «Altex Beckman» (США).

Активность ФДЭ и 5'-НК определяли двумя способами. В первом случае для этого использовали инкубационную среду (10 мкл), содержащую 50 мМ трис-НСl буфер, рН 7,0, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, сАМР и [<sup>3</sup>H]сАМР (0,1 мкКи) или сGMP и [<sup>3</sup>H]сGMP (0,1 мкКи) для определения активности ФДЭ и 5'-АМР в сочетании с [<sup>14</sup>C]5'-АМР (0,1 мкКи) или 5'-GMP в сочетании с [<sup>14</sup>C]5'-GMP (0,1 мкКи) в качестве субстратов для определения активности 5'-НК, а также определенное количество фермента элюированных с колонок фракций. Инкубацию проводили при 30° в течение различных промежутков времени. Реакцию останавливали в кипящей водяной бане. Продукты реакции разделяли с помощью ТСХ на силикагеле, идентифицировали их с применением свидетелей в УФ, соответствующие пятна вырезали из пластины «Силуфол». Счет радиоактивности проб определяли с помощью жидкостного сцинтилляционного спектрометра типа «Intertechnique» (Франция).

Во втором случае суммарный объем инкубационной среды составлял 100 мкл. При определении активности ФДЭ реакцию проводили в два этапа. После остановки реакции, катализируемой ФДЭ, в кипящей водяной бане пробы инкубировали в течение 10 мин при 30° в присутствии 5'-НК зменного яда (0,3 мг/мл). Продукты гидролиза разделяли с помощью ионообменной смолы «Амберлит». По окончании ферментативной реакции к пробам добавляли 500 мкл смолы, суспензированной в воде (1:2) [11]. После центрифугирования производили счет радиоактивности супернатанта (8000 об/мин, 5 мин), содержащего меченые аденозин или гуанозин, не сорбирующиеся на смоле в отличие от соответствующих нуклеотидов. Активность 5'-НК элюированных с колонок фракций определяли аналогичным способом, не требующим, однако, применения зменного яда.

В первом случае использовали сцинтиллятор ЖС-106, во втором—ЖС-8. Результаты рассчитывали по количеству гидролизованного субстрата с учетом остаточной радиоактивности проб в отсутствие фермента и уровня неспецифической сорбции аденозина или гуанозина на ионообменнике при полном гидролизе субстратов при избытке фермента. Профилы элюций определяли при концентрации субстратов 3 мкМ.

## Результаты и обсуждение

С помощью ИОХ растворимой фракции гомогената гипоталамуса быка на колонке с ДЭАЭ-TSK выявлены два пика активности ФДЭ (рис. 1). Эти пики элюируются при концентрации NaCl в буфере 0,15

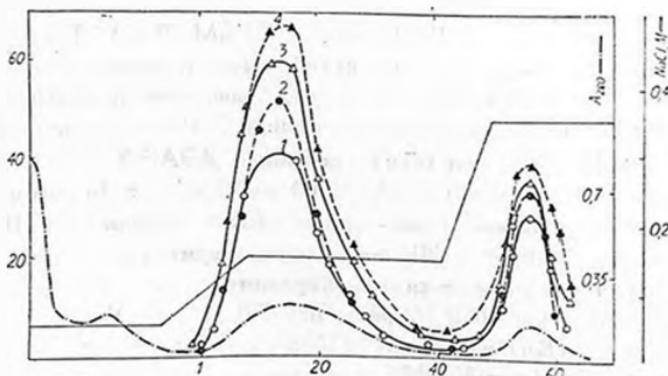


Рис. 1. Выделение ФДЭ (1, 3) и 5'-НК (2, 4) на колонке с ДЭАЭ-TSK. По оси абсцисс—номера фракций (по 5 мл); по оси ординат (слева)—базальная активность ферментов (нмоль/мин) при использовании в качестве субстратов сАМР (1), сGMP (3), 5'-АМР (2) или 5'-GMP (4)

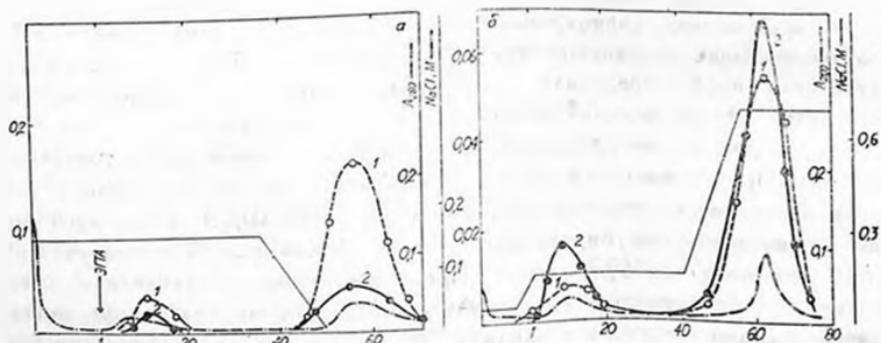


Рис. 2. Выделение ФДЭ (1) и 5'-НК (2) на колонках с фенол-сефарозой (а) и голубой сефарозой (б). По оси абсцисс—номера фракций (по 6 мл); по оси ординат (слева)—базальная активность ферментов (мкмоль/мин) при использовании в качестве субстратов сАМР (1) или 5'-АМР (2)

и 0,3 М соответственно. Оказалось, что пикам активности ФДЭ строго соответствуют пики активности 5'-НК. Последующая хроматография суммарного элюата первого пика ферментов на фенол-сефарозе позволила в свою очередь получить также два пика, фракции которых проявляли как активность ФДЭ, так и 5'-НК (рис. 2, а). Аналогичную картину можно было наблюдать при хроматографии на фенол-сефарозе второго пика ферментативной активности выделенного на колонке с ДЭАЭ-TSK.

Формы ферментов, элюируемые в двух пиках с фенил-сефарозы, различаются, очевидно, по способности вступать в гидрофобные взаимодействия с этим хроматографическим адсорбентом. Можно полагать, что связывание с фенил-сефарозой ферментов первого пика опосредуется участием кальмодулина, молекула которого характеризуется высокой степенью гидрофобности в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$ . Элюция этого пика осуществляется с помощью ЭГТА, хелатирующего  $\text{Ca}^{2+}$  и ослабляющего таким образом гидрофобные взаимодействия. Эти взаимодействия можно также нарушить снижением ионной силы среды [8], что позволяет выделить второй пик активности ферментов удалением из элюирующего буфера  $\text{NaCl}$  (рис. 2, а).

Обнаружено также, что на колонках с голубой сефарозой каждый из пиков, выделенных с помощью ИОХ, можно разделить на два пика, элюируемых буфером, содержащим  $\text{NaCl}$  в концентрациях 0,15 М и 0,7 М соответственно (рис. 2, б). Фракции этих пиков одновременно проявляли активность двух ферментов—ФДЭ и 5'-НК. Разделение ФДЭ и 5'-НК не было достигнуто и в результате применения аффинной хроматографии на  $\text{C}_{10}$  А-сефарозе. Нами было показано, что 5'-НК, выделенная как в первом, так и во втором пиках с колонки с фенил-сефарозой, связывается с  $\text{C}_{10}$  А в присутствии  $\text{Mn}^{2+}$  и  $\text{Ca}^{2+}$  (1 мМ) и элюируется буфером, содержащим 0,1 М  $\alpha$ -ММ. Это, вероятно, свидетельствует о том, что выделенная из растворимой фракции гомогената 5'-НК, подобно ферменту фракции мембран [12], является гликопротеином, имеющим в своем составе  $\alpha$ -D-маннопиранозильные остатки. В этом случае активность 5'-НК, элюированная с  $\text{C}_{10}$  А-сефарозы, также сопровождалась активностью ФДЭ (рис. 3, а).

Выделенная таким образом ФДЭ обладала низкой базальной активностью, которая, однако, возрастала в 5—20 раз в присутствии кальмодулинподобного активатора ФДЭ циклических нуклеотидов, получившего название С-модулин (рис. 3, а). С-модулин был обнаружен в составе препарата кардиотропного нейrogормона «С», выделенного ранее из магнoцеллюлярных ядер гипоталамуса быка [13].

Кроме того, ферменты подвергали аффинной хроматографии на сАМР-силикагеле с целью специфичного выделения ФДЭ на основе ее высокого сродства к лиганду этого адсорбента. Пик ферментативной активности, элюированный буфером, содержащим сАМР, характеризуется наличием как ФДЭ, так и 5'-НК (рис. 3, б).

Была использована также возможность специфичного выделения 5'-НК с применением 5'-АМР-сефарозы, с которой 5'-НК элюировалась совместно с ФДЭ (рис. 3, в). В этом случае ферменты выделялись буфером, содержащим 1 мМ 5'-АМР, обладающим специфичностью лишь к 5'-НК.

Гель-фильтрация на сефакриле S-200 суммарного элюата двух пиков ферментов, полученных на фенил-сефарозе, выявила наличие строго соответствующих друг другу активностей ФДЭ и 5'-НК в трех пиках, которые характеризовались величинами  $M_r$  220, 114 и 57 кД (рис. 4).

Гель-фильтрация на сефакриле S-200 лишь второго пика ферментов, элюированного с фенол-сефарозы, приводила к появлению тех же трех пиков, содержащих как ФДЭ, так и 5'-НК. Полученные нами результа-

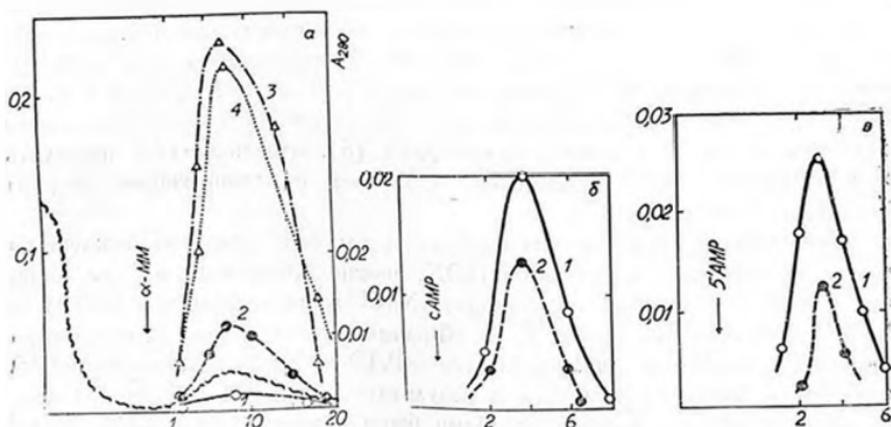


Рис. 3. Аффинная хроматография ФДЭ (1, 3) и 5'-НК (2, 4) на колонках с Сеп А-сефарозой (а), с АМР-силикагелем (б) и 5'-АМР-сефарозой (в). По оси абсцисс—номера фракций (по 1 мл); по оси ординат (слева)—базальная активность ферментов (1, 2) и их активность в присутствии 1 мкг/мл С-модулина (3, 4) (мкмоль/мин) при использовании в качестве субстратов сАМР (1, 3) или 5'-АМР (2, 4).

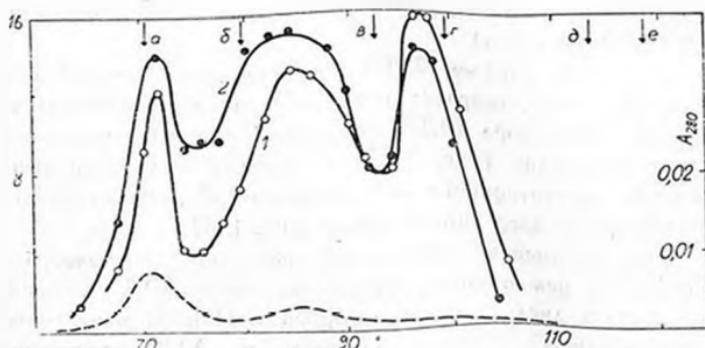


Рис. 4. Гель-фильтрация ФДЭ (1) и 5'-НК (2) на колонке с сефакрилом S-200. По оси абсцисс—объем элюата (мл); по оси ординат (слева)—базальная активность ферментов (нмоль/мин) при использовании в качестве субстратов сАМР (1) или 5'-АМР (2). Стандарты  $M_r$  (кД): а—катализа (240); б—альдолаза (160); в—альбумин бычий сывороточный (67); г—альбумин яичный (45); д—химотрипсиноген (25); е—миоглобин (17, 8)

ты в сочетании с литературными данными дают основание полагать, что с помощью гель-фильтрации на сефакриле выделяется тетрамер, димер и мономер, обладающие ферментативной активностью [3, 14]. Обнаруже-

ние активности двух ферментов в пике, соответствующем  $M_r$  57 кД (мономер), позволяет предположить, что один и тот же фермент обладает двумя ферментативными активностями. Предварительные данные, полученные с применением гель-фильтрации в системе ВЭЖХ на колонке SW-3000, свидетельствуют о гомогенности белка с  $M_r$  57 кД.

Нам удалось продемонстрировать функциональную взаимосвязь между ФДЭ и 5'-НК. Так, при исследовании кинетических характеристик 5'-НК установлено, что константа скорости I порядка для этого фермента, гидролизующего 5'-АМР, образовавшегося из сАМР под действием ФДЭ в препаратах ферментов, в 100 раз превышает константу скорости I порядка при гидролизе 5'-АМР, внесенного в пробы извне. Это может быть следствием направленного переноса интермедната, которым в данном случае является 5'-АМР, от активного центра одного фермента к активному центру другого в условиях их сопряженности.

По всей вероятности, обнаруженная нами взаимосвязь между ФДЭ и 5'-НК характерна и для мозга быка: множественные формы ФДЭ, выделенные с помощью ИОХ в системе ВЭЖХ на колонке ДЭАЭ-TSK, также обладали активностью 5'-НК.

Функциональная роль межферментных взаимодействий может проявляться в координированной регуляции метаболических процессов, обеспечивающей более быстрый ответ на изменения концентраций метаболитов.

Результаты наших исследований показывают, что в гипоталамусе животных существует сопряженная система ФДЭ—5'-НК, направленная на быстрое превращение сАМР в 5'-АМР и аденозин, что весьма важно для регуляции тонуса гладкой мускулатуры сосудов [15, 16] и образования новых порций сАМР путем активации аденилатциклазы [17].

## INTERRELATION BETWEEN BOVINE HYPOTHALAMUS CYCLIC NUCLEOTIDE PHOSPHODIESTERASE AND 5'-NUCLEOTIDASE

SHAROVA N. P., GURVITS B. Ya., GALOYAN A. A.

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

It has been discovered that multiple forms of cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) and 5'-nucleotidase (5'-N) of bovine hypothalamus soluble fractions are coeluted at all steps of the purification scheme, including chromatography on DEAE-TSK, concanavalin A-, phenyl-, blue- and 5'-AMP-Sepharose, cAMP-silica gel, Sephacryl S-200 and HPLC.

Functional interrelation between PDE 5'-N is expressed in drastic acceleration of the reaction: cAMP→5'-AMP→adenosine.

A suggestion about existence of a coupled enzyme system involving cAMP PDE & 5'-N in brain tissue is put forward.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Nakamura S. Biochim. et biophys. acta, v. 426, p. 339—347, 1976.
2. Montero J. M., Fes J. B. J. Neurochem., v. 39, p. 982—989, 1982.
3. Boldicke T. W., Schubert-Rehberg K., Wombacher M. FEBS Lett., v. 204, p. 125—128, 1986.
4. Centelles J. J., Franco R., Canela E. I., Bozal J. Neurochem. Res., v. 11, p. 471—479, 1986.
5. Галоян А. А., Гурвиц Б. Я., Шарова Н. П., Алкссян С. С. Нейрохимия, т. 6 №4, с. 544—551, 1987.
6. Galoyan A. A., Gurvitz B. Ya. Neurochem. Res., v. 10, p. 1467—1481, 1985.
7. Бобрускин И. Д., Шайхин С. М., Муратова М. В., Баранова Л. А., Северин Е. С. Биохимия, т. 52, с. 1344—1351, 1987.
8. Gopatakrishna R., Anderson W. B. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 104, p. 830—836, 1982.
9. Малиновский В. А., Староверов С. М., Лисичкин Г. В. Общая химия, т. 55, с. 2767—2772, 1985.
10. Morril M. E., Thompson S. T., Stellwagen E. J. Biol. Chem., v. 254, p. 4371—4374, 1979.
11. Thompson W. J., Appleman M. M. Biochemistry, v. 10, p. 311—316, 1971.
12. Nakamura S., Mtmori Y., Iijima S., Nagata H., Yamao S., Kameyama M.—In: Physiology and Pharmacology of Adenosine Derivatives (eds. J. W. Daly et al.), p. 21—29, N. Y., Raven Press, 1983.
13. Galoyan A. A. Neurochem. Res., v. 11, p. 769—787, 1986.
14. Sharma R. K., Wang J. H. J. Biol. Chem., v. 261, p. 1322—1328, 1986.
15. Berne R. M. Amer. J. Physiol., v. 204, p. 317—322, 1967.
16. Arch J. R., Neusholm E. A. Biochem. J., v. 174, p. 955—977, 1978.
17. Daly J. W.—In: Physiology and Pharmacology of Adenosine Derivatives (eds. J. W. Daly et al.), p. 275—280, N. Y., Raven Press, 1983.

Поступила 11. I. 1987



УДК 577.158:612.822.1:612.273

ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ  
ИЗОФЕРМЕНТОВ МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ  
МОЗГА КРЫС ПРИ ГИПОКСИИ

ХВАТОВА Е. М., ГАРСИЯ А.

Горьковский государственный медицинский институт им. С. М. Кирова

Изучены кинетические показатели прямой и обратной малаатдегидрогеназной реакции в цитоплазматической и митохондриальной фракциях мозга крыс в норме и при кислородном голодании. Для интактных животных характерна классическая кинетика для малаата и NAD в обеих субклеточных фракциях. Вместе с тем, кинетика для NADH имеет существенные отличия от классической: кривые насыщения цитоплазматической и митохондриальной малаатдегидрогеназы имеют S-образную форму, в координатах Лайнуивера-Берка графики представлены вогнутыми кривыми. При тяжелом нарушении кровоснабжения мозга отмечены существенные изменения кинетических показателей малаатдегидрогеназной реакции в субклеточных фракциях мозга. Наиболее значимые изменения выявлены в митохондриях: кривая насыщения фермента NADH приобретает гиперболическую форму, отмечена полная линейаризация графика в координатах Лайнуивера-Берка, изменены значения начальных скоростей реакции, а также  $K_m$  и максимальной скорости реакции. Выявлены изменения начальных скоростей,  $K_m$  и  $V$  также для цитоплазматической малаатдегидрогеназы.

Адекватная функция ткани мозга обеспечивается ее высокой энергопродукцией, связанной с аэробным метаболизмом глюкозы. Этот процесс в большой мере зависит от скорости реокисления гликолитического NADH в дыхательной цепи митохондрий. В мозгу млекопитающих самой мощной системой генерирования цитоплазматического NAD является малаат-аспартатный шунт, работа которого во многом определяется каталитическими свойствами цитоплазматического и митохондриального изоферментов малаатдегидрогеназы ( $\mu$ МДГ, мМДГ). В предыдущих работах нами показано изменение активности изоферментов МДГ при гипоксии мозга [1, 2], однако природа этого явления остается неясной.

Настоящее исследование посвящено изучению каталитических свойств изоферментов малаатдегидрогеназы в цитоплазматической и митохондриальной фракциях головного мозга в условиях кислородного голодания.

С этой целью определяли кинетические характеристики малаатдегидрогеназной реакции для мМДГ и  $\mu$ МДГ мозга животных в разных условиях экспериментального нарушения доставки кислорода.

## Материалы и методы

Изучение кинетических характеристик прямой и обратной малатдегидрогеназной реакции проводили в митохондриальной и цитоплазматической фракциях мозга половозрелых крыс-самцов. Кислородное голодание головного мозга достигалось снижением атмосферного давления или нарушением кровоснабжения мозга. В последнем случае осуществляли двустороннюю перевязку общих сонных артерий с последующей 18-часовой экспозицией животных. Изменение содержания кислорода во вдыхаемом воздухе создавали в барокамере проточного типа за счет снижения атмосферного давления до 143 мм рт. ст. с экспозицией 30 мин.

Субклеточные фракции ткани мозга получали методом дифференциального центрифугирования [3].

Скорость малатдегидрогеназной реакции регистрировали общепринятым спектрофотометрическим методом по изменению концентрации NADH. Прямую малатдегидрогеназную реакцию (малат + NAD → ЦУК + NADH) изучали по Aspray и соавт. [4]. Фиксированная концентрация NAD составляла 1,24 мМ, при этом концентрация малата менялась от 0,275 до 17,6 мМ. Кинетические характеристики для NAD изучали при фиксированной концентрации малата 8,8 мМ и нарастающих концентрациях NAD от 0,0325 до 1,24 мМ. Обратная реакция (ЦУК + NADH → малат + NAD) изучалась в системе, предложенной Foster, Harrison [5]. Концентрация ЦУК составляла постоянно 0,1 мМ, концентрация NADH варьировала от 0,00625 до 0,4 мМ.

Значения начальных скоростей реакции определяли математически [6].  $K_m$  и  $V$  рассчитывали по Корниш-Боудену [7]. Анализ зависимости начальной скорости реакции от концентрации субстратов проводили в прямых величинах и в координатах Лайнуивера-Берка (график двойных обратных величин). Концентрацию белка определяли по Lowry и соавт. [8].

## Результаты и обсуждение

Изучены кинетические характеристики прямой и обратной реакции для МДГ цитоплазматической и митохондриальной фракций мозга интактных животных. Показано, что кривые насыщения ферментов NAD имеют классическую гиперболическую форму (рис. 1). Аналогичны им по форме и кривые насыщения малатом. Вместе с тем, кривые насыщения ц- и мМДГ восстановленным коферментом имеют существенные отличия от классической кинетики (рис. 2, а). Для цМДГ график имеет выраженную S-образную форму с точкой перегиба при концентрации NADH 50 мкМ. Фермент насыщается при концентрации кофермента 150 мкМ. В координатах Лайнуивера-Берка график представлен вогнутой кривой. мМДГ, для которой характерна такая же форма кривой насыщения NADH, насыщается при концентрации восстановленного кофермента 200 мкМ.

Значения  $K_m$  и  $V$  для прямой и обратной реакции представлены в таблице. Установлено, что  $K_m$  для коферментов более чем на порядок ниже, чем для малата—субстрата реакции.

При острой барометрической гипоксии в цитоплазматической и митохондриальной фракциях мозга установлены неоднозначные изменения кинетических характеристик прямой и обратной малатдегидрогеназной реакции. Для малата и NAD они практически не изменились по сравнению с интактными животными: форма графиков зависимости скорости реакции от концентрации малата и NAD осталась гиперболической, значения  $K_m$  и  $V$  существенно не изменились. Вместе с тем, в кинетических характеристиках обратной реакции установлены существенные изменения.

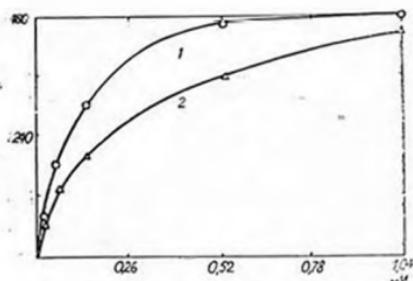


Рис. 1. Кривые насыщения NAD для изоферментов МДГ мозга интактных животных. 1—цМДГ. 2—мМДГ

Для цМДГ характерно двукратное падение  $K_m$  для NADH при некотором снижении  $V$ , показано достоверное изменение зависимости начальной скорости реакции от концентрации NADH (рис. 2, б). Хотя форма кривой насыщения не изменена, и график остается S-образным, значения начальных скоростей реакции при концентрациях NADH до 75 мкМ достоверно увеличены. Насыщение фермента достигается при меньших концентрациях (75 мкМ). В координатах Лайнуивера-Берка график имеет форму вогнутой кривой, ингибирование избытком NADH не проявляется. То есть при гипоксии цМДГ приобретает способность окислять NADH с высокой скоростью в значительно расширенном диапазоне его концентраций.

Для мМДГ также установлено существенное отличие кинетических показателей реакции окисления NADH в отличие от аналогичных показателей контрольной группы (рис. 2, б). Наибольшие изменения касаются зависимости скорости реакции окисления NADH от его концентрации. Показано, что при всех изученных концентрациях восстановленного кофермента начальные скорости реакции снижены, наиболее выраженное снижение начальных скоростей отмечается при концентрациях, превышающих насыщающую (75 мкМ). В координатах Лайнуивера-Берка графики для интактных животных и животных в состоянии кислородного голодания близки по форме.

При тяжелой ишемии в цитоплазматической фракции мозга отмечено более чем двукратное снижение  $K_m$  для NADH, сопровождающееся уменьшением  $V$  (табл.). Исследование начальных скоростей реакции и их зависимости от концентрации восстановленного кофермента выявило существенные изменения в кинетике реакции (рис. 2, в). При низких концентрациях NADH (до 75 мкМ) начальные скорости реакции значительно превышают соответствующие значения у контрольной группы,

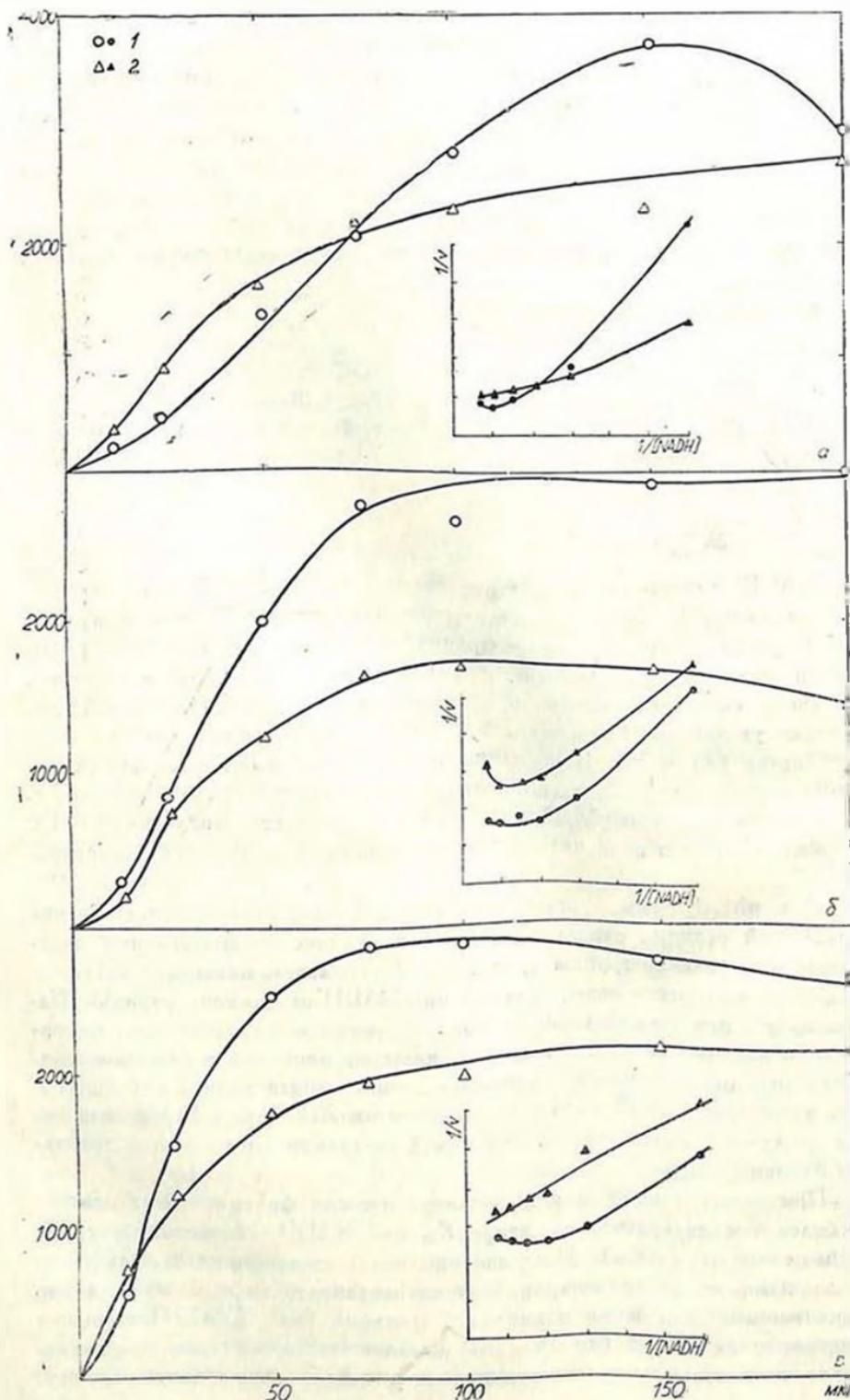


Рис. 2. Зависимость скорости реакции от концентрации NADH для МДІ мозга интактных животных (а), с гипобарической гипоксией (б) и тяжелой ишемией (в). 1—цМДГ, 2—мМДГ

фермент быстрее насыщается кофактором реакции (при концентрациях 75—100 мкМ). Сохраняется S-образная форма графика зависимости скорости реакции от концентрации NADH.

В митохондриальной фракции выявлено двукратное снижение  $K_m$  для NADH, сопровождающееся уменьшением  $V$  (табл.). Такое снижение кинетических показателей реакции согласуется с изменением характера кривой зависимости скорости реакции от концентрации NADH, которая приобретает гиперболическую форму (рис. 2. в). График двойных обратных величин для мМДГ мозга животных с ишемией имеет линейную форму, характерную для классических ферментов, подчиняющихся уравнению Михаэлиса-Ментен.

Таблица

Кинетические характеристики митохондриальной и цитоплазматической малатдегидрогеназы мозга интактных животных и животных с барометрической гипоксией и ишемией

Условия эксперимента		Реакция окисления малата			Реакция окисления NADH	
		$K_m$ по малату (мМ)	$K_m$ по NAD (мМ)	$V$ (нмоль NADH/мг белка/мин)	$K_m$ по NADH (мМ)	$V$ (нмоль NADH/мг белка/мин)
Интактные животные	цМДГ	1,16	0,100	532,50	0,0833	4654,0
	мМДГ	1,97	0,098	372,50	0,0666	3540,0
Барометрическая гипоксия	цМДГ	1,05	0,110	616,50	0,0370	3750,0
	мМДГ	1,00	0,118	511,97	0,0400	2310,0
Ишемия мозга	цМДГ	—	—	—	0,0357	3750,0
	мМДГ	—	—	—	0,0313	2727,0

Изучение каталитических свойств малатдегидрогеназы в митохондриальной фракции мозга показало, что для мМДГ характерно подчинение уравнению Михаэлиса-Ментен в случае малата и NAD и отклонение от классической кинетики для реакции окисления NADH. Характер отклонения позволяет предположить проявление мМДГ мозга положительной кооперативности по NADH. Ранее показано, что классическая кинетика у мМДГ проявляется при сольubilизации фермента с митохондриальной мембраны [9, 10], тогда как связанный с мембранами фермент проявляет неклассическую кинетику [11, 12]. Это позволило нам высказать положение о важности мембранного механизма в регуляции кинетических свойств в активности фермента.

Изучение кинетических характеристик малатдегидрогеназной реакции в митохондриальной фракции мозга при кислородном голодании разной природы показало высокую изменчивость этих показателей. Установлена потеря проявления мМДГ неклассической кинетики по NADH при ишемии мозга. При этом состоянии функция насыщения фермента NADH становится гиперболической, что связано, по-видимому, с потерей ферментом способности регулироваться по аллостерическому типу. Такие

изменения каталитических свойств фермента могут объясняться нарушением связи между мМДГ и митохондриальной мембраной.

Известно, что цМДГ, очищенная из разных тканей, характеризуется классической кинетикой для всех субстратов и коферментов реакции [13, 14]. Нами показано, что МДГ цитоплазматической фракции мозга имеет существенные отклонения от классической кинетики, проявляющиеся в S-образной функции насыщения фермента NADH. Причиной, обуславливающей такие отклонения, может быть одновременно действие нескольких кинетически отличающихся форм фермента или конформационная перестройка фермента как результат его взаимодействия с другими белками или мембранами. Для цМДГ различных тканей установлено наличие двух отличающихся по физико-химическим и кинетическим показателям форм фермента [15—17]. Так как обе формы цМДГ характеризуются классической кинетикой по NADH и близкими значениями  $K_m$  для восстановленного кофермента, их совместное действие должно проявиться выпуклой кривой в координатах Лайнуивера-Берка как результат последовательного насыщения каждой формы [18]. Из этого следует, что найденная нами S-образная функция насыщения фермента в цитоплазматической фракции не может быть результатом одновременного действия двух классических по своей кинетике форм цМДГ.

Связывание цМДГ в цитоплазме с другими белками весьма вероятно, так как показана возможность образования комплекса между очищенными цМДГ и цитоплазматической аспартатаминотрансферазой [19]. Другой возможной причиной найденных отклонений в кинетике реакции может быть связывание цМДГ с мембранами цитоплазмы (например, эндоплазматической сети или/и другими). Это тем более вероятно, что близкая цМДГ по ряду физико-химических свойств мМДГ способна связываться с внутренней мембраной митохондрий, проявляя при этом неклассическую кинетику [11, 12].

При изучении кинетических характеристик МДГ в цитоплазматической фракции мозга при гипоксии различного происхождения установлено, что, в отличие от мМДГ, характер насыщения фермента восстановленным коферментом является стабильным показателем. Функция насыщения цМДГ NADH во всех изученных состояниях сохраняет S-образную форму, что свидетельствует об устойчивости механизма аллостерической регуляции активности фермента. Однако остальные кинетические характеристики реакции при этом подвержены большой изменчивости.

Таким образом, проведенные исследования показали наличие различий в стабильности кинетических свойств малатдегидрогеназы митохондриальной и цитоплазматической фракции мозга.

# STUDY OF KINETIC PROPERTIES OF HYPOXYC RATS MDH ISOENZYMES

KHVATOVA E. M., GARSIA A.

S. M. Kirov Medical School, Gorky

Kinetics of MDH-catalyzed reaction in brain mitochondrial (m) and cytosolic (c) fractions has been studied in control and hypoxic mice. Classic kinetics for malate and NAD both for mMDH and cMDH have been detected in control animals; in the case of NADH S-shaped curve has been obtained for either mMDH or cMDH. In hypoxia the kinetics of MDH-catalyzed reaction change essentially, especially for mMDH: saturation curve for NADH becomes hyperbolic. Lineweaver & Bergmeyer linear- $K_m$ ,  $V_m$  &  $V_{max}$  values alter in hypoxia either for mMDH or cMDH.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Хватова Е. М., Шлапакова Т. И., Лавровский С. Н., Савельева С. Н., Дерябина Т. И.—В кн.: Дегидрогеназы в норме и патологии (под ред. Е. М. Хватовой), с. 63—66, Горький, 1980.
2. Гарсия А., Ерлыкина Е. И., Шлапакова Т. И., Хохлова Т. С.—В кн.: Механизмы и коррекция восстановительных процессов мозга (под ред. А. Г. Гретеня), с. 50—54, Горький, 1982.
3. Fonyo A., Somogyi J. Acta physiol. Acad. Sci. Hung., v. 18, № 3, p. 191—198, 1960.
4. Aspray T. E., Rihimaki G. M., Wolfe R. G. J. Biol. Chem., v. 254, p. 1576—1579, 1979.
5. Foster M., Harrison J. H. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 64, p. 528—534, 1975.
6. Atkins G. L., Ntmmo I. A. Anal. Biochem., v. 104, p. 1—9, 1980.
7. Корнши-Бойлси Э. Основы ферментативной кинетики, М., Мир, 1979.
8. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
9. Хватова Е. М., Гарсия А. Нейрохимия, т. 5, № 3, с. 270—277, 1986.
10. Kashiwamata S., Niwa F., Kutoh R. J. Neurochem., v. 24, № 1, p. 189—191, 1975.
11. Хватова Е. М., Гарсия А.—В кн.: 16-я конференция федерации Европейских биохимических обществ, с. 180, М., 1984.
12. Хватова Е. М., Гарсия А., Корякин А. С.—В кн.: Всесоюзный биохимический съезд, т. 2, с. 232—233, М., Наука, 1986.
13. Kitto G. B., Kaplan N. O. Biochemistry, v. 5, p. 3966—3969, 1966.
14. Kashiwamata S., Niwa F., Kutoh R. J. Neurochem., v. 25, № 1, p. 79—81, 1975.
15. Busquets M., Baro J., Cortes A., Bozal J. Int. J. Biochem., v. 10, p. 823—835, 1979.
16. Baro J., Cortes A., Fas J. B. Int. J. Biochem., v. 13, p. 453—469, 1981.
17. Sorribas A., Puig J., Cortes A., Bozal J. Int. J. Biochem., v. 13, p. 355—364, 1981.
18. Курлянов Б. И. Аллостерические ферменты, М., Наука, 1978.
19. Backman L., Johansson G. FEBS Lett., v. 65, p. 39—42, 1975.

Получила 12. I 1988

СОДЕРЖАНИЕ ДНК В НЕЙРОНАХ ЦНС ИНТАКТНЫХ  
И ПЕРЕНЕСШИХ КЛИНИЧЕСКУЮ СМЕРТЬ СОБАК

АВРУЩЕНКО М. Ш., МАРШАК Т. Л.

Институт общей реаниматологии АМН СССР, Институт биологии  
развития АН СССР, Москва

Методом цитофотометрии на окрашенных по Фельгену препаратах измерено содержание ДНК в ядрах нейронов различных отделов ЦНС у собак. Показано, что у интактных животных клетки Пуркинье и клетки-зерна мозжечка, большие и малые пирамиды гиппокампа и нейроны двигательной области коры больших полушарий диплоидны. На 14-е сутки после перенесенной клинической смерти различной этиологии и длительности у 5 собак содержание ДНК в ядрах клеток Пуркинье и клеток-зерен мозжечка не отличалось от нормы. У двух животных с нарушениями неврологического статуса обнаружено 1,4% гипердиплоидных клеток Пуркинье, а также изменение структуры хроматина клеток-зерен. Высказывается предположение о функциональной обусловленности обнаруженных изменений.

Изучение постреанимационной патологии мозга является центральной задачей современной реаниматологии [1]. Наиболее ранним при клинической смерти кора больших полушарий, кора мозжечка, гиппокамп [2, 3].

С точки зрения функциональной цитологии главным образом изучена популяция клеток Пуркинье коры мозжечка собак, перенесших клиническую смерть различной этиологии и длительности [4, 5]. Установлено, что в постреанимационном периоде происходит существенное изменение популяции: снижается число клеток Пуркинье, изменяется соотношение светлых и темных нейронов, резко возрастает число морфологически измененных клеток. Наряду с этим происходит увеличение размеров ядра, ядрышка, цитоплазмы клеток Пуркинье и возрастает их сухая масса. Выраженность изменений зависит от длительности перенесенной ишемии и коррелирует со степенью восстановления неврологического статуса животных [5, 6].

В настоящем сообщении приведены данные о содержании ДНК в нейронах мозжечка интактных и перенесших клиническую смерть собак. Необходимость проведения такого исследования определена имеющимися в литературе данными о том, что ядра клеток Пуркинье могут содержать гипердиплоидное количество ДНК. Предполагается, что число гипердиплоидных (Н2С) клеток может быть функционально зависимым [7].

Кроме того, содержание ДНК определялось в ядрах нейронов двигательной области коры больших полушарий и в ядрах пирамидных клеток гиппокампа.

### Материалы и методы

Работа выполнена на половозрелых беспородных собаках обоего пола, содержащихся в стандартных условиях вивария. Определялось содержание ДНК в ядрах нейронов двигательной области коры больших полушарий, больших и малых пирамид гиппокампа (2 собаки), а также клеток Пуркинье и клеток-зерен мозжечка интактных животных (7 собак). Проведено также определение содержания ДНК в ядрах клеток Пуркинье и клеток-зерен мозжечка собак, перенесших клиническую смерть различной этиологии и длительности: 10-минутную клиническую смерть от острой кровопотери (4 собаки с нарушениями неврологического статуса), 12 мин остановки системного кровообращения от электротравмы (2 собаки с полным восстановлением неврологического статуса) и 15 мин остановки системного кровообращения от электротравмы (1 собака с нарушениями неврологического статуса)\*. Мозжечок исследовали через 14 суток после оживления животных. У интактных и подопытных собак в мозжечке всегда исследовали клетки Пуркинье и клетки-зерна, взятые из трех различных функциональных областей—медиальной, интермедиальной и латеральной [8].

Для определения содержания ДНК в ядрах нейронов готовили препараты [9], которые фиксировали 96%-ным спиртом (30 мин) и окрашивали затем по Фельгену с предварительным гидролизом в 5 н. HCl при 37° в течение 10 мин. Содержание ДНК в ядрах нейронов определяли на сканирующем микроденситометре Виккерс М 86 при длине волны 540 нм.

Гаплоидный уровень содержания ДНК определяли по сперматидам, использование которых в качестве эталона плоидности при измерении содержания ДНК в нейронах доказано ранее [10].

### Результаты и обсуждение

Гистограммы распределения клеток Пуркинье и клеток-зерен коры мозжечка по содержанию ДНК у интактных собак представлены на рис. 1 (для примера приведены результаты измерения содержания ДНК в ядрах нейронов у 2 животных). Как видно из рисунка, клетки Пуркинье и клетки-зерна диплоидны. Симметричность гистограммы свидетельствует об однородности популяции клеток Пуркинье по содержанию ДНК. Для исследования брались клетки Пуркинье из разных функциональных областей мозжечка. Следовательно, эти данные демонстрируют, что клетки Пуркинье медиальной, интермедиальной и латеральной областей мозжечка имеют одинаковое содержание ДНК.

Таким образом, у интактных собак не обнаружено H2C клеток Пур-

\* Опыты поставлены научными сотрудниками Института общей реаниматологии АМН СССР Е. А. Мутускиной и И. С. Новодержкиной

кинье. Это полностью совпадает с данными, полученными Мапп и соавт. [11], однако результаты работы Lee и соавт. [12] свидетельствуют о том, что в мозжечке собак имеется небольшое число  $2C$  и  $4C$  клеток Пуркинье.

Результаты определения содержания ДНК в ядрах пирамидных клеток гиппокампа и коры больших полушарий интактных животных представлены на рис. 2. Содержание ДНК в ядрах этих нейронов соответствует содержанию ДНК в ядрах клеток Пуркинье. Следовательно, у собак, так же как и у крыс [13], нейроны коры больших полушарий и гиппокампа диплоидны.

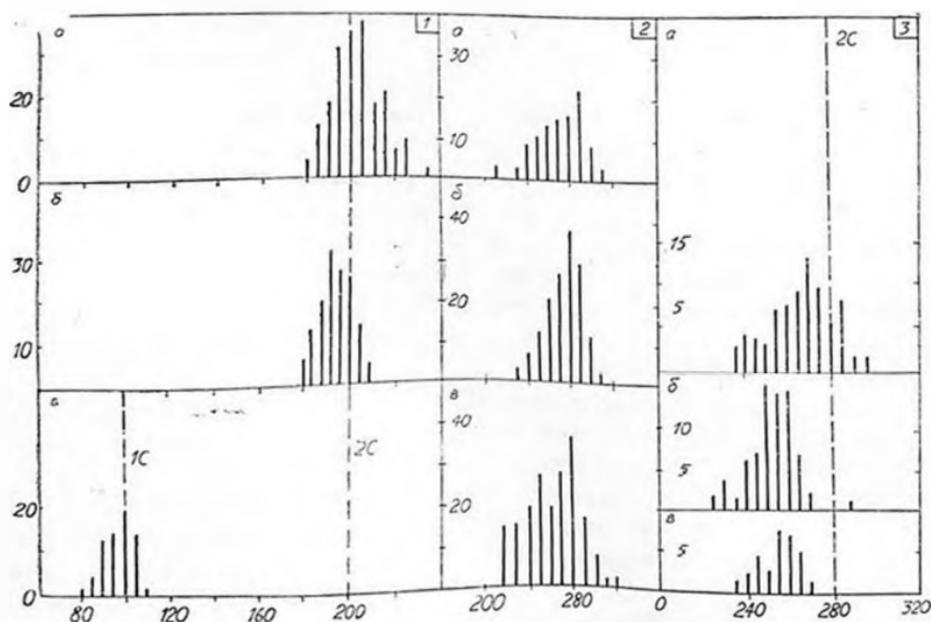


Рис. 1. Содержание ДНК в ядрах клеток Пуркинье (а), клеток-зерен (б), мозжечка и сперматид (а). По оси абсцисс—содержание ДНК в усл. ед., по оси ординат—число ядер. 1С—гаплоидный уровень содержания ДНК, 2С—диплоидный уровень содержания ДНК

Рис. 2. Содержание ДНК в ядрах нейронов гиппокампа (а), коры больших полушарий (б) и клеток Пуркинье (а) у интактных собак. Обозначения те же, что на рис. 1

Рис. 3. Содержание ДНК в ядрах клеток-зерен мозжечка у собак через 14 суток после оживления: а—у животных с полным восстановлением; б, в—у животных с нарушениями неврологического статуса. Обозначения те же, что на рис. 1

Через 14 суток после оживления у 5 из 7 подопытных собак не выявлено изменений в содержании ДНК в ядрах клеток-зерен. У двух подопытных животных обнаружен сдвиг влево гистограммы распределения клеток-зерен по содержанию ДНК (рис. 3). Известно, что интенсивность связывания ДНК с фуксином реактива Шиффа при реакции Фельгена зависит от изменения структуры хроматина [14, 15]. Следствием этого, в

гоятно, и является сдвиг гистограммы распределения клеток-зерен по содержанию ДНК в их ядрах.

Изменения структуры хроматина выявлены в клетках-зернах и клетках Пуркинье мышей под воздействием кортикостероидов [16], а также в нейронах гиппокампа в период постнатального развития крыс [17] и в различных отделах ЦНС при болезни Альцгеймера [18, 19]. Сдвиг гистограммы влево свидетельствует о том, что, по-видимому, происходит компактизация хроматина, как правило сопровождающаяся снижением матричной активности. Выявленные изменения состояния хроматина клеток-зерен коррелируют с наблюдаемым в постреанимационном периоде резким увеличением числа дистрофически измененных клеток Пуркинье и снижением общей плотности популяции клеток Пуркинье [5].

Содержание ДНК в клетках Пуркинье через 14 суток после оживления у 5 из 7 исследованных собак соответствовало диплоидному уровню. У двух подопытных собак выявлены Н2С ядра, число которых составляло 1,4%. Существенно, что обе собаки имели стойкие нарушения неврологического статуса. Поскольку у интактных собак при измерении содержания ДНК в ядрах большого числа нейронов Н2С клетки Пуркинье не были выявлены, можно полагать, что появление единичных гипердиплоидных ядер в постреанимационном периоде у некоторых животных может быть проявлением одного из механизмов компенсации нарушенных функций нейрона [7]. Малое число выявленных в коре мозжечка Н2С клеток является, возможно, следствием того, что феномен имеет наибольшее развитие в более ранние сроки после оживления животных. В настоящей работе содержание ДНК в клетках Пуркинье исследовалось на 14-е сутки постреанимационного периода, что было обусловлено необходимостью определения полноты восстановления неврологического статуса собак. Принимая во внимание, что основные изменения популяции клеток Пуркинье происходят в течение 1 суток после оживления [5], можно предположить, что именно в раннем постреанимационном периоде появляются Н2С клетки, а позднее избыток ДНК в ядре исчезает. Это предположение согласуется с представлением о том, что функциональные изменения количества ДНК в ядрах могут быть кратковременными и транзиторными [16, 20, 21].

Итак, результаты работы показали, что нейроны мозжечка, большие и малые пирамиды гиппокампа и нейроны коры больших полушарий у собак диплоидны. Это позволяет с позиций развиваемых представлений о метаболической роли ДНК в нервных клетках [21] рассматривать как функционально обусловленные любые выявляемые в экспериментальных условиях изменения в содержании ДНК в отдельных нервных клетках или изменения характера распределения нервных клеток по содержанию ДНК в них. Обнаруженные в настоящей работе на 14 сутки после оживления изменения структуры хроматина ядер клеток-зерен и появление единичных Н2С клеток Пуркинье у животных с нарушениями статки указывают на принципиальную возможность реализации этого механизма регуляции активности нейрона после тяжелой гипоксии. Все вышесказан-

ное предопределяет необходимость исследования в дальнейшем содержания ДНК в клетках Пуркинье и других нейронах ЦНС на ранних сроках постренимационного периода.

## DNA CONTENT IN THE NEURONS OF CNS OF CONTROL DOGS AND THOSE WHO SUFFERED FROM CLINICAL DEATH

AVRUSHCHENKO M. Sh., MARSHAK T. L.

Institute of Resuscitation, Academy of Medical Sciences of the USSR and  
Institute of Developmental Biology, Acad. Sci USSR, Moscow

Using the method of cytophotometry DNA content was measured in Feulgen-stained samples in the nuclei of neurons of different parts of dog CNS. In intact dogs Purkinje and granule-cells of cerebellum, large and small pyramidal cells of hippocampus and the neurons of the motor cortex were shown to be diploid. On the 14th day after clinical death of different etiology and duration no change was found in the DNA content of Purkinje or granule-cells nuclei. In two dogs with disturbances of neurological status 1,4% of Purkinje cells were hyperdiploid, and there was a change in the chromatin structure of granule-cells. The changes observed are assumed to be functionally determined.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Неговский В. А. Очерки по реаниматологии. М., Медицина, 1986.
2. Туманов В. П., Кривоцкая Г. Н., Черняк В. А.—В кн.: Реактивные и регенеративные процессы в нервной системе (под ред. И. Меллсашвили), с. 190—195, Тбилиси, Сабчота сакартвело, 1971.
3. Аутард В., Floquet J. *Tempo med.*, v. 193, № 23—25, p. 27—28, 1985.
4. Гурвич А. М., Романова Н. П., Мутускина Е. А. *Журн. высш. нерв. деят-сти*, т. 21, № 4, с. 802—809, 1971.
5. Аврущенко М. Ш. Изменения популяции клеток Пуркинье мозжечка собак в постренимационном периоде. Автореферат канд. дисс., М., 1984.
6. Маршак Т. Л., Аврущенко М. Ш. *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, № 10, с. 477—478, 1986.
7. Маршак Т. Л., Марси В., Бродский В. Я.—В кн.: Цитологические механизмы гистогенезов, с. 109—111, Ташкент, Фан, 1983.
8. Jansen J., Brodal A.—In: *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*, Bd. 4. Teil 8, 323 ss., Berlin, Springer-Verlag, 1958.
9. Sandritter W., Pitny J., Novakova V., Klefer G. *Histochemie*, v. 7, p. 1, 1966.
10. Маршак Т. Л., Марси В., Бродский В. Я. *Цитология*, т. 20, № 6, с. 651—656, 1978.
11. Mann D. M. A., Yates P., Barton C. J. *Comp. neurol.*, v. 180, № 2, p. 345—347, 1978.
12. Lee G. M., Rasch E. M., Thornthwente J. T. *Cell. Biochem. a Function*, v. 2, 4, p. 225—231, 1984.
13. Маршак Т. Л., Марси В., Штупек С., Црковска И. *Цитология*, т. 25, № 5, с. 539—545, 1983.

14. Маршак Т. Л., Бродский В. Я., Урываева И. В. Онтогенез, т. 1, № 4, с. 421—427, 1970.
15. Котельников В. М., Литинская А. А. Цитология, т. 21, № 5, с. 491—507, 1979.
16. Marshak T. L., Mares V., Brodsky V. J. Acta histochem., v. 76, p. 193—200, 1985.
17. Krug H., Wenk A. Acta Histochem., v. 45, № 2, p. 305—321, 1973.
18. Crapper D., Quittkat S., De Boni U. Brain, v. 3, p. 483—495, 1979.
19. Levis P. N., Lukla V. J., De Boni U., Crapper D. R., Luchlan H. C. J. Neurochem., v. 37, № 5, p. 1153—1202, 1981.
20. Ашапкин В. В., Ванюшин Б. Ф. Успехи соврем. биол., т. 98, № 3(6), с. 323—337, 1984.
21. Guitta A.—In: Handbook of Neurosciences (ed. Lajtha), v. 5, p. 251—275, N—J, London, Plenum Press, 1933.

Поступил 17. XII 1987

---

Хайдарлиу С. Х. Нейромедиаторные механизмы адаптации (№ 94).  
Кишинев, Штиница, 12 л., 1989 г.

В монографии обобщаются данные литературы и результаты собственных исследований автора, посвященные раскрытию механизмов формирования приспособительных реакций организма при действии стресс-факторов. Раскрыта роль медиаторных систем и межмедиаторных взаимодействий в активации специфических и неспецифических механизмов адаптации. Рассмотрены способы повышения адаптивных возможностей организма и профилактики вредных последствий стресса путем воздействия на медиаторные системы разной ергичности.

Для биохимиков, физиологов, патофизиологов и специалистов в области практической медицины, спорта, животноводства.



## НАКОПЛЕНИЕ $Ca^{2+}$ СИНАПТОСОМАМИ ГОЛОВНОГО МОЗГА В УСЛОВИЯХ ДЕПОЛЯРИЗАЦИИ В ДИНАМИКЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЛЕГКОЙ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ

\*БОНДАРЬ О. И., МАТЫШЕВСКАЯ О. П., ВАСИЛЬЕВ А. Н.

Киевский государственный университет; \*НИИ нейрохирургии МЗ УССР, Киев

Одной из важных задач нейрохимии является изучение на субклеточном уровне биохимических механизмов наблюдаемых посттравматических расстройств метаболизма мозга для разработки адекватных и эффективных методов лечения [1, 2]. Удобным объектом для изучения функциональной активности нервной клетки, метаболических и транспортных процессов и их нарушений являются синапсомы. При повышении внеклеточной концентрации  $K^+$  усиливается поглощение  $Ca^{2+}$  синапсомами [3] и, как следствие этого, высвобождаются нейромедиаторы [3, 4]. Настоящая работа посвящена изучению процесса поступления  $Ca^{2+}$  в синапсомы в условиях их деполяризации хлористым калием в динамике экспериментальной черепно-мозговой травмы (ЧМТ).

В работе использовали кроликов-самцов массой 2,5—3 кг, содержащихся на стандартном рационе вивария. Экспериментальную ЧМТ наносили, пользуясь аппаратом Лукьянова [5]. Во всех опытах экспериментальную ЧМТ вызывали импульсом одинаковой силы. Обычно удар сопровождался тоническими разгибаниями головы и туловища, подергиваниями конечностей. Через 15 мин, 2 ч, 3, 7 и 14-суток после нанесения экспериментальной ЧМТ животных декапитировали, большие полушария и ствол гомогенизировали 85 ходами пестика в ручном гомогенизаторе (стекло/тефлон). Синапсомы получали по методу Najos [6], подвергали их электронно-микроскопическому анализу [7] и использовали в течение 2—3 ч после выделения. Поглощение  $Ca^{2+}$  синапсомами определяли в среде инкубации объемом 0,5 мл, содержащей (в мМ): имидазол- $HCl$ —20, рН 7,3,  $MgCl_2$ —1, глюкозу—10,  $KCl$ —5,  $NaCl$ —135,  $CaCl_2$ —1,  $^{45}CaCl_2$  ( $10^{-4}$ Бк), 200 мкг белка (среда А). Деполяризацию синапсом вызывали добавлением в среду инкубации 80 мМ  $KCl$  и 60 мМ  $NaCl$  (среда Б). Через 5 мин инкубацию остававляли на фильт-

рах Сунрог-6 («Сметарол», ЧССР). Радиоактивность фильтров определяли на радиоспектрометре «Delta-300» (США). Во всех случаях радиоактивность  $\text{Ca}^{2+}$  при нулевом времени инкубации вычитали из величин, полученных при инкубации в определенные промежутки времени. Концентрацию белка определяли по методу Lowry и соавт. [8]. Статистическую обработку данных проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента [9].

Таблица

Накопление  $\text{Ca}^{2+}$  синапсосомами головного мозга кроликов в динамике экспериментальной черепно-мозговой травмы

Время после нанесения травмы	Полушария головного мозга		Ствол головного мозга	
	среда А $\text{Ca}^{2+}$ , нмоль/мг белка	среда Б	среда А $\text{Ca}^{2+}$ , нмоль/мг белка	среда Б
Контроль	5,40±1,90	10,27±1,40	4,86±0,46	6,26±0,94
15 мин	5,83±0,44	6,17±0,48*	8,37±1,54*	7,74±0,54
2 ч	4,46±1,71*	3,72±1,36	5,79±2,88	4,75±1,28
3 суток	2,59±0,86*	3,96±0,78*	3,21±0,17*	2,60±0,71*
7 суток	6,77±2,79	7,07±2,09	5,73±1,21	6,19±0,15
14 суток	7,10±1,40	8,29±0,87	7,00±0,07*	8,47±1,39

Примечание. \* $p < 0,05$ .

Согласно полученным данным, в контроле накопление  $\text{Ca}^{2+}$  синапсосомами характеризуется насыщением, которое достигается через 5 мин после начала инкубации. Уровень накопления  $\text{Ca}^{2+}$  в препаратах синапсосом, полученных из больших полушарий и ствола мозга кроликов в контроле статистически значимо не отличаются (таблица). Повышение концентрации  $\text{K}^+$  в среде инкубации вызывает изменение знака потенциала на мембране нервной клетки [10]. В этих условиях было установлено, что накопление  $\text{Ca}^{2+}$  возрастает в 2 и 1,5 раза в препаратах, полученных из полушарий и ствола мозга кроликов соответственно. Таким образом, используемые в работе препараты синапсосом обладали функциональной активностью, сопоставимой с описанной в ряде работ [3, 11, 12].

В условиях экспериментальной легкой ЧМТ накопление  $\text{Ca}^{2+}$  препаратами синапсосом из мозга кроликов и регуляция процесса деполяризации, вызванной  $\text{K}^+$ , существенно нарушаются. Способность синапсосом, полученных из мозга травмированных кроликов, аккумулировать  $\text{Ca}^{2+}$  изменялась фазно в зависимости от периода после нанесения экспериментальной ЧМТ и отдела головного мозга. Так, через 3 суток после экспериментальной ЧМТ накопление  $\text{Ca}^{2+}$  синапсосомами полушарий мозга кроликов уменьшается в 2 раза по сравнению с контролем (таблица). В более длительные периоды (7 и 14 суток) после травмы величина уровня накопления  $\text{Ca}^{2+}$  препаратами нестимулированных синапсосом полушарий восстанавливалась и даже несколько превышала контрольный уровень.

Чувствительность препаратов синапсосом полушарий мозга к деполяризующему действию  $\text{K}^+$  также подвержена нарушению в динамике экспериментальной ЧМТ. При добавлении  $\text{K}^+$  наблюдается повышение поглощения  $\text{Ca}^{2+}$  синапсосомами полушарий головного мозга контрольных

животных.  $K^+$ -зависимое поглощение  $Ca^{2+}$  снижается через 15 мин после экспериментальной легкой ЧМТ, а в более отдаленные периоды достоверно не отличается от величин поглощения  $Ca^{2+}$  синапсосомами полушарий головного мозга в среде А при сравнении данных по срокам.

Аналогичные фазные изменения в работе механизма, ответственного за поддержание равновесной концентрации  $Ca^{2+}$ , происходит и в препаратах синапсосом, выделенных из ствола головного мозга кроликов в динамике экспериментальной ЧМТ. Уровень накопления  $Ca^{2+}$  нестимулированными синапсосомами ствола мозга повышается по сравнению с контролем в 1,7 раза через 15 мин после нанесения травмы, а снижается максимально через 3 суток после травмы, как и в случае синапсосом полушарий мозга, и имеет тенденцию к увеличению по сравнению с контролем в более отдаленные периоды.

При добавлении  $K^+$  в среду инкубации синапсосом ствола мозга кроликов нам не удалось выявить изменений в поглощении  $Ca^{2+}$  в средах А и Б в сроки от 15 мин до 14 суток после нанесения экспериментальной легкой ЧМТ.

Результаты исследования позволяют сделать вывод о том, что в динамике экспериментальной ЧМТ происходит поражение механизмов, ответственных за поддержание равновесной концентрации  $Ca^{2+}$  в синапсосомах полушарий и ствола мозга кроликов и поступления в них  $Ca^{2+}$  через плазматическую мембрану за счет деполяризации. Обнаруженные изменения уровня накопления  $Ca^{2+}$  препаратами синапсосом изученных отделов головного мозга кроликов носят фазный характер. Полученные результаты могут указывать на существенные посттравматические изменения в трансмембранном поступлении  $Ca^{2+}$  в нервные окончания из внешней среды, что может быть одним из факторов нарушения регуляции метаболических процессов в мозгу после легкой ЧМТ.

## $Ca^{2+}$ UPTAKE BY RABBIT BRAIN SYNAPTOSOMES IN DEPOLARIZING MEDIA DURING HEAD INJURY.

BONDAR O. I., MATYSHEVSKAYA O. P., VASILIEV A. N.

State University, Kiev

$Ca^{2+}$  uptake by synaptosomes from hemispheres and trunk of rabbit brain during 14 days after head injury has been studied. Disorders in the  $Ca^{2+}$  uptake from  $Na^+$  and  $K^+$  rich media were detected throughout the entire period of observation and were most pronounced during 3 days after the injury.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Промыслов М. Ш. Обмен веществ в мозге и его регуляции при черепно-мозговой травме, М., Медицина, 1984.
2. Гельфанд В. Б., Маламуд М. Д., Истратов В. Г. Замкнутая черепно-мозговая травма, Кишинев, Штиница, 1986.

3. *Blaustein M. P.* J. Physiology, v. 247, p. 617—655, 1975.
4. *Глебов Р. Н., Крыжановский Г. Н.* Функциональная биохимия синапсов. М., Медицина, 1978.
5. *Лульянов Т. Т.* Рационализаторские предложения и изобретения в медицине. Киев, 1975.
6. *Hajos F.* Brain Res., v. 93, p. 485—489, 1975.
7. *Ромоданов А. П., Кольцо О. В.* Вестн. Акад. мед. наук. СССР, № 12, с. 19—25, 1984.
8. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
9. *Плохинский Н. А.* Математические методы в биологии. М., МГУ, 1978.
10. *Baker P. F.* Federat. Proc., v. 35, p. 2589—2595, 1976.
11. *Крацово Г. М., Рязский Г. Г., Орлов С. Н.* Биохимия, т. 47, с. 2006—2013, 1982.
12. *Goddard G. A., Robinson J. D.* Brain Res., v. 110, p. 331—350, 1976.

Поступила 17. III. 1987

---

*Д. Лодж. Медиаторные аминокислоты у здоровых и больных, 320 с. 1988.*

*D. Lodge. Excitatory aminoacids in health and disease. Biological Council Symposia on Drug Action. J. Wiley and Sons Ltd, Baffins Lane, England, 320 p. 1988.*

Значительные успехи достигнуты в настоящее время в выяснении роли модуляторных аминокислот в синаптической передаче. Это произошло в результате открытия фармакологических приемов, позволивших сочетать изучение рецепторов и связанных с ними ионных каналов с новой биохимической, электрофизиологической и бихевиористской методологией. Теперь уже известно, что нарушения нормального функционирования медиаторных аминокислот могут привести к слуховым поражениям, ненормальному поведению, конвульсивным состояниям и дегенерации постсинаптических нейронов. Все это представляет несомненный интерес для понимания природы и терапии психозов, конвульсивных расстройств и нервнодегенеративных заболеваний. Участники вышеуказанного симпозиума выступили с сообщениями о последних достижениях в этой области. Тематика симпозиума охватывала четыре главных направления исследований по медиаторным аминокислотам—фармакологическую характеристику их рецепторов, механизм их действия в качестве транмиттеров, взаимодействие лекарственных препаратов, а также использование этих веществ для коррекции поведенческих реакций и их клиническое применение.



УДК 577.175.82+577.112

СВЯЗЫВАНИЕ ЛИГАНДОВ D<sub>2</sub>-ДОФАМИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ,  
С КРАЙНЕ КИСЛЫМ МЕДЬСОДЕРЖАЩИМ БЕЛКОМ  
МОЗГА—НЕЙРОКУПРЕИНОМБУНЯТЯН Г. Г., \*МИКЕЛАДЗЕ Д. Г., \*АБУТИДЗЕ К. Д.,  
МЕЛИКЯН А. М., НАЛБАНДЯН Р. М.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван;

\*Институт физиологии АН ГССР, Тбилиси

Нейрокупренин, крайне кислый медьсодержащий белок, с величиной  $M_r$  10 кД, обнаружен как в мозгу [1], так и в хромоаффинных гранулах надпочечников [2]. 30% меди растворимой фракции мозга приходится на долю нейрокупренина. В зависимости от того в окисленной или в восстановленной форме находится белок, медь активно связывается с катехоламинами (дофамином, норадреналином, адреналином) либо с продуктами их окисления (адренохромоподобными соединениями) [3]. Последние, наряду с другими хелаторами, легко удаляют медь из нейрокупренина [4]. Недавно было показано [5], что апоформа нейрокупренина выступает как мощный ингибитор дофамин- $\beta$ -монооксигеназы, тогда как холоформа не ингибирует этот фермент. Таким образом, апонейрокупренин рассматривается как природный ингибитор дофамин- $\beta$ -монооксигеназы. Поскольку сама дофамин- $\beta$ -монооксигеназа также является медьсодержащим ферментом, степень насыщенности ее медью определяет уровень дофамина.

Апоформа нейрокупренина, инактивируя дофамин- $\beta$ -монооксигеназу, тем самым повышает уровень дофамина. Следовательно, наличие или отсутствие меди в нейрокупренине может обусловить диаметрально противоположное поведение белка при различных патологиях, связанных с обменом дофамина.

Согласно существующим представлениям [6], дофаминовые рецепторы в мозгу подразделяются на две категории: D<sub>1</sub> (связанные с аденилатциклазой) и D<sub>2</sub> (не связанные с аденилатциклазой или участвующие в ее инактивации). Нейролептики, используемые при эндокринных, нейрорегистических и психиатрических нарушениях, как известно, модифицируют активность D<sub>2</sub>-дофаминовых рецепторов.

Исходя из того, что нейрокупренин является одной из важнейших медьсодержащих систем мозга, связанных с дофамином [4], уровень ко-

того повышается при шизофрении, интерес представляло изучение его связывания с лигандами D<sub>2</sub>-дофаминовых рецепторов.

Нейрокупрени из мозга крупного рогатого скота получали по ранее описанному методу [7]. Апонейрокупрени получали добавлением диэтилдитиоскарбата к белку, гель-фильтрацией на сефадексе G-25 (1,2×8 см) и концентрированием на ДЭАЭ-52 целлюлозе. Белок элюировали 0,01 М натрий-ацетатным буфером, рН 6,0, содержащим 0,6 М NaCl. Гомогенность белка контролировали электрофорезом на 10%-ном ПААГ по методу Davis [8] (рисунок, а), а также гель-фильтрацией высокого давления на колонке «Protein PAK-60» («Millipore Waters», США) (рисунок, б), уравновешенной 0,1 М натрий-ацетатным буфером, рН 7,0. Элюцию проводили тем же буфером со скоростью 1 мл/мин. Очистоте препарата судили также по спектру в диапазоне 220—400 нм (рисунок, в). Величину M<sub>r</sub> белка определяли по методу Andrews [9].

Синтез сульпирид-сефарозы осуществляли по методам Egly, Rorath [10] и Charbonneau, Cormier [11], предложенному для связывания трифторфеназина с сефарозой. Синтез галоперидол-сефарозы осуществляли по методу Simon и соавт. [12], предложенному для связывания морфина с сефарозой.

Аффинную хроматографию на галоперидол-сефарозе проводили путем нанесения обессоленного белкового препарата на колонку галоперидол-сефарозы (0,6×8 см), уравновешенную буфером, содержащим 50 мМ трис-HCl, рН 7,4, 1 мМ ЭДТА, 20 мкг/мл бацитрацина, 40 ед/мл тризолола, 1 мМ фенилметилсульфанилфторида. Промывание проводили этим же буфером со скоростью 5 мл/ч, пока поглощение при 280 нм не спускалось до базовой линии. Белок элюировали тем же буфером с добавлением 100 мкМ галоперидола. В случае аффинной хроматографии на сульпирид-сефарозе ход опыта сохранялся тот же, только при элюции вместо галоперидола в буфер добавляли 100 мкМ сульпирида.

При определении связывания [<sup>3</sup>H]лигандов с нейрокупренином, последний (80—150 мкг) инкубировали при 22° в течение 15 мин в среде, содержащей 10<sup>-8</sup> М [<sup>3</sup>H]лиганда, 50 мМ трис-HCl (рН 7,4), 10 мМ CaCl<sub>2</sub>, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1,5 мМ АТР. Для определения специфичности связывания использовали немеченые лиганды (10 мкМ). После инкубации смесь фильтровали на фильтрах GF/C («Whatman», Англия), фильтры промывали 2 раза по 15 мл того же буфера, и радиоактивность определяли в жидкостном сцинтилляционном спектрофотометре Interechnique SL-400 (Франция). Все использованные [<sup>3</sup>H]лиганды за исключением [<sup>3</sup>H]дофамина («Amersham», Англия) были фирмы «NEN» (США).

Аффинная хроматография на сульпирид-сефарозе выявила способность нейрокупренина связываться с высокоспецифичным D<sub>2</sub>-дофаминовым лигандом.

Известно, что наиболее близко по своим фармакологическим и физиологическим свойствам к D<sub>2</sub>-дофаминовым рецепторам стоят σ-опиатные белки. Галоперидол, специфический D<sub>2</sub>-дофаминовый лиганд, не только меняет уровень энкефалинов при внутривенном введении [13], но и свя-

зывается с  $\sigma$ -опиатными рецепторами [14]. Являясь антагонистом  $D_2$ -дофаминовых рецепторов, галоперидол влияет на антиноцицептивное действие агониста  $\sigma$ -опиатных рецепторов [ $^3H$ ]SKF-10047 [15].

Исходя из вышесказанного, представляло интерес изучение возможного связывания нейрокупреина с галоперидолом и [ $^3H$ ] SKF-10047 в присутствии галоперидола.

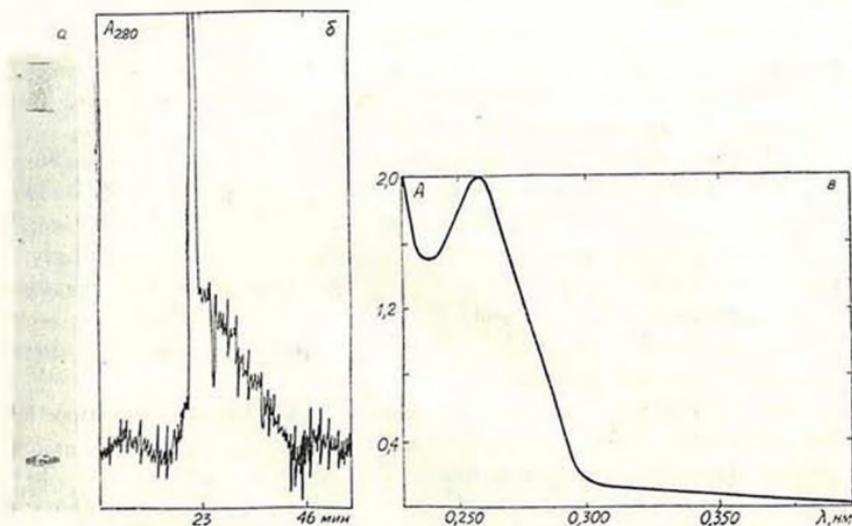


Рис. Контроль чистоты препарата холонейрокупреина: а—электрофорез в 10%-ном ПААГ, б—гель-фильтрация высокого давления на «Protein RAK-60», в—спектр холонейрокупреина в диапазоне 220—400 нм.

При нанесении белка на галоперидол-сефарозу белок вышел одним пиком без задержки. В опытах радиолигандного связывания было установлено, что галоперидол не ингибировал связывания нейрокупреина с [ $^3H$ ]SKF-10047 (таблица).

Надо отметить, что при использовании галоперидола в качестве неметаллического лиганда, неспецифическое связывание с [ $^3H$ ]сульпиридом в три раза превышало общее связывание.

В присутствии бутирофенонпроизводного [ $^3H$ ]дсмперида, галоперидол обнаруживает способность вытеснять 17% связанного с белком радиоактивного нейролентика. При этом уровень неспецифического связывания возрастает более чем в 40 раз по сравнению с опытами, где использовали [ $^3H$ ]сульпирид. Сульпирид не ингибировал связывания нейрокупреина с агонистом дофаминовых рецепторов [ $^3H$ ]дофамином. Как видно из приведенных в таблице данных, по способности неспецифически связываться с нейрокупреином используемые лиганды можно расположить в последовательности: [ $^3H$ ] домперидон > [ $^3H$ ] дофамин > [ $^3H$ ] сульпирид.

Так как медь в нейрокупреине играет важную роль в связывании катехоламинов [3], необходимо было определить, какой процент неспе-

цифически связанной радиоактивности приходится на долю меди. Для выяснения данного вопроса в аналогичных опытах с применением [<sup>3</sup>H]дофамина была использована апоформа нейрокупреина. Результаты опытов, вопреки ожиданиям, показали, что связанный с апоформой нейрокупреина [<sup>3</sup>H]дофамин на 67% замещается производным бензамидина сульпиридом. Следует отметить, что уровень общего связывания [<sup>3</sup>H]дофамина повысился почти в 4 раза по сравнению с опытами, где использовали холонейрокупреин, тогда как уровень неспецифического связывания в обоих случаях был одинаковым.

Таблица

Связывание [<sup>3</sup>H]лигандов D<sub>2</sub>-дофаминовых и β-адренергических и σ-опиатных рецепторов с холонейрокупреином и апонейрокупреином (срм/мг белка)

	[ <sup>3</sup> H] лиганд	Немеченый лиганд	Общее связывание	Неспецифическое связывание	Специфическое связывание	% от общего связывания
Холонейрокупреин	[ <sup>3</sup> H] SKP-10047	галоперидол	4084±76	4342±641	0	0
	[ <sup>3</sup> H] сульпирид	галоперидол	2060±49	7406±1277	0	0
	[ <sup>3</sup> H] домперидон	галоперидол	427543±5349	354237±30657	73306*	17%
	[ <sup>3</sup> H] дофамин	сульпирид	54104±9.415	70764±2103	0	0
	[ <sup>3</sup> H] дигидроалпренолол	пропранолол	723.2±10529	62423±6368	9969	13%
Апонейрокупреин	[ <sup>3</sup> H] дофамин	сульпирид	211430±8439	68815±7374	142615**	67%
	[ <sup>3</sup> H] дигидроалпренолол	пропранолол	65597±7837	45075±5276	20522	31%

Примечание. В таблице представлены данные трех опытов. \*p<0,05, \*\*p<0,001.

Из приведенных данных можно заключить, что при удалении меди нейрокупреин проявляет способность специфически связываться с лигандами D<sub>2</sub>-дофаминовых рецепторов.

Результаты настоящих исследований показали также, что как холонейрокупреин, так и апоформа нейрокупреина неспецифически связываются с лигандами β-адренергических рецепторов. Однако связывание агониста β-адренорецепторов [<sup>3</sup>H]дигидроалпренолола не ингибируется в присутствии антагониста—пропранолола.

Как было показано ранее [1], медь в нейрокупреине проявляет высокую чувствительность к изменениям pH среды. Возможно, при физиологических значениях pH (7,4) способность меди к связыванию катехоламинов резко падает.

Исходя из существующих представлений об особенностях рецепторных белков, трудно объяснить почему нейрокупреин, являющийся растворимым, сравнительно низкомолекулярным белком, способен специфически связываться с лигандами дофаминовых рецепторов. Однако имеющиеся факты о том, что апоформа нейрокупреина, являясь природным ингибитором дофамин-β-монооксигеназы, регулирует обмен дофамина, влияет на уровень меди в мозгу и, как показали настоящие исследования, специфически связывается с дофамином, дают основания предполагать, что данный белок является фрагментом дофаминового рецептора, и поэтому,

вероятно, может играть ключевую роль в развитии шизофрении и других патологий, связанных с нарушением обмена дофамина. —

## BINDING OF D<sub>2</sub>-DOPAMINE RECEPTOR LIGANDS WITH EXTREMELY ACID COPPER CONTAINING PROTEIN-NEUROCUPREIN

BUNIATIAN G. H., \*MIKELADZE D. G., \*ABUTIDZE K. D., MELIKYAN A. M.  
and NALBANDYAN R. M.

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

\*Institute of Physiology Georg. SSR Acad. Sci., Tbilisi

The radioligand binding analyses revealed the ability of aponeurocuprein for specific binding with dopaminergic agonist [<sup>3</sup>H] dopamine. [<sup>3</sup>H] Dopamine binding with aponeurocuprein was 60% replaced by specific D<sub>2</sub>-dopamine receptor antagonist sulpiride, whereas no specific binding occurred when copper-containing form of neurocuprein was used.

Binding of β-adrenergic agonist [<sup>3</sup>H] dihydroalprenolol with holocuprein and aponeurocuprein was not inhibited by β-adrenergic antagonist propranolol.

Earlier reports combined with the present evidence favor the hypothesis that aponeurocuprein seems to be a fragment of D<sub>2</sub>-dopamine receptor.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Sharoyan S. G., Shalyan H. H., Nalbandyan R. M., Buniatian H. Ch. Biochem. et biophys. akta, v. 493, p. 478–487, 1977.
2. Grygorian N. A., Nalbandyan R. M., Buniatian H. Ch. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 103, p. 921–928, 1981.
3. Gasparov V. S., Nalbandyan R. M., Buniatian H. Ch. FEBS Lett., v. 97, p. 37–41, 1979.
4. Налбандян Р. М. Нейрохимия, т. 5, № 1, с. 74–84, 1986.
5. Markossyan K. A., Paitian N. A., Mikaelyan M. V., Nalbandyan R. M. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 138, p. 1–8, 1986.
6. Keabian J. W., Calne D. B. Nature, v. 277, p. 93–96, 1979.
7. Mikaelyan M. V., Grygorian N. A., Nalbandyan R. M. Biochem. et biophys. akta, v. 924, p. 48–55, 1987.
8. Davits B. I. Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 121, p. 404–427, 1964.
9. Andrews P. Biochem. J., v. 96, p. 595–606, 1965.
10. Egly J. M., Porath J. J. Chromatogr., v. 168, № 1, p. 35–37, 1979.
11. Charbonneau H., Cormier M. J. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 90, № 3, p. 1039–1047, 1979.
12. Simon E., Dole W. P., Hitler J. M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 69, p. 1835–1847, 1972.
13. Costa E.—In: Synaptic Constituents in Health and Disease. Proc. of the Third Meeting for Neurochemistry (eds. M. Brzin, D. Skot. H. Bachelard), p. 687. Mladinska-Knjica—Pergamon Press. Ljubljana-Oxford, 1980.
14. Микеладзе Д. Г., Абутидзе К. Д., Саргания Н. А. Нейрохимия, т. 1, с. 89–94, 1987.
15. Чиченков О. Н., Коробов Н. В., Петрова В. Е. Фармакология и токсикология, т. XLVIII, № 2, с. 58–61, 1985.

Поступила 17. XII. 1983



УДК 612.822.1

## ВЛИЯНИЕ ЧАСТОТЫ СТИМУЛЯЦИИ НЕЙРОНОВ ГОЛУБОГО ПЯТНА НА СОДЕРЖАНИЕ НОРАДРЕНАЛИНА И СЕРОТОНИНА В КОРЕ БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРОЛИКОВ

ГАСАНОВА Л. Г., САМЕДОВА Н. Ф., ИСМАЙЛОВ Ю. Б., МАМЕДОВ З. Г.  
Институт физиологии им. А. И. Кареева АН АзССР, Баку

Анализ дифференцированного влияния различных компонентов моноаминергической системы в регуляции функционального состояния нейронов коры больших полушарий головного мозга является одним из актуальных вопросов в проблеме нейромедиаторного обеспечения функциональной пластичности неокортекса. Накопленные к настоящему времени данные указывают на важную роль в этом процессе нейронов голубого пятна [1], где в основном сосредоточены тела норадреналинсинтезирующих клеток, моносинаптически иннервирующих различные области коры больших полушарий [2]. Показано, что непосредственная активация восходящей норадренергической системы электрической стимуляцией голубого пятна вызывает как усиление, так и угнетение спонтанных разрядов большинства корковых нейронов [3]. Как правило, в подобного рода исследованиях предполагают, что принудительная активация норадренергической системы усиливает и секрецию норадреналина (НА) в проекционной области, и метаболизм этого амина в коре. Однако в дальнейшем было обнаружено, что эффекты стимуляции нейронов голубого пятна зависят от параметров раздражающего тока. В частности, было показано, что стимуляция моноаминергической системы током различной частоты вызывает диаметрально противоположные эффекты не только на нейрофизиологическом, но и на поведенческом уровне [4]. К сожалению, имеющиеся в литературе данные по влиянию электрической стимуляции голубого пятна на метаболизм моноаминов в коре крайне фрагментарны и противоречивы [5, 6]. В то же время детальный анализ зависимости направления и интенсивности метаболизма моноаминов в иннервируемых клетках от частоты стимуляции нейронов голубого пятна актуален не только с точки зрения корректной интерпретации нейрофизиологических или поведенческих данных, но и для адекватного использования метода электрической стимуляции норадренергической системы мозга в различ-

ных экспериментальных ситуациях. Настоящая работа посвящена сравнительному анализу влияния электрической стимуляции нейронов голубого пятна на содержание НА и серотонина (5-ОТ) в двух областях коры больших полушарий головного мозга в зависимости от частоты стимулирующего тока.

Эксперименты проведены на 20 половозрелых кроликах под нембуталовым наркозом (30—40 мкг/кг). После скальпирования специальным приспособлением удаляли кость над сенсомоторной (поле 4) и зрительной (поле 17) областями коры. Стимуляцию нейронов голубого пятна (Р 11; L 2; Н 16) по стереотаксическим координатам Фифковой, Маршалла осуществляли в течение 10 мин через биполярные никромовые электроды прямоугольными импульсами тока интенсивностью 0,1 мА, длительностью 1,5 мсек и частотой 5, 50, 200 и 500 Гц. Сразу после окончания стимуляции корковую ткань извлекали для последующих биохимических анализов. Каждую частоту стимуляции тестировали на 4 животных. Контрольную группу составляли 4 кролика, с которыми производили те же манипуляции без стимуляции через вживленные электроды, но с обязательной коагуляцией через раздражающие электроды после извлечения корковой ткани. Ткань гомогенизировали в автоматическом стеклянном гомогенизаторе в 3 мл охлажденного подкисленного бутанола, все стадии анализа проводили на льду. Для определения моноаминов использовали флуорометрический метод Когана, Нечаева [7], позволяющий количественно определять 5-ОТ и катехоламины в одном исследуемом образце. Интенсивность флуоресценции измеряли на спектрофлуорометре МРФ-4 («Hitachi», Япония); содержание НА определяли при длине волны возбуждения 380 нм и флуоресценции 410 нм; содержание 5-ОТ—при 360 и 470 нм соответственно. Интенсивность флуоресценции моноаминов вычисляли по разности флуоресценции подопытной и контрольной проб, а абсолютное количество НА и 5-ОТ—путем сравнения величины флуоресценции с калибровочной кривой стандартных растворов НА (L-pogadrenaline bitartrat фирмы «Koch Light», Англия) и 5-ОТ (Serotonine Kreatinine Szulfat фирмы «Reanal», Венгрия). Пересчет абсолютного количества моноаминов проводили на 0,1 г ткани коры (нг/мг). Полученные данные подвергнуты статистической обработке [8].

Результаты анализа (рисунок) показали, что содержание моноаминов в различных областях коры больших полушарий кроликов неодинаково. В контрольной группе животных, как правило, количество 5-ОТ в зрительной коре было достоверно выше, чем в сенсомоторной и составляло  $407 \pm 42$  и  $373 \pm 39$  нг/г соответственно. Несколько выше оказалось и содержание НА в зрительной области ( $412 \pm 13$  нг/г) по сравнению с сенсомоторной корой ( $381 \pm 43$  нг/г). Электрическая стимуляция нейронов голубого пятна частотой 5 Гц вызывала хотя незначительное, но достоверное увеличение количества НА в исследуемых областях коры в среднем на 8,7%; изменение же количества 5-ОТ при этом оказалось недостоверным. При частоте стимуляции голубого пятна величиной 50 Гц количество 5-ОТ в обеих областях коры оказалось достоверно ниже по-

сравнению с контролем, в то время как изменение содержания НА (повышение) в сенсомоторной коре было недостоверным из-за большого разброса данных, тогда как увеличение его уровня в зрительной коре оказалось достоверным, несмотря на разброс. Максимальное изменение содержания моноаминов наблюдали при частоте стимуляции, равной 200 Гц. При этом достоверное увеличение количества НА в зрительной коре достигало 24% по сравнению с контрольной группой, а в сенсомоторной области—19,3%. Одновременно имело место уменьшение содержания 5-ОТ на 9,5 и 9,4% в зрительной и сенсомоторной областях соответственно. Как видно из приведенных графиков, дальнейшее увеличение частоты стимуляции оказывалось неэффективным по сравнению с предыдущими частотами раздражения. Так, при частоте 500 Гц содержание НА в обеих областях коры не отличалось от контрольных величин, хотя содержание 5-ОТ и становилось незначительно выше, чем у контрольных животных.

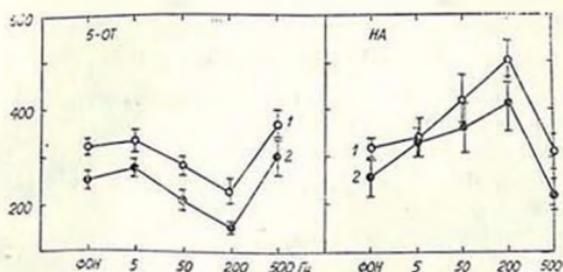


Рис. Кривые изменения содержания серотонина (5-ОТ) и норадреналина (НА) в зрительной (1) и сенсомоторной (2) областях коры больших полушарий головного мозга кролика при стимуляции нейронов голубого пятна током разной частоты. По оси абсцисс—частота стимуляции нейронов голубого пятна в Гц, по оси ординат—содержание 5-ОТ и НА в  $\mu\text{г/г}$  ткани ( $p < 0,05$ )

Таким образом, проведенные эксперименты выявили определенные количественные изменения в содержании биогенных аминов в различных областях коры при электрической стимуляции восходящей норадренергической системы мозга. Полученные данные позволяют прийти к двум основным выводам, имеющим принципиальное значение для понимания нейрофизиологических механизмов влияния принудительной стимуляции восходящей норадренергической системы на различные области коры. Во-первых, увеличение до определенного уровня частоты стимуляции нейронов голубого пятна приводило к увеличению содержания НА как в зрительной, так и в сенсомоторной коре. Такая зависимость сохранялась при сравнительно низких частотах стимуляции, достигая максимума при частоте 200 Гц. При более высокочастотной стимуляции (в нашем случае 500 Гц) повышение содержания НА в коре отсутствовало, а в некоторых экспериментах даже уменьшалось. Во-вторых, изменения содержания НА и 5-ОТ под влиянием стимуляции голубого пятна в исследуемых корковых областях обнаруживало реципрокный характер.

# EFFECT OF LOCUS COERULEUS STIMULATION FREQUENCY ON MONOAMINE—NOREPINEPHRINE AND SEROTONIN CONTENT IN RABBIT BRAIN CORTEX

GASANOVA L. G., SAMEĐOVA N. F., ISMAILOV J. B., MAMEDOV Z. G.

A. I. Karayev Institute of Physiology, Azerbaijan SSR Academy of Sciences, Baku

The effect of locus coeruleus stimulation by 5, 50, 200 and 500 Hz current rectangular pulses on norepinephrine (NA) and serotonin (ST) content in the visual and sensomotor rabbit cortex has been studied. It was shown that relatively low frequency stimulation (5, 50, and 200 Hz) resulted in apparent increase in NA content and in decrease of ST content in the investigated cortex areas, while under higher frequency stimulation (500 Hz) there was no such effect.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Билова Т. И., Голубева Е. А., Сулаков Т. В. Гомеостатические функции Locus coeruleus (синего пятна). М., Наука, 1980.
2. Fuxe K., Hamberg B., Hokfelt T. Brain Res., v. 8, № 1, p. 125—131, 1968.
3. Olpe H.-R., Glatt A., Laszlo J., Schellenberg A. Brain Res., v. 186, № 1, p. 9—19, 1980.
4. Kostowski W., Giacalone E., Garattini S., Valzelli L. Eur. J. Pharmacol., v. 7, № 1, p. 170, 1969.
5. Akaiki T. Brain Res., v. 239, № 2, p. 629, 1982.
6. Tanaka C., Magahi C., Fujiwara H. Brain Res., v. 106, № 1, p. 384, 1976.
7. Козан Б. М., Нечасов Н. В. Лаб. дело, № 5, с. 301—303, 1979.
8. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика, Минск, Вышэйша школа, 1973.

Поступила 7. II. 1988



УДК 577.175.822+577.112+612.812

ВЛИЯНИЕ АЦЕТИЛХОЛИНА НА СИНТЕЗ БЕЛКА В  
ИДЕНТИФИЦИРОВАННЫХ НЕЙРОНАХ  
ВИНОГРАДНОЙ УЛИТКИ

ГРИНКЕВИЧ Л. Н., ЛИСАЧЕВ П. Д., ШТАРК М. Б.

Институт автоматки и электрометрии СО АН СССР, Новосибирск

До настоящего времени малоизученным остается вопрос о механизмах управления внутриклеточными процессами в возбудимых клетках. Наиболее продуктивной представляется гипотеза о ключевой роли хемочувствительной нейрональной мембраны, где, возможно, локализован механизм сопряжения между поверхностной мембраной и внутриклеточными процессами, меняющимися в зависимости от уровня специфической активности [1].

В настоящей работе исследовалось влияние АХ на синтез белков в нейронах пула Д (RPa D), расположенных на дорзальной поверхности подглоточного комплекса ганглиев виноградной улитки [2].

Эксперименты выполнены на половозрелых виноградных улитках *Helix pomatia*. До начала эксперимента животных содержали в активном состоянии, после чего у них извлекали подглоточный комплекс ганглиев и инкубировали в течение суток в 2 мл физиологического раствора для улиток [1] с добавлением глюкозы до 0,1% и меченого [<sup>3</sup>H]лейцина ([L-4,5-<sup>3</sup>H]лейцин) в концентрации 0,25 мКи/мл. В инкубационный раствор добавляли АХ в конечной концентрации  $5 \cdot 10^{-5}$  М. Для отведения электрической активности нейронов пула Д использовали микроэлектроды, заполненные 2,5 М раствором КСl. Клетки пула Д извлекали и помещали в капилляр диаметром 1 мм для гомогенизации и центрифугирования. Гомогенизацию проводили в 5 объемах буфера 0,06 М трис-НСl, рН 6,7, содержащего 0,002 М ЭДТА, 0,25 М сахарозу и 0,5%-ный тритон X-100. Полноту гомогенизации контролировали с помощью бинокулярного микроскопа МБС-2. Центрифугирование вели при 18000 г в течение 1 ч, после чего надосадочную жидкость подвергали микроэлектрофорезу в ПААГ (Т=7,5%, С=3,2%). Электрофорез проводили в системе Орнштейна и Дэвиса при стабилизированном напряжении 150 В на время концентрирования и 300 В на время разделения. Фронт маркировали бром-феноловым синим [3]. После того, как полоса фронта продви-

галась на расстоянии 10 мм от начала разделяющего геля, электрофорез останавливали, гели выдавливали, фиксировали, окрашивали амидо-черным 10Б («Reanal», Венгрия) в 7,5%-ной уксусной кислоте и сканировали на двухлучевом микроспектрофотометре, длина волны 580 нм, луч сравнения 450 нм. Затем гели разрезали на фрагменты (1 мм), которые растворяли в 0,15 мл 30%-ной перекиси водорода при 50° в течение ночи. Счет вели на жидкостно-сцинтилляционном счетчике Multi-mat-20 в толуоловом сцинтилляторе [4].

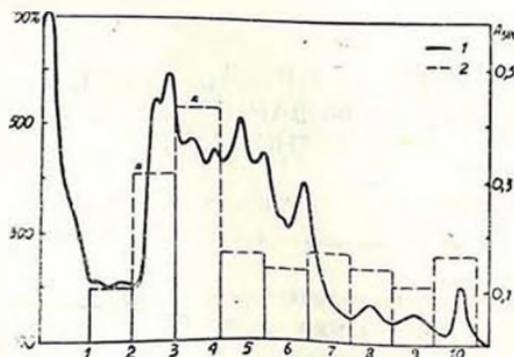


Рис. Включение  $[^3\text{H}]$ лейцина в белковые фракции нейронов пула Д при инкубации ЦНС виноградной улитки с АХ: 1—оптический профиль, 2—профиль радиоактивности (относительно контроля);  $^{\circ}p < 0,01$  по отношению к контролю. По оси абсцисс—номер фракции, по оси ординат слева—% включения меченого предшественника на мкг белка в доле нейронов, инкубированных с АХ, по отношению к контрольным. Контроль принят за 100% и совпадает с осью абсцисс. По оси ординат справа—относительная оптическая плотность

При сравнении оптических профилей белков контрольных животных и улиток, ганглии которых инкубировали с АХ, не обнаруживалось достоверных отличий в количестве и концентрации белков исследуемых зон. Сопоставление при этом профилей удельной радиоактивности (на 1 мг белка во фракции) показало увеличение включения метки во все исследуемые фракции в среднем более чем в 2 раза (рисунок).

Как видно из представленных на рисунке данных, выявлено 2 фракции, для которых характерно наиболее интенсивное увеличение включения метки под влиянием АХ. Так, удельная радиоактивность в 3-ей фракции возросла на 300%, а в 4-ой—на 450% относительно контроля. Так как эти фракции находятся в непосредственной близости друг от друга, возможно, что при нарезке геля в обе смежные фракции попадает разное количество одного и того же белка.

Применяемый нами гомогенизирующий буфер экстрагирует водорастворимые и слабосвязанные мембранные белки. Поэтому отсутствие увеличения количества белка в цитоплазме нейрона при интенсификации его синтеза можно объяснить несколькими причинами: процессингом интенсивно синтезирующегося белка и секретией образующихся пептидов за

пределы клетки: переходом белка (либо пептидов) в мембраносвязанное состояние или его модификацией (или гидролизом), в результате чего продукты процессинга детектируются в других зонах, либо не фиксируются применяемой нами системой электрофореза, не предназначенной для изучения низкомолекулярных пептидов.

Принимая во внимание тот факт, что белки 3-ей и 4-ой фракций являются высокомолекулярными, а клетки пула Д нейросекреторными, наиболее вероятным представляется предположение о наличии в этих фракциях белка-предшественника нейросекрета клеток пула Д. Подвергаясь процессингу, белок расщепляется на пептиды, которые и секретируются клетками пула Д. Эта гипотеза хорошо объясняет как интенсификацию синтеза белка-предшественника, так и отсутствие его накопления в цитоплазме нервных клеток. В этой связи необходимо отметить, что в последнее время как у моллюсков, так и у высших позвоночных животных обнаружены белки-предшественники для нескольких классов нейропептидов, например, гормона откладывания яиц, механизмы процессинга которых в настоящее время интенсивно изучаются [5].

В условиях электрофизиологического эксперимента внесение АХ в омывающий раствор вызывало гиперполяризацию клеток пула Д, что соответствует литературным данным [2]. Восстановление исходной активности длилось до 40 мин. Следовательно, интенсификация биосинтеза в клетках группы Д не вызвана увеличением импульсной активности нейронов. Возможно, усиление биосинтеза связано с модулирующим действием АХ на белоксинтезирующие системы.

В частности, влияние АХ на биосинтез белка может быть реализовано через изменение концентрации  $Ca^{2+}$  в цитоплазме нервной клетки [6]. Таким образом, клетки пула Д являются хорошей моделью для исследования активной роли гиперполяризации, в настоящее время плохо изученной, в регуляции биосинтеза белка.

## ACETYLCHOLINE—INDUCED PROTEIN BIOSYNTHESIS IN THE NEURONS OF HELIX POMATIA

GRINKEVITCH L. N., LISACHOV P. D., SHTARK M. B.

Institute of Automatics and Electrometry, Siberian Branch of USSR  
Acad. Sci., Novosibirsk

The influence of acetylcholine on protein synthesis in identified „pool D“ neurons of *Helix pomatia* has been studied. With the help of disc-electrophoresis in polyacrylamide gel fractions have been identified, in which the intensity of labelling increased up to 400–500% of the control level. The label incorporation into other fractions studied increased up to 80–100% of the control level. Taking into consideration that acetylcholine application causes hyperpolarization of the cells in „pool D“, it may be supposed, that acetylcholine modulates the protein synthesizing systems.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Косыук П. Г., Крышталёв О. А. Механизмы электрической возбудимости нервной клетки, М., Наука, 1981.
2. Сахаров Д. А. Генеалогия нейронов, М., Наука, 1974.
3. Гринкевич Л. Н. Докл. АН СССР, т. 252, с. 248—250, 1980.
4. Остерман Л. А. Ультрамикроанализ нуклеиновых кислот (под ред. Д. Г. Кнорре), с. 55—77, М., Наука, 1973.
5. Шеллер Р. Х., Аксель Р. В мире науки, № 5, с. 28—37, 1984.
6. Пивоваров А. С., Сатемелидзе Г. Н. Журн. высш. нервн. деят.-сти, т. 36, с. 947—956, 1986.

Поступила 14. II. 1988

---

Нейромодуляция и функция мозга, 460 с., 1984.

Neuromodulation and Brain Function. Proc. of the Biannual Capo Boè Conference, Villasimius, Italy, June 1983. Published as „Advances in Biosciences“ (ed. G. Biggio, P. F. Spano, G. L. Gessa, G. Toffano), Pergamon Press, Oxford, v. 48, 460p., 1984.

Сборник посвящен нейромодуляторам и нейротрансмиттерам и их роли в функции мозга. В нем суммированы материалы проводимой раз в два года конференции под эгидой Итальянского общества нейронаук. В числе опубликованных статей: V. Chan-Palay «Множественные химические мессенджеры в нейронах Пуркинье»; F. Benfenati et al. «Новые механизмы, участвующие в модуляции синаптической передачи»; M. Marconi et al. «Доказательства преимущественной роли норадренергических нейронов в синтезе допамина во фронтальной коре»; J. Vetulani «Модуляция популяций рецепторов хронической обработкой антидепрессантами»; M. O. Carruba et al. «Поведенческие доказательства существования множественных систем допаминовых рецепторов в мозгу»; A. Brunì, G. Tottano «Фосфолипидзависимая регуляция мембранных рецепторов»; M. Memo et al. «Допаминовая модуляция различных внутриклеточных изменений, индуцируемых пролактиновысвобождающими агентами»; P. Onali et al. «Молекулярные механизмы, включающиеся в ингибиторное сопряжение мускариновых рецепторов полосатого тела с аденилатциклазой»; S. Levi et al. «Возможная роль АКТГ—МСГ-пептидов в медиации вызванной апоморфином зевоты и эрекции пениса»; M. Motta et al. «Пептидергическая модуляция секреции гонадотропина и пролактина».

Книга предназначена для специалистов по нейронаукам.



УДК 577.175.522+823:612.822

## ВЛИЯНИЕ НОРАДРЕНАЛИНА И СЕРОТОНИНА НА АКТИВНОСТЬ ДНКазы ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

ИВАНОВ В. А., СЕМЕНОВА Т. П., ТРЕТЬЯК Т. М., ГРОМОВА Е. А.

Институт биологической физики АН СССР, Пушкино

Ранее нами по оригинальной методике из головного мозга крыс была выделена отличающаяся от известных нуклеаз млекопитающих экзодоксирибонуклеаза, которую не удается обнаружить в другой ткани этих животных [1]. Было показано, что фермент, названный ДНКазой «*bcg*in III» (VIII), локализован в основном в ядрах нейронов. Мы предположили о его участии в процессах репарации ДНК [2], которая функционально вписана в сложнейший механизм ДНК-координации клеточных процессов и, как предполагается, может участвовать в обеспечении высших функций головного мозга [3, 4]. Детальное изучение ДНКазы VIII, биологическая роль которой связана, по-видимому, с тканеспецифическими функциями нейронов, представляется одним из возможных путей исследования функциональной специфики нервной ткани.

В предыдущем исследовании установлено существование определенного соотношения между активностью ДНКазы VIII и количеством нейромедиаторов в различных отделах головного мозга [5]. Целью данной работы явилось изучение влияния норадреналина (НА) и серотонина (5-ОТ) на активность ДНКазы VIII *in vitro*. Работу проводили на двух препаратах (П) фермента: П1—высокоочищенном электрофоретически гомогенном препарате [2] и П2—частично очищенном препарате, который был получен в результате гель-хроматографии растворимой фракции ядерных белков клеток головного мозга (фракция с величиной  $M_r$  60 кД, рисунок, [6]). Активность фермента определяли спектрофотометрически по приросту кислоторастворимых продуктов, как описано ранее [2, 6], белок—по методу Bradford [7], а ДНК—посредством дифениламиновой реакции [8]. Препараты П1 и П2 различаются субстратной специфичностью; П1 высокоспецифичен к одноцепочечной ДНК (ОЦ-ДНК): его активность с двухцепочечной ДНК (ДЦ-ДНК) в качестве субстрата составляет менее 0,1% от активности с ОЦ-ДНК [2, 6]. В этих же условиях реакция активности П2 с ДЦ-ДНК составляет 25%.

Установлено, что нейромедиаторы действуют на эти препараты фермента различным образом. Ни НА, ни 5-ОТ (в концентрациях от  $10^{-9}$  до  $10^{-3}$  М) не влияли на активность высокоочищенного препарата П1 с ОЦ-ДНК в качестве субстрата. При этом можно было регистрировать лишь ингибирующее действие нейромедиаторов на активность фермента, поскольку одноцепочечный субстрат в процессе реакции претерпевает «исчерпывающий» гидролиз [6], и дальнейшее увеличение кислоторастворимых продуктов, очевидно, не может быть индуцировано. В то же время в реакциях с ДЦ-ДНК в присутствии НА в достаточной высокой концентрации ( $\geq 10^{-5}$  М) активность П1 возрастала и достигала (при концентрации  $\sim 10^{-3}$  М) его активности с ОЦ-ДНК. Такой результат поз-

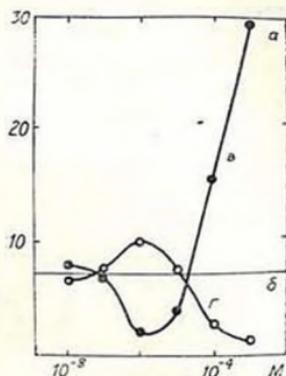


Рис. Влияние норадреналина и серотонина на активность частично очищенного препарата ДНКазы VIII. Реакция с одноцепочечной (ОЦ-) (а) и двухцепочечной (ДЦ-) (б) ДНК в качестве субстрата без нейротрансмиттеров. Реакция с ДЦ-ДНК в присутствии НА (а) или 5-ОТ (б). Величина У. А. выражена в мкг превращенного субстрата/ч/мг белка в проб.

вселяет допускать, что, во-первых, сама молекула фермента не претерпевает функциональных модификаций под влиянием этих нейромедиаторов, и, во-вторых, свободные концы полинуклеотида в одноцепочечных разрывах ДЦ-ДНК, которые образуются в результате действия НА [9], могут являться эффективными субстратными точками для атаки ДНКазы VIII. Правомочность такого вывода основывается на данных, полученных нами ранее, по действию ДНКазы VIII на предварительно «активированную» ДНКазой I ДЦ-ДНК. Было показано, что ДЦ-ДНК, содержащая ограниченное число одноцепочечных разрывов, может быть атакована ДНКазой VIII [2].

При использовании частично очищенной ядерной фракции белков в качестве источника ДНКазы VIII (препарат П2) был получен другой результат. Такой препарат, в отличие от П1, в стандартных условиях реакции обладал значительной активностью с ДЦ-ДНК в качестве субстрата. Было обнаружено, что присутствие НА ( $\sim 10^{-6}$  М) ингибировало (почти в 3 раза), а 5-ОТ ( $\sim 10^{-6}$  М) повышало активность фермента на  $\sim 40\%$  (рисунок, таблица). Такие эффекты обусловлены, вероятно, действием компонентов, присутствующих в неочищенном препарате П2. Вероятно, эти компоненты имеют белковую природу, поскольку в процессе дальнейшей очистки фермента его ДНК-субстратная специфичность изменяется.

Полученные данные позволяют предполагать, что нейромедиаторы осуществляют регуляторное влияние на активность ДНКазы VIII не прямым взаимодействием с молекулами фермента, а, по-видимому, через белковые компоненты, которые, возможно, непосредственно участвуют в функциональной регуляции активности фермента *in vivo*. Такое предположение соответствует известному представлению о том, что НА и 5-ОТ могут выполнять как нейромедиаторную, так и нейромодуляторную функции. Влияние нейромедиаторов на нуклеазную реакцию показано также другими авторами при исследовании регуляторных свойств РНК-полимеразы больших полушарий головного мозга крыс [10]. Следует заметить, что применение указанными авторами очищенного препарата фермента также привело к потере регуляторных свойств.

Таблица

Относительная активность частично очищенного препарата ДНКазы VIII (%) в присутствии норадреналина (НА) или серотонина (5-ОТ) с двуцепочечной ДНК в качестве субстрата

Концентрация нейротрансмиттера (М)	НА	5-ОТ
—	100*	100*
$10^{-8}$	105	98
$10^{-7}$	57	103
$10^{-6}$	34	137
$10^{-5}$	55	104
$10^{-4}$	206	37
$10^{-3}$	391	16

Примечание. \* за 100% принята активность препарата без нейротрансмиттера.

В связи с изучением функциональной регуляции ДНКазы VIII наибольший интерес вызывает исследование влияния малых (физиологических) концентраций нейромедиаторов на активность фермента. Региональный анализ нейромедиаторов в мозгу крыс на основании литературных и наших собственных данных дает возможность вычислить их молярную концентрацию *in vivo* в расчете на единицу объема мозга [11]. Она составляет  $10^{-6}$ — $10^{-3}$  М. В данной работе показано, что нейромедиаторы модулируют активность ДНКазы VIII в препарате П2 различным образом по мере увеличения их количества в реакционной пробе. В концентрациях  $\leq 10^{-7}$  М они не действуют на фермент (одинаковый эффект): увеличение концентраций до  $10^{-6}$  М сопровождается активирующим (5-ОТ) или ингибирующим (НА) влиянием (противоположный эффект); дальнейший рост концентраций ( $\geq 10^{-4}$  М) приводит к обращению действия нейромедиаторов, при этом они оказывают опять же противоположное влияние на активность фермента (рисунок, таблица). Установлено также, что серотонин- и норадреналинергические системы мозга оказывают противоположное влияние на скорость синтеза нейроспецифических белков в ряде мозговых структур: неокортексе, гиппокампе и стриатуме [12]. Подобная разнонаправленность эффектов данных медиаторных си-

ством на молекулярном уровне может лежать в основе проявления реципрокности влияний серотонин- и норадреналинергических систем мозга в регуляции обучения и эмоционального поведения животных [13, 14].

## EFFECT OF NORADRENALINE AND SEROTONIN ON THE ACTIVITY OF RAT BRAIN DNase

IVANOV V. A., SEMYONOVA T. P., TRETYAK T. M., GROMOVA E. A.

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

Effects of epinephrine and serotonin on the brain deoxyribonuclease, DNase BIII activity have been studied. It was established that the effect depends on a concentration of the neurotransmitters. This result may be due to a double function of epinephrine and serotonin which are known to exert both neurotransmitter and neuromodulator function.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Иванов В. А., Третьяк Т. М. Успехи соврем. биол., т. 101, с. 174—187, 1986.
2. Ivanov V. A., Gaziev A. I., Tretyak T. M. Eur. J. Biochem., v. 137, p. 517—522, 1983.
3. Ашапкин В. В., Романов Г. А., Тушмалова Н. А., Ванюшин Б.Ф. Биохимия, т. 48, с. 355—362, 1983.
4. Васильева В. К., Мсерсон Ф. Э. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 94, с. 63—64, 1982.
5. Иванов В. А., Третьяк Т. М., Семенова Т. П. III Всесоюзн. конф. посвященная Коштыяну Х. С. «Физиология и биохимия медиаторных процессов», с. 84, М., 1980.
6. Иванов В. А., Терпиловская О. Н., Третьяк Т. М., Смирнова Г. Н. Биохимия, т. 47, с. 398—404, 1982.
7. Bradford M. M. Anal. Biochem., v. 72, p. 248—254, 1976.
8. Croft D. N., Lubrazh M. Biochem. J., v. 95, p. 612—620, 1965.
9. Yamafuji K., Itama S., Murakami H. Enzymologia, v. 42, p. 439—447, 1972.
10. Нечасова Г. А., Шелесина Е. П. Укр. биохим. журн., т. 51, с. 455—458, 1979.
11. Семенова Т. П., Иванов В. А., Третьяк Т. М. Журн. высш. нервн. деят-сти, т. 29, с. 640—642, 1979.
12. Громова Е. А., Вартамян Г. А., Семенова Т. П., Ли О. Н., Нестерова Н. В., Климентьев Б. И., Степанов И. И. Докл. АН СССР, т. 246 с. 509—512, 1979.
13. Громова Е. А.—В кн.: Эмоциональная память и ее механизмы, с. 91—128, М., Наука, 1980.
14. Громова Е. А., Семенова Т. П., Чубаков А. Р., Бобкова Н. В. Реципрокность взаимоотношений серотонинергической и норадреналинергической систем мозга и ее значение для регуляции поведения в норме и патологии, Пуудино, препринт, 1985.

Поступила 16. I 1988

ДИНАМИКА ИНДУЦИРОВАННОГО ПЕРЕКИСНОГО  
ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В СИНАПТОСОМАХ КОРЫ  
ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ НАРУШЕНИИ СНА

ТАРАНОВА Н. П., НИЛОВА Н. С.

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

Исследование биохимических характеристик синапсом из головного мозга крыс, лишенных парадоксальной фазы сна (ПФС), показало, что нарушение сна приводит к структурным перестройкам синаптических мембран, что не может не отразиться на их функциях [1—4]. Одним из механизмов, ответственных за развитие конформационных изменений клеточных мембран, могут быть процессы ПОЛ, являющиеся естественными способами модификации мембран [5, 6]. В опытах *in vivo*, проведенных ранее, нами было показано угнетение процессов ПОЛ в синапсом, выделенных из коры головного мозга крыс при лишении их ПФС в течение 24 ч [7]. Для того, чтобы выяснить, является ли уменьшение содержания продуктов ПОЛ следствием торможения реакций свободно-радикального окисления или результатом активации антиоксидантной системы, в настоящей работе была исследована динамика индуцированного *in vitro* ПОЛ синапсом.

Механизмы инициации процессов ПОЛ *in vivo* и *in vitro* одинаковы: при взаимодействии металлов переменной валентности (в первую очередь железа) с молекулярным кислородом возникают активные формы кислорода (супероксидный анион-радикал и гидроксильный радикал), окисляющие остатки жирных кислот молекул мембранных липидов [6]. В тканях железо может находиться в свободном состоянии или входить в состав специфических ферментов. В первом случае в присутствии каких-либо восстановителей (например, аскорбата) индуцируется процесс неферментативного ПОЛ; во втором случае в присутствии таких кофакторов, как NADPH или NADH индуцируется процесс ферментативного ПОЛ. Несмотря на то, что физиологическое значение процессов неферментативного ПОЛ *in vivo* оспаривается [8], полная характеристика потенциальных возможностей системы ПОЛ *in vitro* возможна только при исследовании индукции как неферментативного, так и ферментативного процессов ПОЛ.

Опыты ставили на белых крысах-самцах линии Wistar массой 160—180 г. Лишение ПФС проводили по методу Jouvet и соавт. [9]. Фракцию синапсом получали методом низкоскоростного центрифугирования [10] и промывали модифицированным раствором Кребса-Рингера следующего состава: NaCl—124 мМ, KCl—5 мМ, MgSO<sub>4</sub>—1.3 мМ, трис-30 мМ (рН 7,4). Осадок синапсом суспендировали в той же среде и использовали для исследования индуцированного ПОЛ. Содержание белка в пробах для исследования ферментативного ПОЛ составляло 0,6 мг, неферментативного ПОЛ—1,3 мг. Белок определяли по методу Miller [11]. Динамику индуцированного ПОЛ изучали по методу Аристарховой и соавт. [12]. Принцип метода состоит в том, что в опытах *in vitro* вызывают ускорение процесса ПОЛ в биологических мембранах путем прибавления соответствующих индукторов и после различных сроков инкубации проб в термостатированной бане при покачивании определяют содержание продуктов ПОЛ, возникающих в результате индукции. В настоящих опытах инкубацию проб проводили в аппарате Варбурга при 37°. Пробу, содержащую модифицированный раствор Кребса-Рингера и суспензию синапсом (0,8 мл), преинкубировали в течение 5 мин для выравнивания температуры, затем из бокового отростка сосуда Варбурга прибавляли индукторы ПОЛ. Для неферментативного ПОЛ прибавляли 0,2 мл раствора Fe<sup>2+</sup> и аскорбата (конечная концентрация Fe<sup>2+</sup>—10 мкМ, аскорбата—0,5 мМ). Для индукции ферментативного ПОЛ прибавляли 0,2 мл NADH или NADPH в конечной концентрации 0,5 мМ. Пробу инкубировали 5, 10, 15 и 20 мин. Реакцию останавливали добавлением ТХУ в конечной концентрации 18%.

Содержание одного из продуктов ПОЛ—малонового диальдегида (МДА)—определяли по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой [5]. Для определения прироста уровня МДА в ходе индукции ПОЛ ставили контроль на содержание этого продукта для нулевой отметки времени сразу по окончании преинкубации до прибавления индукторов ПОЛ.

Результаты исследования динамики индуцированного ПОЛ в синапсомемах, выделенных из коры головного мозга крыс в норме и при нарушении сна, приведены в таблице. Из полученных данных следует, что во всех сериях опытов в синапсомемах контрольных животных динамика индуцированного ПОЛ, как ферментативного, так и неферментативного примерно одинакова. Скорость накопления МДА наиболее высока в первые 5 мин инкубации, а затем она замедляется и в следующие два 5-минутных интервала составляет 40—50% от исходной скорости. В более поздние сроки инкубации (20 мин) активность всех трех систем индуцированного ПОЛ снижается еще быстрее, однако количественный прирост МДА как в контроле, так и в опыте в ходе ферментативного ПОЛ значительно ниже, чем в случае неферментативного индуцированного процесса. Эта общая закономерность зарегистрирована и для других тканей [12]. Причиной этого является то обстоятельство, что неферментативное ПОЛ могут подвергаться все ненасыщенные жирные кислоты мембранных липидов, в том числе и моноеновые. Ферментативной перекисидации под

Таблица

Динамика индуцированного перекисного окисления липидов (ПОЛ) в синапсоммах коры головного мозга крыс при лишении их парадоксальной фазы сна (ПФС) в течение 24 ч

Индуктор ПОЛ	Прирост малонового диальдегида, нм/мг белка							
	5 мин		10 мин		15 мин		20 мин	
	Контроль	Лишение ПФС	Контроль	Лишение ПФС	Контроль	Лишение ПФС	Контроль	Лишение ПФС
Аскорбат + Fe <sup>2+</sup>	2,80±0,27 (13)	2,90±0,42 (13)	4,10±0,44 (12)	4,50±0,54 (13)	5,60±0,50 (12)	6,10±0,67 (12)	5,20±0,63 (10)	6,80±0,69 (10)
NADH	0,80±0,07 (14)	0,80±0,07 (14)	1,10±0,07 (14)	1,30±0,09 (14)	1,40±0,09 (14)	1,50±0,07 (14)	1,60±0,08 (13)	2,10±0,18* (14)
NADPH	0,70±0,03 (13)	0,70±0,06 (14)	1,10±0,10 (14)	1,10±0,07 (14)	1,40±0,07 (13)	1,40±0,07 (14)	1,60±0,10 (14)	1,80±0,13 (14)

Примечание. \* $p < 0,05$  по сравнению с контролем. В скобках—число опытов.

вергаются в основном полиеновые кислоты. Кроме того, неферментативное ПОЛ возможно в любом локусе мембраны, а ферменты, осуществляющие ПОЛ в клетке (диоксигеназы и липоксигеназы), имеют строго определенную локализацию вблизи электронпереносящих цепей митохондрий (NADH-зависимые ферменты) или эндоплазматического ретикулама (NADPH-зависимые ферменты). Из полученных данных следует также, что интенсивность ферментативного ПОЛ, индуцируемого NADH и NADPH, в синаптосомах примерно одинакова. По всей видимости, и в синаптосомах местом локализации NADH-зависимого ПОЛ являются митохондрии, а NADPH-зависимый ферментативный процесс ПОЛ происходит в той части эндоплазматического ретикулама, которая может проникать в пресинаптическую область [13].

Сравнение прироста МДА при индукции ПОЛ в синаптосомах из коры больших полушарий головного мозга контрольных и лишенных ПФС крыс не выявило угнетения индуцированного ПОЛ при нарушении сна. Более того, неферментативный аскорбатзависимый процесс в синаптосомах головного мозга животных, лишенных ПФС, имеет тенденцию к активации, особенно в последние сроки инкубации. Ферментативный NADH-зависимый процесс ПОЛ также более активен в синаптосомах при лишении крыс ПФС. Прирост МДА в данном случае в ходе инкубации более интенсивен в опыте, чем в контроле, и к концу инкубации разница достигает 30% по отношению к контролю (таблица).

Таким образом, результат настоящего исследования позволяет заключить, что потенциальные возможности системы ПОЛ в синаптосомах при нарушении сна не страдают. По-видимому, это означает, что причиной установленного ранее ингибирования ПОЛ *in vivo* при лишении ПФС является рост антиоксидантной активности синапсом. Подтверждением этому является активация супероксиддисмутазы в синаптосомах коры больших полушарий при лишении крыс ПФС [7]. Причиной несоответствия направлений сдвигов в процессах ПОЛ *in vivo* и *in vitro* может быть изменение условий функционирования системы антиоксидантной защиты. Аналогичные результаты получены при исследовании NADPH-зависимого ПОЛ в микросомах печени [14].

## DYNAMICS OF THE INDUCED LIPID PEROXIDATION IN RAT BRAIN CORTEX SYNAPTOSOMES AFTER SLEEP DISTURBANCE.

TARANOVA N. P., NILOVA N. S.

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

The influence of paradoxical sleep deprivation on free radical lipid peroxidation in rat brain cortex synaptosomes has been studied *in vitro*. This sleep disturbance did not inhibit either ascorbate or NADP-H-dependent lipid peroxidation, but activated NADH-dependent one.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Демин Н. Н. Нейрохимия, т. 1, с. 20—27, 1982.
2. Нилова Н. С. Нейрохимия, т. 2, с. 307—314, 1983.
3. Нилова Н. С. Нейрохимия, т. 3, с. 347—352, 1984.
4. Нилова Н. С. Цитология, т. 26, с. 1396—1400, 1984.
5. Валлимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах, М., Наука, 1972.
6. Милл Д.—В кн.: Свободные радикалы в биологии (под ред. У. Прайор), с. 68—87, М., Мир, 1979.
7. Таранова Н. П., Нилова Н. С. Физиол. журн. СССР, т. 72, с. 1065—1068, 1986.
8. Лаккин В. З.—В кн.: Биохимия липидов и их роль в обмене веществ (под ред. С.Е. Северина), с. 75—95, М., Наука, 1981.
9. Jouvét D., Vimont P., Delorme F., Jouvét M. *Compt. rend. Soc. biol.*, v. 158, p. 756—659, 1964.
10. Hajos F. *Brain Res.*, v. 93, p. 485—489, 1975.
11. Miller G. L. *Anal. Chem.*, v. 31, p. 964, 1959.
12. Аристархова С. А., Бурлакова Е. Б., Засец Т. А. *Вопр. мед. химии* т. 29, № 4, с. 102—105, 1983.
13. Droz B., Rambourg A., Koenig H. K. *Brain Res.*, v. 93, p. 1—13, 1975.
14. Кухтина Е. Н., Глуценко Н. Н., Федоров Ю. Н. *Биохимия*, т. 49, с. 1510—1514, 1984.

Поступила 11. II 1988



УДК 577.11:599.323.4.611.81:615.263.64

ОСОБЕННОСТИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА МОЗГА  
МЫШЕЙ С РАЗЛИЧНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ К КОРАЗОЛУ

МОИСЕЕВ И. Н.

Одесский государственный медицинский институт

Ранее нами было показано, что при «раскачке» мышей путем введения подпороговых доз эпилептогена—коразола у них развивались судорожные реакции от отдельных миоклонических вздрагиваний до развернутых тонико-клонических припадков, которые сопровождалась определенными изменениями активности окислительных ферментов [1, 2]. Было также установлено, что не все экспериментальные животные в равной мере чувствительны к действию субсудорожных доз коразола. Это послужило основанием для проведения настоящей работы, целью которой явилось выяснение вопроса о существовании взаимосвязи между чувствительностью животных к эпилептогену и особенностями окислительного метаболизма клеток мозга.

Опыты проводили на мышах-гибридах /СВА×С57В1/6×BALB/c/F<sub>1</sub> массой 18—22 г. «Раскачку» вызывали ежедневными (в течение 14 суток) внутрибрюшинными инъекциями субсудорожных доз коразола—30 мг/кг в объеме 0,1 мл. Животным контрольной группы инъекцировали физиологический раствор в том же объеме. Подопытные животные в зависимости от чувствительности к эпилептогену были распределены в 3 группы: в I группу включены мыши, резистентные к коразолу (РК-мыши); во II вошли животные со средней чувствительностью к нему (СЧК-мыши), у которых в ответ на введение конвульсанта наблюдались вздрагивания или же клонические судороги, но отсутствовали припадки; III группу составили особи, чувствительные к коразолу (ЧК-мыши), у которых после инъекций развивались также и судорожные припадки.

По окончании эксперимента животных декапитировали. Сравнимые участки головного мозга контрольных и подопытных мышей располагали на столике микротомы для совместного резания, замораживали в жидком азоте и переносили в криостат. На срезах (10 мкм) гистохимически определяли активность дегидрогеназ: глутамата (ГДГ), сукцината (СДГ), малата (МДГ), глюкозо-6-фосфата (Г-6-ФДГ) и NADH-тетразо-

лий-редуктазы по методу Лойды и соавт. [3], а также изоферментов лактатдегидрогеназы (Н- и М-формы АДГ) по методу Gerebizoff [4]. Активность ферментов определяли на цитофотометре МЦФВ-1 двухволновым методом при длинах волн 550 и 640 нм. Объектом исследования служили нейроны и глиальные клетки V—VI слоев сенсомоторной зоны коры.

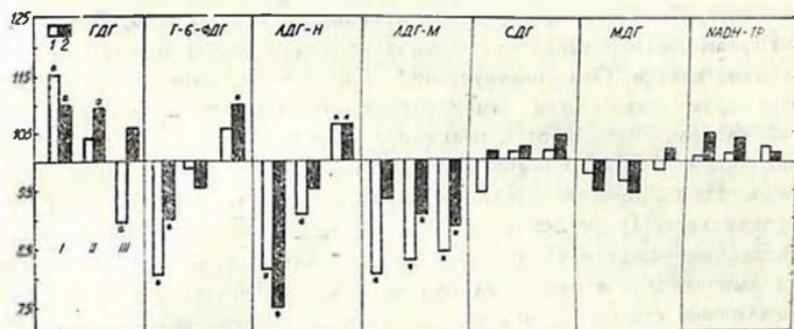


Рис. Изменения активности дегидрогеназ в клетках коры больших полушарий головного мозга мышей с различной чувствительностью к коразолу. \*—обозначение достоверности различий; I—нейроны, 2—глии; I—группа резистентных мышей, II—группа мышей со средней чувствительностью к коразолу, III—группа мышей, чувствительных к коразолу

Цитофотометрия срезов мозга РК-мышей после введения коразола показала наличие определенных сдвигов активности ферментов в сравнении с контрольной группой животных (рисунок). Так, рост активности ГДГ в нейронах (на 16%;  $p < 0,001$ ), глии (на 10%;  $p < 0,05$ ) сочетался со снижением активности следующих ферментов: Г-6-ФДГ в нейронах (на 20%;  $p < 0,001$ ), глии (на 11%;  $p < 0,05$ ), АДГ-Н в нейронах и глии (соответственно на 19 и 23%;  $p < 0,001$ ) и АДГ-М в нервных клетках (на 19%;  $p < 0,001$ ). В клетках мозга СЧК-мышей изменения активности ферментов имели такую же направленность, как и в предыдущей группе. Достоверно отличались от соответствующих контрольных величин значения активности: ГДГ в глии (повышение на 9%;  $p < 0,05$ ), АДГ-Н в нейронах (снижение на 8%;  $p < 0,001$ ) и АДГ-М в нейронах и глии (снижение на 17 и 9% соответственно;  $p < 0,01$ ). В группе ЧК-мышей, наоборот, было отмечено снижение активности: ГДГ в нейронах (на 12%;  $p < 0,01$ ), АДГ-М в нейронах и глии (на 15 и 11% соответственно;  $p < 0,01$ ). Возрастала активность АДГ-Н в обоих видах клеток (на 7%;  $p < 0,05$ ) и Г-6-ФДГ в глии (на 10%;  $p < 0,01$ ).

Полученные результаты показали, что животные подопытных групп отличались от таковых контрольной по некоторым показателям окислительного метаболизма. Вместе с тем, сдвиги активности дегидрогеназ в мозгу РК- и СЧК-мышей хотя оказались разными по величине, но были односторонними. Характер же изменений, установленных в клетках мозга особей, чувствительных к действию коразола, был совершенно иной. В связи с этим было сочтено возможным ограничиться сопоставлением

преимущественно резистентных и чувствительных к эпилептогену животных.

Анализируя полученные результаты, нельзя было не обратить внимания на тот факт, что величины активности ферментов цикла Кребса и НАДН-тетразолий-редуктазы (основных энергообразующих систем в клетках) в подопытных и контрольной группах животных достоверно не отличались. Различия наблюдали в активности ГДГ, Г-6-ФДГ и АДГ.

Глутаматдегидрогеназная реакция занимает особое положение в метаболизме клеток. Она участвует не только в образовании аммиака, но и контролирует катаболизм аминокислот, сопрягая его с энергетическим метаболизмом. Выгоды от окисления глутамата очевидны, поскольку образующийся в этой реакции  $\alpha$ -кетоглутарат является субстратом цикла Кребса. Нам представляется, что характер сдвигов активности ГДГ в нейронах коры (у резистентных к судорогам особей—повышение, у чувствительных—снижение) является не случайным, а отражает долю участия аминокислот в окислительном метаболизме клеток мозга животных с различной степенью чувствительности к эпилептогену. Существенно также, что активность ГДГ нейронов РК- и СЧК-мышей была выше, а в группе ЧК-особей—ниже уровня контроля. В нейроглии названных групп животных активность ГДГ, как правило, превосходила контрольные величины. Вместе с тем, нами было показано, что по мере усиления судорог в более позднем периоде «раскачки» активность данного фермента значительно снижалась в обоих видах клеток коры [2]. Эти результаты позволяют высказать предположение, что клетки нейроглии более резистентны к действию эпилептогена, чем нейроны.

Сдвиги активности Г-6-ФДГ также оказались разнонаправленными: у РК-мышей активность фермента была ниже, а у ЧК-особей—выше соответствующих контрольных величин. Изменения активности АДГ (имеется в виду ее Н-форма) в мозгу сопоставляемых групп мышей оказались аналогичными сдвигам активности Г-6-ФДГ и противоположными в случае ГДГ. Асимметричность сдвигов активности Г-6-ФДГ и АДГ-Н относительно значений ГДГ наводит на мысль о существовании обратной корреляции между показателями активности названных ферментов мозга животных с различной чувствительностью к эпилептогену.

Г-6-ФДГ является ферментом прямого пути окисления глюкозы, который в общем балансе энергетического обмена в клетках выполняет второстепенную роль, однако в условиях повышенных нагрузок значение этого пути метаболизма глюкозы может существенно возрастать [5, 6]. Что касается АДГ-Н, то данный изофермент сдвигает лактатдегидрогеназную реакцию в сторону образования пирувата [7] и таким путем интенсифицирует процесс аэробного окисления углеводов. Следовательно, функциональное значение обоих ферментов заключается в усилении катаболизма углеводов.

Таким образом, проведенные исследования показали наличие связи между чувствительностью животных к судорожному агенту и спецификой окислительного метаболизма. Мыши, в мозгу которых в ответ на дейст-

вие эпилептогена активировались ферменты окисления углеводов, характеризовались высокой судорожной готовностью. И, напротив, особи, клетки мозга которых в указанных условиях переключались на окисление аминокислот, оказались резистентными или же более устойчивыми к судорожному агенту. Понимая всю сложность проблемы противосудорожной устойчивости мозга, все же необходимо подчеркнуть, что обнаруженные нами индивидуальные различия окислительных реакций при эпилептогенезе не случайны, а обусловлены действием антиэпилептических механизмов клеток мозга.

Данные настоящего исследования, на наш взгляд, могут иметь определенное значение в плане изучения патогенеза судорожного синдрома и разработки принципов метаболической терапии.

## PECULIARITIES OF BRAIN OXIDATIVE METABOLISM IN MICE WITH DIFFERENT SENSIBILITY TO CORAZOL TREATMENT

MOISEEV I. N.

Medical School, Odessa

Dehydrogenase activity was measured by cytophotometrical method: glutamate (GDH), succinate (SDH), malate (MDH), glucose-6-phosphate (G-6-PhDH), H- and M-forms of lactate dehydrogenase (LDM) and NADH-tetrazol-reductase of neurons and neuroglia of sensory-motor zone of brain cortex in mice subjected to corazol treatment—*intra-abdominal* corazol injections (30 mg/kg b. w., 14 days running). Three groups of animals have been studied: 1-st group was composed of mice resistant to epileptogen, 2-nd and 3-rd- with moderate and high sensibility to it respectively.

Data obtained indicate that in mice resistant to and with moderate sensibility to corazol the activity of enzymes involved in amino acid oxidation processes increases while that of the enzymes of carbohydrates oxidation decreases in brain cells.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Моисеев И. Н., Шандра А. А., Голлевский Л. С. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 97, № 4, с. 418—420, 1984.
2. Крыжановский Г. Н., Моисеев И. Н., Шандра А. А., Макулькин Р. Ф., Голлевский Л. С. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 101, № 1, с. 13—15, 1986.
3. Лойла Э., Госсрау Р., Шиблер Т. Гистохимия ферментов. Лабораторные методы, М., Мир, 1982.
4. Gerebtzoff M. A. Compt. rend. Soc. biol., v. 150, № 6, p. 1323—1325, 1966.
5. Хачатрян Г. С. V Всесоюз. конф. по нейрохимии, тезисы докл., с. 77—79, Тбилиси, 1968.
6. Хачатрян Г. С. Биохимия головного мозга при нормальных физиологических условиях. Гексомонофосфатный шунт в мозгу. Ереван, Айастан, 1967.
7. Брумберг В. А., Певзнер Л. Э. Нейрохимия изоферментов. Л., Наука, 1975.

Поступила 13. I 1988



## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 612.018:591.481.1

ВЫДЕЛЕНИЕ ИНСУЛИНА ИЗ ТКАНИ МОЗГА КРЫС И  
ЕГО БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

БОНДАРЕВА В. М., ЛЕЙБУШ Б. Н., РУСАКОВ Ю. И.

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

Методом ИОХ с использованием сульфокатионита КУ-23 из целого мозга крыс выделен и очищен инсулин. Полученный гормон по физико-химическим и иммунным свойствам имеет близкое сходство с панкреатическим инсулином. По данным радиоиммунологического анализа, содержание инсулина мозга в 6 раз превышает уровень гормона в периферической крови. Препарат инсулина мозга связывается с рецепторами плазматических мембран печени, не отличаясь в этом отношении от панкреатического инсулина.

Присутствие в ткани мозга пептидов, сходных по биологическим свойствам с гормонами, выделяемыми периферическими эндокринными железами, в настоящее время является установленным фактом. К числу нейропептидов инсулин отнесен сравнительно недавно, несмотря на то, что его физиологическая роль в организме изучена наиболее полно. Из-за невозможности прохождения инсулина через ГЭБ нервную ткань не отнесли к числу объектов, регулируемых этим гормоном.

Стимулом к поискам инсулина в нервной ткани послужило обнаружение в ней инсулиновых рецепторов [1, 2], а позднее — их выделение и очистка [3]. Естественно, возник вопрос, какова функция рецепторов, если панкреатический гормон, циркулирующий в крови, не доступен большей части мозга.

Первая попытка идентификации инсулина мозга была предпринята в 1978 году [4]. В головном мозгу крыс был обнаружен белок, близкий по биологическим свойствам панкреатическому инсулину, в количестве, в 25 раз превышающем уровень гормона в периферической крови. Примечательным оказалось и неравномерное распределение гормона в отдельных областях мозга: наибольшее в гипоталамусе и в обонятельных луковицах и наименьшее в коре больших полушарий. В последующем инсулин мозга был обнаружен у других млекопитающих [5, 6], человека [7], а также в культурах клеток нейронов [8].

Для выделения инсулина из мозговой ткани обычно используется экстракция кислым этанолом с последующей очисткой экстрактов гель-фильтрацией на сефадексах или концентрированием методом гидрофобной адсорбции. Оценку количества инсулина в выделенном материале производят радиоиммунологическим методом. При этом результаты оказываются противоречивыми. Так, количество инсулина, приводимое авторами для ткани мозга крыс, различается более чем в 50 раз: от 0,2 до 11 нг/г ткани [4—6, 9]. Следует подчеркнуть, что количественная оценка инсулина в мозгу принципиально важна; о синтезе гормона в нервной ткани можно говорить только в том случае, если его уровень в ЦНС определенно выше уровня гормона в периферической крови. Противоречия в оценке количества инсулина в ткани мозга можно объяснить особенностями методов, применяемых для его выделения. Кислотно-этаноловые экстракты содержат большое количество белков, присутствие которых может исказить результаты определения инсулина радиоиммунным методом. Гель-фильтрация экстрактов и применяемые варианты гидрофобной адсорбции гормона не гарантируют освобождения от сопутствующих белков, что делает необходимым расширить круг методов, применяемых с целью идентификации инсулина в ЦНС.

### Материалы и методы

Для решения вопроса о содержании инсулина в ткани мозга нами был применен метод ИОХ, разработанный в лаборатории для получения инсулина из эндокринной ткани, с использованием отечественного катионообменника КУ-23 [10]. Основное преимущество сульфокатионита КУ-23 заключается в избирательной сорбции инсулина из солянокислых экстрактов тканей и возможности проведения последующих этапов очистки гормона непосредственно на колонке.

Ткань целого мозга (крысы линии *Wistar*) гомогенизировали в 20-и объемах солянокислого этанола. Экстракцию осуществляли при комнатной температуре в течение 4-х ч. Осветленные центрифугированием экстракты (3500 г, 20 мин) налили на колонку (32×1 см), заполненную катионитом в  $H^+$  форме. В работу брали партию смолы, не использованную ранее. Последующие этапы обработки комплекса инсулин-катионит состояли из обезжиривания (70%-ным этанолом), отмывки от балластных белков (0,5 М раствор  $CH_3COOH$ ), элюции инсулина (0,2 н. аммонийным буфером, рН 9,4). Контроль состава элюатов осуществляли при 280 нМ. В тех же условиях мы выделили инсулин из поджелудочной железы крыс, а также поставили контроли с обработкой на КУ-23 коммерческого кристаллического инсулина как стандарта. Было найдено, что при хроматографии кислотно-этаноловых экстрактов ткани мозга на колонке с КУ-23 четкий белковый пик обнаруживается в той же области, что и стандарт; в этой же зоне выходил белковый пик при обработке панкреатического экстракта. Элюаты объединяли во фракции согласно пикам на кривой. Далее проводили дополнительное осаждение балластных белков ступенчатым доведением рН полученных фракций до 2,0 и после добавления

ацетона (20% от объема раствора) до 4,0. Через 24 ч раствор центрифугировали (3500 г, 20 мин) и надсадочную жидкость лиофилизировали.

Для обессоливания полученных препаратов инсулина гель-фильтрацию проводили на сефадексе G-25. Колонку (52×1,6 см) уравнивали раствором 1 М уксусной кислоты, этим же раствором элюировали нанесенные на колонку образцы фракций, полученных при хроматографии на сульфокатионите. Детектирование проводили в проточной кювете спектрофотометра СФ-26 при 280 нм, элюаты, хорошо выраженные пики в зоне выхода инсулина, объединяли и лиофилизировали.

Инсулин во фракциях определяли твердофазным радиоиммунологическим методом [11] с использованием в качестве стандарта свиного инсулина (Ely Lilly, США, партия PJ 7214).

## Результаты и обсуждение

Разбавление элюатов из ткани мозга крыс приводит к пропорциональному уменьшению в них количества определяемого инсулина (рис. 1, а); ход калибровочной кривой (рис. 1, б, 1) не изменяется при добавлении к стандартным концентрациям инсулина равных количеств элюата мозга (рис. 1, б, 2); ход кривой не изменяется при добавлении к стандарту элюата поджелудочной железы крыс (рис. 1, б, 3). Результаты этих опытов свидетельствуют, во-первых, об иммунологическом сходстве выделенного из ткани мозга инсулина с панкреатическим гормоном крыс, во-вторых, указывают на правомерность тестирования его в данной радиосимпунной системе. Кроме того, было показано, что полученный материал вытесняет инсулин [<sup>125</sup>I], специфически связанный с плазматическими мембранами печени крысы, не отличаясь в этом отношении от стандартного свиного инсулина (рис. 2). Это свидетельствует о его способности связываться с рецепторами инсулина в данной ткани, что является дополнительным доводом в пользу инсулиновой природы выделенного из мозга гормона.

Данные о содержании инсулина, выделенного из ткани мозга и поджелудочной железы крыс, приводятся в таблице. Для сравнения указано количество иммунореактивного инсулина в сыворотке крови крыс, измеренное в той же радиосимпунной системе. Как видно из таблицы, содержание инсулина в ткани целого мозга крыс в 6 раз превышает уровень гормона в крови. Даже без учета потерь (свыше 50%), неизбежных в процессе экстракции ИОХ и гель-фильтрации, концентрация инсулина в ткани мозга значительно выше его уровня в периферической крови, что согласуется с данными ряда авторов [4, 5].

Как указывалось выше, метод очистки инсулина с помощью сульфокатионита позволил ранее выделить из островковой ткани ряда животных инсулин высокой чистоты, что подтверждено при расшифровке аминокислотной последовательности в их молекуле [12]. С большой долей вероятности мы можем утверждать, что инсулин, выделенный из мозга крыс на смоле КУ-23 с проведением тех же стандартных процедур, является

высокоочищенным, и определение его количества радиоиммунным методом отражает с достаточной точностью его действительное содержание в мозговой ткани.

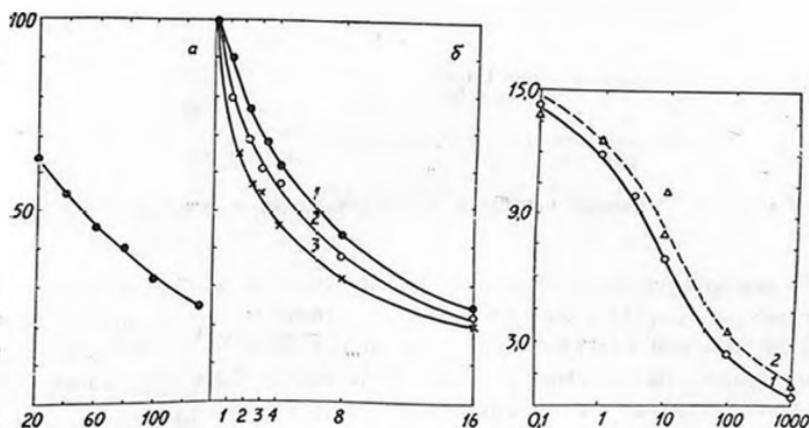


Рис. 1. Радиоиммунологическое определение инсулина в элюатах мозга и поджелудочной железы: а—кривая зависимости иммунной активности инсулина мозга от количества препарата. По оси абсцисс—объем в мкл, по оси ординат—% связанного инсулина; б—1—стандартная кривая коммерческого инсулина; 2—стандартная кривая коммерческого инсулина с добавлением элюата мозга (1:40); 3—стандартная кривая коммерческого инсулина с добавлением элюата поджелудочной железы (1:32000). По оси абсцисс—концентрация немеченого инсулина в нг, по оси ординат—% связанного инсулина

Рис. 2. Связывание инсулина [ $^{125}$ I] плазматическими мембранами печени крысы в присутствии возрастающих концентраций стандартного инсулина (1) и препарата инсулина мозга (2). По оси абсцисс—инсулин нг/мл, по оси ординат—% связывания инсулина [ $^{125}$ I]

Вопрос о происхождении инсулина в ЦНС является дискуссионным. Некоторые авторы, не выявившие в мозгу инсулина в количествах более высоких, чем в плазме крови, полагают, что ими определяется инсулин, находящийся в сосудистом пространстве мозга [6]. Полученные нами результаты, как и данные ряда других исследователей [4, 5], не позволяют согласиться с такой точкой зрения. В пользу того, что инсулин синтезируется в ЦНС, помимо количественных расчетов, свидетельствуют и такие факты, как независимость уровня инсулина мозга от колебаний его концентраций в крови [13], цитохимическое обнаружение инсулина в нейронах [4, 8], а также недавно полученные данные о том, что у 5% растущих *in vitro* клеток мозга имеется РНК, способная к гибридизации с инсулиновым геном [14].

Физиологическое значение инсулина в ЦНС не ясно. Высказывается предположение, что инсулин в мозгу может выполнять функции нейротрансмиттера или нейромодулятора [15]. Кроме того, значительное количество гормона, обнаруживаемое в ткани растущего мозга и в культуре

растущих нейронов [8], позволяет предположить, что гормон важен для регуляции роста ткани.

Таблица

Содержание иммунореактивного инсулина в сыворотке крови, ткани мозга и поджелудочной железе крыс

Сыворотка крови (нг/мл)	1,26±0,05
Ткань целого мозга (нг/г сырого веса)*	7,57±1,53
Поджелудочная железа (нг/г сырого веса)*	11700±2600

Примечание. \* Данные приведены без учета потерь в процессе экстракции и очистки.

В заключение можно сказать, что полученные нами результаты количественного определения инсулина согласуются с концепцией об относительно высоком содержании гормона в головном мозгу крыс, а метод хроматографии на сульфокатионите КУ-23 может быть использован для выделения инсулина из внепанкреатических тканей.

## RAT BRAIN INSULIN: ISOLATION AND BIOLOGICAL CHARACTERISTICS

BONDAREVA V. M., LEIBUSH B. N., RUSAKOV Yu. I.

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

Rat brain insulin has been isolated by means of ion-exchange chromatography on cation exchange resin KU-23. Its physico-chemical and immunological properties are similar to those of pancreatic insulin. The insulin content in the brain (radioimmune assay) is 6-fold higher, than in the blood. Brain insulin binds to the specific receptors in liver cell membranes, the affinity being equal to that of pancreatic insulin.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Havrankova J., Roth J., Brownstein M. *Nature*, v. 272, № 5656, p. 827-829, 1978.
2. Лейбуш Б. Н. *Журн. эволюц. биохимии и физиологии*, т. 19, № 4, с. 407-413, 1983.
3. Roth R. A., Morgan D. O., Buechedoin J., Vicki Sara J. *Biol. Chem.*, v. 261, № 8, p. 3753-3757, 1985.
4. Havrankova J., Schmechel D., Roth J. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Biol. Sci.*, v. 75, № 11, p. 5737-5741, 1978.
5. Stevenson R. W. *Horm. Metab. Res.*, v. 15, № 11, p. 526-528, 1983.
6. Eng J., Yalow R. *Diabetes*, v. 29, № 2, p. 105-109, 1980.
7. Dorn A., Bernstein H. G., Rinne A., Hahn H. J., Zeitler M. *Histochem.*, v. 74, № 2, p. 293-300, 1982.

8. *Ratzada M. K.* Exp. Cell. Res., v. 143, № 2, p. 351—357, 1983.
9. *Baskin D. G., Parte D., Guest K., Dorsa D. M.* Endocrinol., v. 112, № 3, p. 878—903, 1983.
10. *Руссаков Ю. И., Бондарева В. М.* Журн. эволюц. биохимии и физиологии, т. 15, № 2, с. 136—140, 1979.
11. *Асйбуш Б. Н.* Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 72, № 11, с. 89—91, 1971.
12. *Руссаков Ю. И., Карасев В. С., Перцева М. Н., Панков Ю. А.* Биохимия, т. 52, № 2, с. 247—254, 1987.
13. *Havránková J., Roth J., Brownstein M. J.* J. Clin. Invest., v. 64, № 2, p. 636—642, 1979.
14. *Cooper D., Clarke D., MacLaren N., Ratzada M., Stein J., Stein G.* Red. Proc. Abst., v. 44, № 3, p. 435, 1985.
15. *Puro D. G., Agardh E.* Science, v. 225, № 4667, p. 1170—1172, 1984.

Поступила 1. XII 1987

Избранные работы по нейрохимии. 580 с., 1985. Selected topics from neurochemistry (ed. N. N. Osborne), Pergamon Press, Oxford, G. B. 580 p., 1985.

Книга содержит современные версии работ, завоевавших популярность при первой начальной публикации их в «*Neurochemistry International*». Статьи эти привлекают внимание к достижениям в специфических сферах, возможно, не слишком близких читателю тем, что связывают в единое целое наблюдения из широкой области, открывающие новые направления, раскрывают авторскую позицию относительно противоречивых проблем или содержат критический анализ широко распространенных и ставших догматическими принципов в нейронауках. В сборник включены статьи: Н. Hillman «Некоторые фундаментальные, теоретические и практические проблемы, связанные с нейрохимическими исследованиями на млекопитающих»; А. Hardy, P. R. Dodd «Метаболические и функциональные посмертные исследования человеческого мозга»; N. N. Osborne «Связи между нейронами: современные концепции»; J. R. Coopers, E. M. Meyer «Возможные механизмы, вовлекающиеся в высвобождение или модулирующие высвобождение нейроактивных агентов»; В. Н. Wainer et al. «Холинэргические системы в человеческом мозгу, идентифицированные с помощью антител к холинацетилтрансферазе»; S. R. Maxs, G. J. Markelonis «Нейрональный контроль мышц»; U. Havemann, K. Kuschinsky «Нейрохимические аспекты вызываемой опиоидами кататонии»; В. E. Leonard «Современное состояние теории о роли биогенных аминов в возникновении депрессии»; F. V. DeFeudis «ГАМК-ергические системы и поведение питания»; F. V. DeFeudis «ГАМК и нейрокардиоваскулярные механизмы»; F. V. DeFeudis «Влияние физиологических агентов на процессы связывания ГАМК».

Книга представляет значительный интерес для нейрохимиков, неврологов и невропатологов.



## СВОЙСТВА, РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ ТРИПТОФАНГИДРОКСИЛАЗЫ МОЗГА

ПОПОВА Н. К., ЖАНАЕВА Е. Ю.

Институт цитологии и генетики Сибирского отделения  
АН СССР, Новосибирск

В обзоре обобщены данные о триптофангидроксилазе (ТПГ)—ферменте, лимитирующем скорость синтеза серотонина, и показано ее значение в генетической регуляции серотонинзависимых форм поведения.

Рассмотрены биохимические свойства ТПГ мозга, действие естественных регуляторов ТПГ в организме (субстратов, гормонов и опосредуемых через ионы кальция воздействий), основные пути физиологической регуляции ТПГ—через субстраты фермента и через  $Ca^{2+}$ -кальмодулинзависимую протеникиназу.

Обобщены собственные экспериментальные материалы, свидетельствующие об участии ТПГ в регуляции ряда поведенческих реакций и физиологических функций организма животных: агрессивного поведения, катаlepsии, возникновения постстрессорных нервных дистрофий желудка, гипотермии и зимней спячки. Приведены данные о генетическом контроле активности ТПГ в мозгу мышей. Выдвинуто предположение о ключевой роли ТПГ в генетической регуляции функциональной активности серотониновой системы мозга и, соответственно, в генетическом контроле регулируемых серотонином функций и форм поведения.

Считается твердо установленным, что ТПГ является лимитирующим ферментом биосинтеза серотонина и в мозгу встречается исключительно в серотониновых нейронах. Ранние работы по изучению ТПГ были посвящены главным образом биохимическим механизмам регуляции фермента. Вкратце часть этих работ изложена в книге Поповой и соавт. [1] и в более полном обзоре Луценко и Суворова [2]. В начале 80-х годов интерес к ТПГ возрос, и было выполнено множество исследований, расширивших представления о регуляции ТПГ и ее роли в регуляции серотонином некоторых физиологических реакций и форм поведения.

Настоящий обзор представляет собой обобщение сведений о ТПГ, особенно полученных в последние годы, при этом существенное внимание уделено роли ТПГ в генетическом контроле серотониновой системы и в серотонинзависимых функциях.

ТПГ (КФ 1.14.16.4)—триптофан-5-монооксигеназа: L-триптофан, тетрагидроптеридин: кислород-оксидоредуктаза (5-гидроксилирующая)—фермент, катализирующий реакцию:

L-триптофан +  $\text{BH}_4 + \text{O}_2 \rightarrow$  5-гидрокситриптофан +  $\text{BH}_2 + \text{H}_2\text{O}$ , где  $\text{BH}_4$ —тетрагидробиптерин, восстановленная форма кофактора ТПГ,  $\text{BH}_2$ —дигидробиптерин, окисленная (хиноидная) форма [3]. С искусственными кофакторами (диметилтетрагидроптеридином и 6-метилтетрагидроптеридином) реакция имеет ту же стехиометрию [4]. Полагают, что  $\text{BH}_4$  является естественным кофактором ТПГ [3, 5]. В его присутствии величина  $K_m$  для триптофана близка к концентрации этой аминокислоты в мозгу [6]. Тем не менее, при анализе предпочитают пользоваться искусственными кофакторами, которые гораздо устойчивее естественного (особенно диметилтетрагидроптеридин).

Из-за нестабильности фермента, усиливающейся даже при очистке в мягких условиях [7], невозможно адекватно описать его кинетические свойства. ТПГ лабильнее любого фермента биосинтеза катехоламинов, при 20° ТПГ мозга человека активна всего около 2-х ч [8]. Источником нестабильности ТПГ служат эндогенные протеазы [4, 7, 9], способные как дестабилизировать, так и стабилизировать ее.

Поскольку ТПГ катализирует сложную реакцию, включающую три субстрата и два продукта, а механизм реакции неясен [10], правильнее говорить о кажущейся величине  $K_m$ , которая дает лишь формальное представление о зависимости реакционной скорости от концентрации субстрата. Кинетические параметры ТПГ, измеренные при разных кофакторах и разными методами анализа, несопоставимы между собой, и только в условиях одного и того же эксперимента они приобретают смысл. Нередко данные об изменениях величин  $K_m$  и  $V$ , которыми авторы пытаются объяснить изменения активности ТПГ в опыте, противоречивы. Это еще раз подчеркивает, что к интерпретации значений  $K_m$  и  $V$  следует относиться с осторожностью.

Механизм образования фермент-субстратного комплекса остается неизвестным, слабо изучены каталитический и аллостерический центры фермента. Неизвестны ни аминокислотный состав, ни пространственное положение этих активных центров. Работы ограничивались поиском агентов, изменяющих активность ТПГ через влияние на активные центры. Было показано, что активность ТПГ может быть модифицирована в широких пределах, по-видимому, в зависимости от ионных связей ферментного белка с другими полиэлектролитами [11]. Например, гепарин увеличивает активность ТПГ в 2 раза, декстрансульфат—в 4 раза, хотя остается неясным, могут ли повлиять эти полиэлектролиты на ТПГ в условиях строгой компартментализации внутри нейрона. Другие полисахариды (хондритинсульфат, дерматансульфат, гиалуроновая кислота), а также полнанионы ДНК, гликоген не изменяют активности фермента.

Известно, что в молекулу ТПГ встроены двухвалентные ионы железа [2], причем железodefицитный рацион, вызывающий снижение неге-

мского железа в мозгу крыс на 60%, не отражается на активности ТПГ [12], что наводит на мысль о прочности связи  $Fe^{2+}$  с ферментом. Кроме них, в ТПГ содержатся другие ионы металлов, которые удаляются при низких концентрациях ЭДТА, отчего активность фермента повышается до 30 раз [13].

Каталитическая активность ТПГ в большой степени зависит от молекулярного кислорода, который изменяет окислительно-восстановительный статус меркаптогрупп ( $-SH$ ) и мест связывания  $Fe^{2+}$ , расположенных, по всей видимости, на каталитическом центре ТПГ, связывающем триптофан [14]. При окислении этих групп фермент инактивируется, а в присутствии дитиотреитола и солей двухвалентного железа его активность восстанавливается. Существование в организме такого механизма регуляции показано для ряда ферментов и вполне вероятно для ТПГ.

Активный центр ТПГ, в котором происходит последовательное связывание субстратов, чувствителен к соединениям, имеющим структуры  $\beta$ -триона и катехола [15], которые ингибируют образование фермент-субстратного комплекса, вероятнее всего, на стадии связывания с тетрагидроптериневым кофактором.

Из системы аллостерической регуляции активности ТПГ известен пока один элемент [16]. Авторы полагают, что активирующий белок встроен в клеточную мембрану и посредником между ним и ферментом является сульфгидрильное соединение. В клетке ТПГ связана с цитоплазматическими мембранами и органеллами [11, 17], по-видимому, не только через этот, а через целый ряд мембранных белков.

Существование изоформ ТПГ в мозгу крысы [18] не было подтверждено [4, 19]. Вместе с тем, ТПГ из среднего мозга крысы и из злокачественных опухолей тучных клеток мыши [14, 20] существенно различаются. Выделенная из опухоли ТПГ представляет собой, по сути, форму мозговой ТПГ, лишенную некоего ингибитора, в результате чего опухолевый фермент характеризуется меньшей величиной  $M_r$ , высокой активностью и нечувствительностью к блокаторам. Те же свойства проявляет опухолевая ФДЭ сАМР [20], и не исключено, что эти черты вообще характерны для ферментов в опухолевых клетках.

Периферическая ТПГ, в отличие от центральной, остается практически неизученной, хотя в тучных клетках и энтерохромаффинных клетках желудочно-кишечного тракта серотонина гораздо больше, чем в ядрах шва мозга [1]. Причиной этого является отсутствие метода выделения ТПГ, разрушающейся в агрессивной среде пищеварительных клеток.

## 2. Механизмы регуляции активности триптофангидроксилазы

Существует ряд фармакологических препаратов, оказывающих влияние на серотониновую систему мозга, в том числе избирательно изменяющих активность ТПГ [1, 2]. Особый интерес для понимания регуляции активности фермента в организме представляют естественные физиологические регуляторы ТПГ.

По имеющимся данным, ТПГ мозга млекопитающих является ферментом, который в норме неполностью насыщен аминокислотным субстратом [21]. Это дало основание предположить, что не активность ТПГ, а уровень триптофана в мозгу лимитирует биосинтез серотонина. Выяснению этого вопроса было посвящено несколько противоречивых работ [6, 21—23]. Не вызывает сомнений лишь тот факт, что повышение содержания триптофана в организме приводит к увеличению синтеза серотонина в мозгу. Однако для возрастания активности ТПГ недостаточно однократного введения триптофана [24, 25], его нужно вводить повторно [24]. Для получения эффекта необходима целостность нейронов, поскольку *in vitro* он не воспроизводится [3]. Допускают [3], что триптофан при продолжительном введении либо стабилизирует ТПГ, либо увеличивает ее синтез *de novo*. Сниженный уровень предшественника также приводит к росту активности ТПГ, что, по мнению ряда авторов [25, 26], является компенсаторным механизмом, благодаря которому синтез серотонина остается на прежнем уровне.

ТПГ в мозгу, по-видимому, также не насыщена кислородом [27]. Уровень триптофана и содержание кислорода в ткани мозга односторонне воздействуют на активность ТПГ: с ростом концентрации триптофана величина  $K_m$  для кислорода падает, что отражает облегчение условий связывания ТПГ с кислородом [28].

И, наконец, третий субстрат ТПГ—кофактор тетрагидробиоптерин—также содержится в мозгу в недостаточном для ТПГ количестве [5]. Это подтверждают работы с введением крысам в желудочки мозга натурального кофактора [29], когда выявляется резерв повышения активности ТПГ сверх нормального уровня. По-видимому, неслучайно и совпадение распределения по структурам мозга уровня  $\text{BH}_4$  и активности ТПГ [5]. Влияния триптофана и кофактора на активность ТПГ тоже согласованы между собой, так как синтез  $\text{BH}_4$  в мозгу находится под контролем моноаминов, в том числе серотонина, и некоторых аминокислот, в том числе триптофана [5]. Поэтому повышение концентрации триптофана приводит к скачку активности ТПГ не только само по себе, но и через увеличение средства к двум другим субстратам ТПГ.

Обращает на себя внимание то, что существуют механизмы, предотвращающие чрезмерное повышение любого из трех субстратов и быстро возвращающие систему в равновесие. При увеличении уровня триптофана возрастает количество серотонина, продолжительно ингибирующего нейронную активность шва по механизму отрицательной обратной связи [26]. Кофактор в повышенной концентрации дестабилизирует ТПГ и таким образом маскирует свое активирующее влияние на фермент [30]. При высокой концентрации кислорода ТПГ обнаруживает неустойчивость, обратимую, впрочем, после 20—24 ч анаэробной инкубации в присутствии  $\text{Fe}^{2+}$  и дитиотрептола, которые эффективно защищают каталитический центр ТПГ от разрушающего воздействия молекулярного кислорода [9].

Другим естественным путем регуляции активности ТПГ является протеинкиназный путь. Изменения внутринейронального содержания

$\text{Ca}^{2+}$  [31, 32], усиление фосфорилирования белков путем введения АТР,  $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{Ca}^{2+}$  [33], деполяризация мембраны нейрона с помощью  $\text{K}^+$  [33, 34] имеют общий конечный результат—количество кальция в клетке резко возрастает. Это приводит к активации  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой протеникиназы, которая фосфорилирует ТПГ и таким образом повышает ее активность [33, 34]. Предполагается, что активация ТПГ более высокими миллимолярными концентрациями  $\text{Ca}^{2+}$  происходит с участием нейтральной протениназы, расщепляющей тетрамер ТПГ на ди- или мономеры [32], либо с участием других протеаз [35].

Активация ТПГ низкими концентрациями  $\text{Ca}^{2+}$  является кальмодулинзависимым процессом [14, 36]. Совершенно по другому механизму ТПГ может активировать и сАМР-зависимая протеникиназа [27, 36, 37], но пока нет убедительных доказательств того, что сАМР-зависимая протеникиназа присутствует внутри серотониновых нейронов [37]. Более того, активация ТПГ аналогами сАМР блокируется при добавлении к срезам мозга антагонистов кальмодулина [38]. Следовательно, наиболее вероятно, что ТПГ фосфорилируется только  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулинзависимой протеникиназой. Эта активированная ТПГ заметно менее стабильна и в течение 1 ч усиленной работы теряет свою активность [7].

Два пути естественной регуляции ТПГ—опосредованные через субстраты и через  $\text{Ca}^{2+}$  являются, по-видимому, конечными этапами всех известных способов влияния на фермент. Была предпринята попытка оценить их биологическое значение. По предположению Натоп и соавт. [39], быстрые изменения активности фермента, связанные с процессом фосфорилирования-дефосфорилирования, осуществляют фазную регуляцию синтеза серотонина в нейронах. Колебания уровня триптофана, приводящие к стимуляции или ингибированию ТПГ, представляют тоническую регуляцию синтеза. Тонический (медленный) тип регуляции проявляется в виде ритма суточных колебаний синтеза серотонина. Быстрые и обратимые фазные изменения активности ТПГ вследствие фосфорилирования, по-видимому, уравнивают интенсивность синтеза серотонина и функциональную активность серотониновых нейронов. Однако суточные ритмы активности ТПГ в разных группах ядер шва у коры [40] не совпадают с колебаниями уровня триптофана в организме [41]. Более того, суточные колебания активности ТПГ в анатомически и функционально связанных структурах не всегда синхронизированы [40]. По-видимому, между уровнем триптофана и суточными ритмами активности ТПГ связь более сложная. Это неудивительно, поскольку уровень субстрата не является единственным регулятором активности фермента.

Примером эффикторов, влияющих на активность ТПГ через триптофан могут служить аминокислоты с небольшими неполярными боковыми цепями: лейцин, изолейцин, валин, аланин, фенилаланин [22, 28], которые конкурируют с триптофаном за места связывания на переносчиках, встроенных в мембраны, включая ГЭБ [2].

Продукт реакции синтеза—серотонин, на первый взгляд, не способен прямо влиять на активность ТПГ [33], в то время как другие гидрок-

силы: ароматических аминокислот находятся под непосредственным контролем конечного продукта. По данным Sawada, Nagatsu [38], роль серотонина в этой обратной связи сводится к блокированию  $Ca^{2+}$ -кальмодулинзависимого механизма активации ТПГ. Накопление избытка серотонина, по-видимому, стимулирует ауторецепторы, сцепленные с кальциевыми каналами, и ограничивает вход  $Ca^{2+}$  в нейрон, тем самым прекращая активирование ТПГ ионами кальция.

Так же ингибируют кальмодулиновую активацию ТПГ некоторые антипсихотические препараты, включая галоперидол [35, 36]. Метаболические яды (цианид, азид, ротенон, гуанидин, дикумарол), напротив, вызывают возрастание активности ТПГ, связанное с выбросом  $Ca^{2+}$  из митохондрий [31].

Наиболее интересной иллюстрацией одного из путей регуляции активности ТПГ является активирование фермента при электрическом возбуждении нейронов [42]. Электрическая стимуляция дорзального ядра шва вызывает увеличение активности ТПГ в коре мозга [43] и других отделах [42], в которых локализируются нервные окончания из этого ядра, и не влияет на ТПГ в гиппокампе, который иннервируется из медианного ядра шва среднего мозга [43]. При этом ТПГ активируется не через доступность субстрата [44] и не через механизм ингибирования конечным продуктом [38]. Колебания уровня триптофана в рационе не изменяют электрофизиологическую активность серотониновых нейронов [45]. Деполаризация нейронов, как известно, сопровождается быстрым входом-выходом ионов из клетки, что может свидетельствовать о  $Ca^{2+}$ -кальмодулинзависимом пути активации ТПГ. К сожалению, доказательства этого предположения пока не получены, хотя многие авторы склоняются к нему [33, 35, 38, 43, 44].

К числу физиологических факторов, способных повлиять на активность ТПГ, относятся гормоны. Однако сведения об их действии неполны и противоречивы по ряду причин. Оказалось невозможным изучать действие гормонов *in vitro*: на ТПГ в синапсах не влияют такие гормоны, как глюкагон, инсулин, вазопрессин [34], в то время как *in vivo* инсулин является регулятором ТПГ. Другая возможная причина—слишком долгий срок от начала эндокринных воздействий до анализа активности ТПГ: ни через 7—9 дней после адrenaлэктомии, тиреоидэктомии, кастрации крыс и ежедневного введения соответствующих гормонов [46], ни через 5 дней ежедневного иммобилизационного стресса у крыс не обнаружено изменений в активности ТПГ [47]. Однако в более короткие сроки (в течение нескольких часов) удалось выявить активирование ТПГ в мозгу крыс глюкокортикоидами [48].

Трудность заключается в том, что выявляются существенные видовые различия в чувствительности ТПГ к действию одного и того же гормона. Например, глюкокортиконы у мышей не оказывают влияния на ТПГ [49, 50], а у крыс повышают ее активность уже через 1 ч [48]. Адrenaлэктомия приводит к значительному падению активности ТПГ лишь у крыс [51].

Видимо, в стимуляции ТПГ кортикостероном участвуют несколько процессов, в частности повышение синтеза фермента и захвата триптофана [22]. Кортикостерон—единственный гормон, для которого показана возможность генетической индукции фермента благодаря постепенно нарастающему в течение 4 ч синтезу новых молекул ТПГ [48]. Более того, существует мнение, что среди серотониновых нейронов мозга у крыс есть такие, которые могут специфически реагировать на глюкокортикоиды и половые гормоны либо быть звеном в механизме обратной связи между гипофизом и железами [52].

Что касается инсулина, то его действие на ТПГ у крыс опосредуется через уровень триптофана в крови. Сам гормон увеличивает в крови концентрацию конкурирующих с триптофаном нейтральных аминокислот с разветвленными боковыми цепями, что снижает возможность триптофана проникнуть через ГЭБ. При диабете ТПГ реагирует на падающий уровень триптофана повышением активности. Тем не менее при введении инсулина интактным крысам, когда содержание субстрата возрастает, ТПГ не отвечает изменением своей активности, и в результате происходит пассивное ускорение метаболизма серотонина [26].

Как известно, наиболее выраженное действие гормоны оказывают в ранние сроки онтогенеза. В период постнатального развития крыс для нормального созревания серотониновой системы необходимо присутствие кортикостерона [50] и тиреоидных гормонов [53]. В противном случае прекращается постепенное наращивание активности ТПГ и содержания серотонина до уровня взрослых крыс, что корректируется заместительной терапией как после адrenaлэктомии [52], так и в случае тиреоидного кригнизма, причем весьма эффективно [53, 54]. Видимо, действие недостатка гормонов на ТПГ в критические периоды можно отнести к неспецифическим влиянием на общий синтез белков.

Другие медиаторные системы мозга, по-видимому, также могут воздействовать на активность ТПГ. Так, спустя 4 ч после внутривенного введения стимулятора  $\alpha_2$ -адренорецепторов значительно увеличивается активность ТПГ за счет V, а после разрушения дофаминовой системы мозга эффект исчезает [55]. Сообщалось и об участии в регулировании активности ТПГ  $\beta$ -адренорецепторов [56].

Не подлежит никакому сомнению роль наследственных факторов в детерминировании активности ТПГ мозга. Значительные отличия в активности фермента у мышей разных линий отмечались неоднократно, хотя большинство исследований было выполнено на 2—3-х линиях мышей [57—61], что не позволяло судить о генетическом разнообразии ТПГ. Более полное исследование межлинейных различий [62, 63] выявило ряд генетически обусловленных закономерностей в свойствах этого фермента и его распределения в мозгу. Нельзя исключить, что мыши могут различаться анатомической структурой серотониновых нейронов [59], однако при сравнении линий C57BL/6J и A/J [60, 61] было обнаружено, что они отличаются по кинетическим параметрам, лабильности, термоустойчиво-

сти: ТПГ, то есть фактически различие касается структуры регуляторной части фермента.

На мышах семи гибридных линий было показано [62], что активность ТПГ в стволе мозга в 2—5.5 раза выше, чем в полушариях, тем не менее, между активностью фермента в стволе и его активностью в полушариях существует высокая генотипическая положительная корреляция, что позволило предположить наличие общего генетического контроля в стволе и полушариях мозга. Это противоречит предположениям о существовании разных изоферментов ТПГ, локализующихся в областях, богатых перикарионами, и в образованиях, где сосредоточены синаптические окончания [64], и подтверждает сложившееся представление о том, что ТПГ синтезируется в перикарионах нейронов и далее аксоплазматическим током поступает в структуры, иннервируемые серотониновыми нейронами. Такая система синтеза ТПГ определяет общий наследственно детерминированный уровень активности ТПГ в мозгу, не исключая того, что при изменении функциональной активности отдельных структур мозга активность фермента в них может изменяться. Например, локальное изменение активности ТПГ было установлено в наших исследованиях на крысах, предрасположенных к развитию катаlepsии. Активность ТПГ оказалась избирательно повышенной в полосатом теле этих животных вне зависимости от того, вызывалась ли катаlepsия фармакологически, развивалась после аудиогенных судорог или предрасположенность к ее возникновению была наследственно детерминирована путем специальной селекции крыс [65, 66]. Локальное изменение активности ТПГ было обнаружено и при уникальном, закрепленном в процессе эволюции адаптивном состоянии—зимней спячке млекопитающих. При впадении в зимнюю спячку золотистых хомячков [67] и краснощеких сусликов [68] было отмечено увеличение активности ТПГ в мозгу. Показано, что изменение активности ТПГ происходило не во всех отделах мозга: при впадении в спячку повышение активности было обнаружено в гиппокампе, а при пробуждении снижение активности ТПГ—в полосатом теле сусликов [68]. Эти образования мозга, по-видимому, играют в механизмах зимней спячки существенную, хотя и различную роль. Ранее на основании электрофизиологических данных и данных о региональных изменениях уровня серотонина [1] было предположено, что гиппокамп относится к структурам, где заложены триггерные механизмы зимней спячки. Полосатое тело является образованием стриаталлидарной системы—центрального регулятора мышечного тонуса. Можно предположить, что изменение в полосатом теле активности ТПГ при пробуждении от зимней спячки является фактором, влияющим на изменение мышечного тонуса. Это подкрепляется данными, свидетельствующими об изменении активности ТПГ в стриатуме у крыс, селекционированных на высокую предрасположенность к катаlepsии [65].

С помощью гибридологического анализа [58, 62], проведенного на мышах с отчетливым различием по активности фермента в мозгу, было показано, что активность ТПГ наследуется аддитивно, и у гибридов пер-

вого поколения сна близка к среднеродительской. Гибридологическим анализом на линиях C57BL/6J и BALB/c (с вдвое более низкой активностью фермента, чем у первой линии) было установлено, что эти различия в активности контролируются моногенно. Майорный ген, определяющий активность ТПГ, является аутосомным, то есть не сцеплен с полом, имеет два аллеля с аддитивным эффектом и определяет структуру фермента или интенсивность его синтеза [61, 69].

Выявленная простая генетическая регуляция не означает, что активность ТПГ определяется только одним геном, но свидетельствует о том, что среди генетического материала, участвующего в синтезе и определяющего активность фермента, существует майорный ген, играющий решающую роль в генетическом контроле активности ТПГ.

Обращает на себя внимание тот факт, что при всей сложности регуляции медиаторов мозга, в том числе и уровня серотонина [70], выявлен моногенный контроль не только для ТПГ, но и для ферментов синтеза катехоламинов—тирозингидроксилазы и дофамин- $\beta$ -гидроксилазы [71].

### 3. Роль триптофангидроксилазы в генетической регуляции серотонинзависимых функций

Поскольку гены контролируют синтез белковых молекул, а большинство соединений с четко установленной медиаторной функцией не являются белками, следует ожидать, что путь от гена к такому признаку, как медиаторная система (если медиатор не является нейропептидом), должен реализовываться через генетическую регуляцию ключевых ферментов метаболизма, медиаторов.

Ключевая роль ТПГ в синтезе серотонина, с одной стороны, и простая генетическая регуляция ТПГ—с другой, дают основание предположить, что генетический контроль серотониновой системы и, соответственно, тех функций и видов поведения, в регуляции которых участвует серотониновая система мозга, может осуществляться путем генетической детерминации активности ТПГ (рисунок).

Для того, чтобы судить о правомерности высказанной гипотезы, необходимо ответить на два принципиально важных вопроса: 1) отражаются ли изменения в активности ТПГ на регулируемых серотонином функциях и на серотонинзависимых видах поведения; 2) если роль ТПГ существенна, то каков вклад генотипа в регуляцию активности ТПГ. О возможности влияния ТПГ на функциональное состояние серотониновой системы мозга свидетельствуют многочисленные данные о действии ингибиторов ТПГ, вызывающих значительные изменения не только в уровне серотонина в мозгу, но и меняющих различные функции и поведение [1]. Однако опыты с применением ингибиторов ТПГ не позволяют ответить на вопрос о влиянии физиологических изменений активности ТПГ, которые находятся в пределах нормы реакции и, очевидно, являются сравнительно небольшими. Тем более эти опыты не отвечают на вопрос о роли наследственных факторов. О том, что генетические влияния на серотониновую систему мозга и регулируемые этой системой

функции могут воплощаться путем изменения активности ТПГ, свидетельствуют исследования, проведенные в нашей лаборатории, в том числе работы на моделях зимней спячки и катаlepsии, описанные выше.

Связь между активностью ТПГ и серотонинзависимыми функциями была обнаружена также при изучении устойчивости к гипотермии мышей инбредных линий [72]. При остром охлаждении у мышей большинства изученных линий происходит снижение активности ТПГ в стволе мозга, причем наиболее устойчивыми оказались линии мышей, у которых понижение было более существенным—такие животные поддерживали температуру тела более продолжительное время и дольше жили в условиях резкого охлаждения. То, что между активностью ТПГ в стволе мозга



Рис. Схема генетической регуляции серотонинзависимых функций

мышей и их устойчивостью к гипотермии существует высокая генотипическая отрицательная корреляция, хорошо согласуется с представлением о серотонине мозга как о факторе, способствующем быстрой потере тепла телом путем понижения теплопродукции и увеличения теплоотдачи [73]. Понижение активности ТПГ при экстремальном охлаждении мышей и, соответственно, уменьшение синтеза серотонина и понижение серотонинергических влияний, по-видимому, носит адаптивный характер, способствуя устойчивости животных к действию холода.

Корреляция также была обнаружена между активностью ТПГ в стволе мозга мышей инбредных линий и развитием у них постстрессорных нейрогенных дистрофий желудка. Участие серотониновых механизмов в возникновении язв, вызываемых эмоциональным стрессом, показано рядом исследователей [74]. После ограничения подвижности животных наибольшее число нейрогенных эрозий было обнаружено у линий мышей, у которых эмоциональный стресс вызывал выраженное увеличение активности ТПГ [75].

Длительный отбор животных на неагрессивное поведение по отношению к человеку (доместикация) также ведет к изменению активности ТПГ в мозгу серебристо-черных лисиц [76] и серых крыс-пасюков [77]. У ручных животных таких резко различающихся видов обнаружено сходное, наследственно закрепленное увеличение активности ТПГ по сравнению с линиями животных, селекционируемых на агрессивный по отношению к человеку тип поведения. Эти результаты соответствуют представлениям об ингибирующей роли серотонина в регуляции некоторых видов агрессивного поведения [1] и данным о повышенном уровне серотонина в мозгу доминируемых лисиц [1] и пасюков [78] по сравнению с агрессивными животными дикого типа.

В то же время в регуляции интенсивности уже возникшей агрессии самцов мышей (intermale aggression) серотонин, по-видимому, играет иную роль, чем в регуляции агрессивности самцов других видов животных. Так, была установлена положительная корреляция между активностью ТПГ в мозгу и агрессивней нападающих друг на друга самцов мышей: чем выше активность ТПГ в мозгу животных данной линии, тем выше интенсивность нападений и драк [79].

В выявленных закономерностях привлекают внимание две характерные особенности: 1) обнаруженные корреляции были межлинейными, то есть обусловленными различиями генотипов животных; 2) была найдена связь между наследственно обусловленной устойчивостью к стрессу, агрессивностью животных и активностью ключевого фермента синтеза серотонина, но не уровня самого биогенного амина или 5-гидроксииндолуксусной кислоты. Это подтверждает наше предположение о ключевой роли ТПГ в генетической регуляции функциональной активности серотониневой системы и, соответственно, в серотонинрегулируемых функциях, которая, очевидно, обусловлена тем, что из всех ферментных белков, участвующих в метаболизме серотонина, ТПГ является наиболее специфичным и, следовательно, оказывающим наиболее избирательное влияние на серотониновую систему. Вероятно, в метаболизме каждой медиаторной системы имеется ферментный белок, через который в наибольшей степени реализуются влияния генотипа на активность медиатора.

## BRAIN TRYPTOPHAN HYDROXYLASE: PROPERTIES, REGULATION AND FUNCTIONAL ROLE

POPOVA N. K., JANAIEVA E. J.

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

The review includes data concerning brain serotonin synthesis limiting enzyme—tryptophan hydroxylase (TPH)—and its significance in the genetic control of serotonin-regulated kinds of behavior.

Biochemical properties of TPH and regulatory pathways mediated by enzyme's substrates and by  $Ca^{2+}$ -calmodulin-dependent protein kinase are summarized. Experimental evidence of TPH involvement in the regulation of aggressive behavior, catalepsy, stress-induced ulcers, hypothermia and hibernation are analyzed. It was shown that the activity of TPH seems to be controlled monogenically.

It is hypothesized that TPH plays a key role in the genetic regulation of functional activity of serotonergic brain system and, consequently, in the genetic control of serotonin-mediated functions and kinds of behavior.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Попова Н. К., Науменко Е. В., Колпаков В. Г. Серотонин и поведение. Новосибирск, Наука, 1978.
2. Луценко Н. Г., Суворов Н. Н. Успехи соврем. биол., т. 94, с. 243—252, 1982.
3. Friedman P. A., Kappelman H. A., Kaufman S. J. Biol. Chem., v. 247, p. 4165—4173, 1972.
4. Tong J. H., Kaufman S. J. Biol. Chem., v. 250, p. 4152—4158, 1975.
5. Nagatsu T. Neurochem. Int., v. 5, p. 27—38, 1983.
6. Kuhn D. M., Wolf W. A., Youdim M. B. H. Neurochem. Int., v. 8, p. 141—154, 1986.
7. Vitto A., Mandell A. G. J. Neurochem., v. 37, p. 601—607, 1981.
8. Nagatsu T. J. Neurochem., v. 41, suppl., S32D, 1983.
9. Kuhn D. M., Raskin B., Lovenberg W. J. Biol. Chem., v. 255, p. 4137—4143, 1980.
10. Mandell A. J. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., v. 18, p. 461—493, 1978.
11. Kuhn D. M., Meyer M. A., Lovenberg W. Biochem. Pharmacol., v. 28, p. 3255—3260, 1979.
12. Youdim M. B. H., Green A. R.—In: Catecholamines: Basic and clinical frontiers (ed. E. Usdin, I. J. Kopin, J. Barchas), p. 124—126, N. Y., Pergamon Press, 1979.
13. Yanagisawa M., Hasegawa H., Ichiyama A. J. Biochem., v. 92, p. 449—456, 1982.
14. Kuhn D. M., O'Callaghan G. P., Juskevitch G., Lovenberg W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Biol. Sci., v. 77, p. 4688—4691, 1980.
15. Sawada M., Inuma H., Ohno M., Takeuchi T., Unezawa H., Nagatsu T. Biog. Amines, v. 1, p. 171—178, 1984.
16. Hori S., Ohtani S. J. Neurochem., v. 36, p. 551—558, 1981.
17. Pickel V. M., Joh T. H., Reiss D. J. J. Histochem. and Cytochem., v. 24, p. 792—806, 1976.
18. Joh H. T., Shikimi T., Pickel W. M., Reiss D. J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Biol. Sci., v. 72, p. 3575—3579, 1975.
19. Nakata H., Fujisawa H. J. Biochem., v. 90, p. 557—570, 1981.
20. Kuhn D. M., Rosenberg R. C., Lovenberg W. J. Neurochem., v. 33, p. 15—22, 1979.
21. Curzon G. Neurochem. Int., v. 8, p. 155—159, 1986.
22. Fernstrom J. D. Physiol. Rev., v. 63, p. 484—546, 1983.
23. Murphy D. L. Neurochem. Int., v. 8, p. 161—163, 1986.
24. Diez G. A., Sze P. Y., Ginsburg B. E. Brain Res., v. 104, p. 396—400, 1976.
25. Neckles L. M., Biggio G., Moja E., Meek J. L. J. Pharmacol. and Exp. Ther., v. 201, p. 110—116, 1977.
26. Trulsson M. E., MacKenzie R. G. J. Pharmacol. and Exp. Ther., v. 212, p. 269—273, 1980.
27. Nagatsu T., Sawada M., Yamaguchi T. Neurochem. Int., v. 5, p. 603—610, 1983.
28. Katz I. R. J. Neurochem., v. 37, p. 447—451, 1981.
29. Miwa S., Watanabe Y., Hayaishi O. Arch. Biochem. Biophys., v. 239, p. 234—241, 1985.
30. Lee E. H., Mandell A. J. J. Pharmacol. and Exp. Ther., v. 234, p. 141—146, 1985.
31. Boadle-Biber M. C. Biochem. Pharmacol., v. 28, p. 2129—2138, 1979.
32. Hamon M., Bourgoin S., Artaud F., Hery F. J. Neurochem., v. 28, p. 811—818, 1977.
33. Hamon M., Bourgoin S., Artaud F., Glowinski L. J. Neurochem., v. 33, p. 1031—1042, 1979.
34. Knowles R. G., Rogson C. I. J. Neurochem., v. 42, p. 677—684, 1984.
35. Boadle-Biber M. C., Phan T.—H. Biochem. Pharmacol., v. 35, p. 1521—1526, 1986.

36. *Boadle-Biber M. C.* Biochem. Pharmacol., v. 31, p. 2233-2206, 1982
37. *Sawada M., Kanamori T., Hayakawa T., Nagatsu T.* Neurochem. Int., v. 7, p. 761-764, 1985.
38. *Sawada M., Nagatsu T. J.* Neurochem., v. 45, p. 953-957, 1985.
39. *Hamon M., Bourgoin S., Artaud F., Mestkaway S. E. J.* Physiol. (Gr. Brit.), v. 77, p. 269-279, 1981.
40. *Kahn J. P., Chauvet G., Hery F., Debilly G., Mermet A., Glowinski J., Pujol J. F.* Brain Res., v. 123, p. 125-136, 1977.
41. *Fernstrom J. D., Wurtman R. J.* Science, v. 173, p. 149-152, 1971.
42. *Shannon N. J., Gunnet J. W., Moore K. E. J.* Neurochem., v. 47, p. 958-965, 1986.
43. *Boude-Biber M. C., Johannessen J. N., Narasimachari N., Phan T.-H.* Neurochem. Int., v. 8, p. 83-92, 1986.
44. *Knowles R. G., Rogson C. I. J.* Neurochem., v. 42, p. 663-669, 1984.
45. *Trulson M. E.* Life Sci., v. 37, p. 1067-1072, 1985.
46. *Kizer G. S., Palkovits M., Kopin I. J., Saavedra J. M., Brownstein M. J.* Endocrinology, v. 98, p. 743-747, 1976.
47. *Palkovits M., Brownstein M., Kizer G. S., Saavedra J. M., Kopin I. J.* Neuroendocrinol., v. 22, p. 298-301, 1975.
48. *Azmitia E. C. Jr., McEwen B. S. J.* Neurochem., v. 27, p. 773-778, 1976.
49. *Sze P. Y., Neckers L.* Brain Res., v. 72, p. 375-378, 1974.
50. *Sze P. Y., Neckers L., Towle A. C. J.* Neurochem., v. 25, p. 169-173, 1976.
51. *Azmitia E. C., McEwen B. S.* Science, v. 166, p. 1274-1276, 1969.
52. *Long J. B., Youngblood W. W., Kizer J. S.* Brain Res., v. 277, p. 289-298, 1983.
53. *Rastogi R. B., Singhal R. L. J.* Pharmacol. and Exp. Ther., v. 191, p. 72-81, 1974.
54. *Savard P., Mérand Y., Di Paolo T., Dupont A.* Brain Res., v. 292, p. 99-108, 1984.
55. *Weekley L. B., Phan T.-H., Narasimhachari N., Johannessen J., Boadle-Biber M. C.* Biochem. Pharmacol., v. 34, p. 1549-1557, 1985.
56. *Sawada M., Nagatsu T.* Neurochem. Int., v. 8, p. 413-416, 1986.
57. *Barchas G., Claranello B., Dominic G., Deguchi T., Grenberg E., Renson G., Kessler S.*—In: Adv. Biochem. Psychopharmacology (ed. E. Usdin), v. 12, p. 195-204, N. Y., Raven Press, 1974.
58. *Diez J. A., Sze P. Y., Ginsburg B. E.* Brain Res., v. 109, p. 413-417, 1976.
59. *Natali J. P., McRae-Deguerce A., Chauvet G., Fujol J. F.* Brain Res., v. 191, p. 191-203, 1980.
60. *Knapp S., Mandell A. J., Russo P. V., Vitto A., Stewart K. D.* Brain Res., v. 230, p. 317-336, 1981.
61. *Knapp S., Mandell A. J.* J. Physiol., v. 77, p. 281-282, 1981.
62. *Куликов А. В., Попова Н. К.* Генетика, т. 19, с. 784-788, 1983.
63. *Куликов А. В., Попова Н. К.* Нейрохимия, т. 2, с. 421-425, 1983.
64. *Knapp S., Mandell A. J.* Life Sci., v. 16, p. 761-771, 1972.
65. *Kolpakov V. G., Kulikov A. V., Barykina N. N., Alechina T. A., Porova N. K.* Biogenic Amines, v. 2, p. 131-136, 1985.
66. *Попова Н. К., Куликов А. В., Колпаков В. Г., Барыкина Н. Н., Алехина Т. А.* Журн. высш. нерв. деят-сти, т. 35, с. 742-746, 1985.
67. *Duncan R. J. S., Tricklebank M. D. J.* Neurochem., v. 31, p. 553-556, 1978.
68. *Попова Н. К., Воронова Н. П., Молодцова Г. Ф., Войтенко Н. Н.*—В кн.: Материалы Всесоюзного симпозиума «Обмен веществ при зимней спячке и естественном сне», с. 104-105, Махачкала, 1985.
69. *Porova N. K., Kulikov A. V.* Aggressive Behav., v. 12, p. 425-431, 1986.
70. *Попова Н. К., Кудрявцева Н. Н., Куликов А. В.* Генетика, т. 20, с. 233-238, 1984.

71. *Ciaranello R. D.*—In: Genetic variation in hormone systems (ed. J. G. Shire). v. 2, p. 49—61. N. Y., CRC Press, 1979.
72. *Куликов А. В., Корякина Л. А., Попова Н. К.* Генетика, т. 21, с. 1680—1684, 1985.
73. *Porova N. K., Kopusova A. V.* Biogenic Amines, v. 3, p. 125—134, 1985.
74. *Ito N., Kodama M., Ogawa Y., Kodama O., Takeuchi H., Tanaka T., Seikoh R., Harada M., Eza'ki H., Hiroshima J.* Medicine Sciences, v. 32, p. 329—339, 1983.
75. *Корякина Л. А., Куликов А. В.* Патол. физиол. и эксперимент. терап., т. 2, с. 49—53, 1986.
76. *Жанаева Е. Ю., Войтенко Н. Н.*—В кн.: Медиаторы в генетической регуляции поведения. Тезисы докладов Всесоюзного симпозиума (под ред. Н. К. Поповой), с. 21—22, Новосибирск, Инст. цитологии и генетики СО АН СССР, 1986.
77. *Попова Н. К.*—В кн.: Медиаторы в генетической регуляции поведения. Тезисы докладов Всесоюзного симпозиума (под ред. Н. К. Поповой), с. 64—65, Новосибирск, Инст. цитологии и генетики СО АН СССР, 1986.
78. *Никулина Э. М., Бородин П. М., Попова Н. К.* Журн. высш. нерв. деят-сти, т. 35, с. 703—709, 1985.
79. *Попова Н. К., Куликов А. В.* Журн. высш. нерв. деят-сти, т. 33, с. 589—591, 1983

Поступила 28. I 1988.



УДК 612.82:577.175.82+57.017.64:57.033+612.07+613.81+613.83+613.24

## ДЛИТЕЛЬНЫЕ НАРУШЕНИЯ МОНОАМИНОВЫХ СИСТЕМ ГОЛОВНОГО МОЗГА, ВЫЗВАННЫЕ ДЕЙСТВИЕМ ВРЕДНЫХ ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ В РАННЕМ ОНТОГЕНЕЗЕ

НАУМЕНКО Е. В.

Институт цитологии и генетики СО АН СССР, Новосибирск

Обобщены и проанализированы данные об отдаленных последствиях нарушения метаболизма и рецепции катехоламинов и серотонина в головном мозгу взрослых крыс, а также мышей после воздействия в раннем онтогенезе таких вредных экзогенных факторов, как белково-недоедание, алкоголь, наркотики, физические и психические стрессоры и нарушение баланса глюкокортикоидных гормонов. Представлены доказательства, полученные в нашей лаборатории, о связи изменений стрессорной реактивности взрослого организма с модификацией парадремалиновой системы головного мозга, вызванной стрессом или введенным гормоном крысы надпочечников в пренатальный период индивидуального развития, и зависимость этих изменений от генетических факторов.

Одной из актуальных проблем современной нейрохимии является изучение нарушений моноаминовых систем головного мозга взрослого организма, возникающих после действия неблагоприятных экзогенных факторов внешней среды в пре- и ранний постнатальный периоды индивидуального развития. Объясняется это, с одной стороны, той ключевой ролью, которую серотонин и катехоламины играют в процессах обучения, памяти, сна, различных форм поведения и нейроэндокринной регуляции. С другой стороны, с каждым годом все сильнее проявляется вредное действие антропогенных факторов на животных и человека, и необходимость изучения последствий таких влияний становится все более острой.

Организм особенно чувствителен к неблагоприятным влияниям среды на ранних этапах онтогенеза, когда происходит развертывание генетической программы и бурное развитие головного мозга. В это время даже относительно слабые воздействия, не вызывающие видимых морфологических повреждений, нередко сопровождаются длительными, а порой и постоянными нарушениями метаболизма серотонина и катехоламинов в мозгу. Пока еще мало известно о таких изменениях у человека, поэтому особое внимание заслуживают экспериментальные данные о действии таких широко распространенных в человеческом обществе патогенных фак-

терия, как физические и психические стрессоры, недоедание, алкоголь и наркотики. Анализу отдаленных изменений моноаминовых механизмов, вызванных действием этих факторов в ранний период онтогенеза и послышеи данный обзор.

**Белковое и общее недоедание.** Головной мозг в период раннего онтогенеза очень чувствителен к нарушению питания. В частности, при недоедании, особенно белковым, нарушаются оба компонента созревания нейронов—миелинизация и синаптогенез, имеющие важное значение для нормальной развития нейрхимических процессов и функций ЦНС.

Изучение последствий недоедания чаще всего касается исследований нарушений белкового метаболизма. Эти работы проводятся, как правило, на двух относительно сходных моделях: самки начинали получать низкокалорийную, но обдешенную белком диету (7—8% казеина вместо 20—25%) еще за несколько недель до спаривания или же начиная с разных сроков беременности. Такой режим питания продолжали в течение периода вскармливания детенышей, а в ряде исследований последние были на подобной диете вплоть до умерщвления животных. В то же время обращается мало внимания на механизмы восстановления центральных моноаминовых систем у взрослых особей, испытавших недоедание только в раннем периоде индивидуального развития, хотя эта проблема имеет важное значение для клинки и животноводства.

В старых работах с применением флуориметрического определения дофамина и норадреналина в целом мозгу или в больших его участках у крыс [1, 2] и мышей [3] ряд авторов на фоне недостаточного потребления белка в пре- и ранний постнатальный период обнаружил понижение содержания катехоламинов. Однако в других исследованиях, проведенных в сходных условиях, было отмечено повышение количества норадреналина [4]. Некоторые же авторы не смогли заметить каких-либо изменений [5]. Причины противоречий остаются малопонятными. Их нельзя объяснить различиями в возрасте изучаемых животных, поскольку противоположные результаты были получены в опытах, проводимых в одни и те же периоды индивидуального развития [1, 4, 6].

В более поздних работах применене радиоферментного метода позволило изучать содержание биогенных аминов в отдельных гипоталамических ядрах. Оказалось, что у 90-дневных крыс, постоянно содержащихся на диете с низким содержанием белка, начиная с пре- или неонатального периода, концентрация норадреналина в паравенткулярных ядрах составляла лишь 25%, а в срединном возвышении—64% от нормальной. В срединном возвышении и аркуатных ядрах понижалось содержание адреналина и дофамина [7].

Дефицит пищевого белка сопровождался значительными нарушениями и ферментных системах, участвующих в метаболизме катехоламинов. Создание таких неблагоприятных условий плодам и детенышам крыс в период их вскармливания вызывал на 24-й день жизни повышение активности тирозингидроксилазы мозга [1]. При общем голодании и у питавшихся нормально особей активность этого фермента в неонатальном

периоде сказалась одинаково низкой. Затем она быстро повышалась, достигая активности, свойственной взрослым на 14-й день после рождения. Однако при белковом недоедании процесс нарастания активности тирозингидроксилазы прогрессировал и на 35-й день она более чем вдвое превышала активность этого фермента при нормальном питании [8]. Поскольку у недоедавших животных содержание тирозина в мозгу не изменялось, а активность лимитирующего синтез катехоламинов фермента повышалась [8, 9], вызывает затруднение интерпретация данных о понижении в таких условиях содержания катехоламинов в головном мозгу крыс [1, 2], тем более, что нередко находили понижение активности каталитических ферментов. Например, у крысят на 1-, 14- и 21-й дни жизни обнаруживали снижение активности МАО в синаптических тканях мозжечка, если их матери со второй половины беременности и во время вскармливания испытывали недостаток в белковом питании [7].

Таким образом, нет сомнений, что хроническое белковое недоедание вызывает выраженные изменения со стороны катехоламиновой системы мозга. Однако больший интерес представляют немногочисленные работы, в которых изучали отдаленные последствия белкового голодания, которому животных подвергали только в раннем периоде индивидуального развития. Так, у мышей, матери которых потребляли с 14-го дня пренатальной жизни их потомства вглоть до конца периода вскармливания обедненную белком диету, в 3-месячном возрасте было отмечено значительное нарушение метаболизма катехоламинов. Скорость включения в ткань мозга меченого тирозина и исчезновения из мозга меченого норадреналина была у них повышенной [3]. Сходные результаты получены и на крысах [10].

Однако последствия хронического недоедания могут быть и обратными. Например, если недоедавших от момента рождения до половой зрелости крыс содержать в дальнейшем на полноценном питании, то через 70 дней содержание дофамина в мозгу достигает нормы [11].

Интересно отметить, что изменения активности ферментов, участвующих в метаболизме биогенных аминов, происходят очень быстро после начала голодания. Переязывание нижней маточной артерии на 17-й день беременности или голодание матери в последние два дня беременности вызывали длительные нарушения активности МАО у крыс, родившихся от таких матерей. Активность этого фермента в целом мозгу оказалась на 5-й день после рождения достоверно ниже, а на 20- и 40-й дни достоверно выше, чем у животных, рожденных интактными крысами [12]. Эти же авторы обнаружили такие колебания в активности МАО в гипоталамусе и значительно сниженную в течение всего периода наблюдения активность катехол-О-метилтрансферазы (КОМТ) в целом мозгу и в гипоталамусе.

Белковая недостаточность во время вскармливания сопровождается понижением в ЦНС числа дофаминовых рецепторов [11]; последствия белкового недоедания могли сказываться еще длительное время после перевода животных на полноценный корм. Кинетические характеристики

дают основание для заключения, что у крыс, которые начиная с пренатального периода и до 50-дневного возраста получали недостаточное количество белка, даже в 3-месячном возрасте все еще обнаруживали понижение числа мест связывания, но не сродства  $\alpha$ - и  $\beta$ -адренорецепторов [13]. Авторы полагают, что уменьшение числа адренорецепторов может указывать на усиление пресинаптической зорадренергической активности у недоедавших в раннем онтогенезе животных.

Еще более четкие данные о последствиях белкового голодания были получены в отношении серотониновой системы. Большинство исследователей полагает, что недостаточность питания в раннем онтогенезе повышала активность центральных серотонинергических нейронов. Это связано, прежде всего, с увеличением в головном мозгу количества триптофана. Допускают, что его повышение является следствием увеличения в крови концентрации свободного триптофана, освобождающегося от связи с альбумином крови. Этот процесс происходит с помощью конкурирующих с триптофаном за связи с альбумином неэстерифицированных жирных кислот, концентрация которых при недоедании повышается. Кроме того, в этих условиях понижается концентрация самого альбумина, что также способствует увеличению в крови свободного триптофана [14].

Наибольшее и самое устойчивое повышение содержания серотонина обнаруживали в стволе мозга. В коре же больших полушарий его содержание не менялось, что свидетельствует о повреждающем влиянии недоедания в ранний период развития в первую очередь на перикарионы серотонинергических нейронов [4]. Содержание серотонина осталось повышенным вплоть до 300-дневного возраста, если крысы продолжали получать неполноценную в отношении белка пищу [6], но скорость синтеза серотонина в гиппокампе могла оставаться в 140-дневном возрасте высокой и в том случае, если крысы были ограждены в пище даже в течение короткого периода раннего онтогенеза [15].

При белковом недоедании параллельно с повышением количества серотонина в мозгу увеличивается  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазная активность [16]. Полагают, что эти изменения являются специфическими в результате повышения количества свободного триптофана плазмы [17].

Метаболизм триптофана и серотонина в мозгу плодов и новорожденных очень чувствителен к недостатку и качеству пищи матери, и может резко нарушаться даже при однократном качественном изменении рациона питания матери [18]. Острое 2-часовое голодание матери 4-дневных крыс сопровождалось у последних значительным повышением содержания серотонина, 5-гидроксининдолукусной кислоты и их соотношения в коре больших полушарий, подкорке и стволе головного мозга. Этот эффект длителен и последствия голодания исчезли лишь на 22-й день, то есть к окончанию периода вскармливания [19].

Причиной повышения в мозгу содержания серотонина является не только увеличение в крови концентрации свободного триптофана. Другая существенная причина—повышение в мозгу активности фермента, лимитирующего синтез данного амина: в условиях белковой недостаточности ак-

тивность триптофангидроксилазы к 35-му дню становится в 3 раза выше нормальной [8]. Изменение активности триптофангидроксилазы под влиянием голодания трудно связывать с определенной стадией раннего онтогенеза, так как повышение его активности находили не все авторы. Другие исследователи в те же сроки (7 дней) у крыс с белковой недостаточностью обнаруживали снижение активности этого фермента по сравнению с контролем [7]. Правда, результаты работ этих двух групп авторов совпадали при определениях активности триптофангидроксилазы на 21-й день жизни.

При голодании изменяется активность и другого фермента, участвующего в синтезе серотонина. У крысят, питание матерей которых в период лактации удовлетворяло лишь половину потребности в калориях, характерное для контрольных животных повышение активности триптофанкарбоксилазы задерживалось, и на 21-й день жизни она была такой же, как на 12-й день у нормально вскормленных детенышей [20].

При белковом голодании в раннем онтогенезе повышался не только синтез, но и катаболизм серотонина, свидетельством чего является повышенный уровень содержания 5-гидроксининдолуксусной кислоты в мозгу крыс к окончанию периода их вскармливания. У этих животных на треть понижалась поведенческая исследовательская активность и резко усиливалась эмоциональность [5].

Показано, что железо ( $Fe^{2+}$ ) может играть регулируемую роль в накоплении серотонина в везикулах центральных серотониновых нейронов и его хроническая нехватка, во время беременности и периода вскармливания сопровождается недостаточностью механизма обратного захвата серотонина синаптическими пузырьками. Если же родившихся от таких матерей детенышей перевести на полноценный корм, процессы обратного захвата серотонина восстанавливаются [21].

При белковой недостаточности страдает и рецепторный аппарат серотониновой системы. Так, судя по поведенческим тестам, у взрослых крыс, недоедавших в течение периода развития, происходило понижение чувствительности к агонисту серотонина  $N-N$ -диметилтриптамину. По мнению авторов, это может отражать пониженную чувствительность серотониновых рецепторов вследствие постоянной ненормально высокой концентрации уровня этого нейротрансмиттера в мозгу [22].

Таким образом, не вызывает сомнений, что недостаточность в раннем онтогенезе белкового питания сопровождается значительными нарушениями моноаминовых механизмов. Возникающие длительные изменения затрагивают содержание и метаболизм моноаминов, а также рецепторный аппарат катехоламиновой и серотониновой систем мозга.

**Алкоголь и наркотики.** В последние годы опубликовано огромное число работ, посвященных различным аспектам действия алкоголя на организм человека и животных, в том числе его влияние на нейрохимические механизмы взрослого организма [23]. В то же время остается крайне недостаточно изученным характер, длительных нарушений центральных моноаминовых систем, вызванных действием этанола в пре- и

ранний постнатальный период развития. Анализ же имеющихся относительно немногочисленных данных затруднен тем, что результаты исследований были получены с помощью разных методов и моделей. Нередко моноамины определяли в целом мозгу на фоне потребления разных доз алкоголя, длительность применения которого варьировала, или в сочетании с действием другого повреждающего фактора — белкового недоедания. Поэтому определенным представляется лишь сам факт возможности длительного нарушения алкоголем моноаминовых систем головного мозга.

Продолжительное потребление 6%-ного этанола до и во время беременности вызывало у 19—35-дневных потомков понижение количества серотонина и (или) 5-гидроксииндолукусной кислоты в стволе головного мозга, коре больших полушарий и мозжечке. В 35-дневном возрасте в коре также снижалось до 20% содержание дофамина и до 50% гомованилиновой кислоты [24].

Выраженные и длительные нарушения бывали и при более короткой экспозиции алкоголя. Введение его лишь в последнюю неделю беременности вызывало через 3 недели после рождения падение содержания дофамина и норадреналина в мозгу, причем в гипоталамусе концентрация норадреналина снижалась на 30—60% [25], что связывают, главным образом, с понижением его синтеза [26]. Падение в гипоталамусе оказалось очень стойким и обнаруживалось даже в 26-недельном возрасте [27].

К сожалению, имеющиеся в литературе данные неоднородны. Другие исследователи не обнаруживали изменений в катехоламиновой системе 11-недельных крыс, матери которых в течение всей беременности потребляли 20%-ный этанол [28]. Однако у этих потомков повышалась межсамцовая агрессивность и вдвое падало содержание серотонина в мозгу, хотя масса мозга не отличалась от массы мозга нормальных крыс того же возраста [28]. Имеются также сведения, что 2-недельное потребление алкоголя во время беременности не влияло на количество серотонина и норадреналина, но сопровождалось падением концентрации АХ и повышением содержания ГАМК в мозгу 17- и 21-дневных плодов и 5- и 10-дневных крыс [29].

Некоторые исследователи в головном мозгу потомков матерей «алкоголичек» находили изменение активности ферментов метаболизма биогенных аминов, причем их изменения зависели от изучаемой структуры мозга и периода онтогенеза. Например, у потомков таких матерей в целом мозгу активность тирозингидроксилазы через 1 и 2 недели после рождения оказывалась выше, а через 3 недели — ниже, чем у потомков нормальных матерей [30]. В то же время в хвостатом ядре активность тирозингидроксилазы у них была повышена в течение всех недель [31]. Если же алкоголь потребляли лактирующие матери, у детенышей обнаруживали в течение всего периода вскармливания повышенную активность тирозингидроксилазы и ДОФА-декарбоксилазы и пониженную активность дофамин-β-гидроксилазы [30].

Этанол нарушал также активность ферментов, участвующих в катаболизме катехоламинов. В головном мозгу потомков активность MAO II

КОМТ понижалась в период лактации, если матери получали в это время с пищей этиловый спирт. Активность КОМТ у вскармливаемых крыс понижалась и в тех случаях, когда алкоголь их матери потребляли в последнюю неделю беременности [30].

Потребление этанола матерью может поражать у потомков функцию истраднергических синапсов. Так, введение самкам алкоголя с 13-го дня беременности по 5-й день после рождения детенышей вызывало у последних в течение последующих 7—10 дней повышение синаптосомного захвата меченого тирамина и его превращения в октоламин. Выраженность повреждающего действия этанола у потомства зависела от периода развития, поскольку его потребление самками с 18-го дня беременности по 5-й день лактации вызывало более длительные изменения. Такая повышенная чувствительность к этанолу присуща только развивающейся катехоламинной системе и отсутствовала у взрослых крыс [32]. В других опытах, определяя поглощение меченого дофамина, норадреналина и серотонина синаптосомами, выделенными из ткани мозга крыс, получавших алкоголь в перинатальном периоде, обнаружили повышенный захват норадреналина синаптическими пузырьками. Еще более серьезные изменения были со стороны серотониновой системы мозга: у животных происходила задержка развития серотонинергических синапсов и понижение поглощения синаптосомами серотонина [33].

У потомков матерей, потреблявших алкоголь, страдал и рецепторный аппарат. Это отчетливо показано в отношении дофаминовой системы мозга. Потребление 6%-го этилового спирта во время беременности сопровождалось у 63-дневных потомков снижением в полосатом теле числа дофаминовых рецепторов и количества дигидроксифенилуксусной кислоты [34]. Однако в отличие от пренатального периода, потребление алкоголя с молоком матери в период кормления не изменяло у взрослых потомков числа дофаминовых рецепторов, но резко снижало их чувствительность к дофамину [34]. По мнению авторов это является следствием изменений конформации рецепторных белков. В таких случаях в полосатом теле еще длительное время находили повышенную концентрацию дигидроксифенилуксусной кислоты.

В последнее время появляются данные о потенцирующем действии алкоголя в раннем онтогенезе эффектов, вызываемых впоследствии наркотиками. Обнаружено, что пренатальное получение алкоголя приводило у взрослых крыс к усилению анальгетического эффекта морфия. В таких условиях усиливались и другие эффекты этого наркотика: гипертермия и активация гипофизарно-надпочечниковой системы [35].

Нужно заметить, что несмотря на обостренный интерес к проблеме действия наркотиков, до настоящего времени мало известно об отдаленных последствиях их применения в раннем онтогенезе на моноаминовые системы мозга. В последнее время обнаружена связь между подобными нарушениями и нарушениями эндокринных функций.

Однократное введение одного из компонентов марихуаны каннабидиола в один из четырех последних дней беременности крыс оказывало длитель-

ный эффект: у взрослых потомков после их кастрации понижалось в головном мозгу содержание норадреналина и повышалась концентрация серотонина и 5-гидроксининдолуксусной кислоты по сравнению с кастрированными в то же время потомками интактных матерей [36]. Полагают, что эти изменения связаны с нарушениями наркотиками андрогензависимых механизмов половой дифференцировки мозга, в которой принимают участие и биогенные амины.

Еще более выраженные изменения были отмечены в сходных условиях опытов после однократного введения основного действующего на психику начала марихуаны  $\Delta$ -тетрагидроканнабинола. У взрослых потомков после кастрации в гипоталамусе понижался метаболизм катехоламинов и повышался метаболизм серотонина [37]. Авторы пришли к заключению, что длительные изменения функции гипофиза и гонад могли быть следствием нарушений в неонатальный период развития содержания и метаболизма биогенных аминов, участвующих в регуляции нейроэндокринных систем.

Серьезные изменения моноаминовых механизмов бывают не только от употребления наркотиков, вызывающих привыкание, но и от опиоидных препаратов, применяемых для снятия синдрома абстиненции во время беременности. Речь идет о синтетическом спонде метадоне, используемом в клинике в качестве заменителя героина у беременных женщин с абстинентным синдромом. У крыс, которым метадон вводили в момент рождения, была обнаружена задержка становления тирозингидроксилазной активности в мозгу. Повреждающее действие этого опиоида зависело от стадии онтогенеза. Наиболее серьезные нарушения имели место у крыс, матери которых получали метадон во время беременности и лактации [38]. У таких потомков кроме нарушений развития норадреналиновой системы нарушался также синаптогенез в серотониновой системе [39].

В заключение уместно отметить, что нарушение функций моноаминовых систем может вызывать не только прямое действие алкоголя и наркотиков. По-видимому, не меньшей эффект вызывает абстиненция, играющая роль сильного стрессора. Хотя этот вопрос специально не был изучен, имеющиеся многочисленные факты, о которых речь пойдет дальше, свидетельствуют о серьезных и длительных нарушениях нейрохимических механизмов в результате действия на организм стрессоров в раннем онтогенезе.

**Стресс и глюкокортикоиды.** По-видимому, первая работа, свидетельствующая о роли пренатального стресса в изменении моноаминовой системы мозга потомков, была опубликована в начале 70-х годов [40]. Применяя относительно «мягкий» стресс (ежедневный хэндлинг в течение всей беременности), авторы обнаружили небольшое, но достоверное снижение содержания серотонина в головном мозгу 3-недельных крыс. Более выраженные изменения проявились у крыс, матери которых были подвергнуты действию хэндлинга в сочетании с введениями физиологического раствора [41]. У родившихся крыс на 9-й день в гипоталамусе было обнаружено понижение, а в коре больших полушарий повышение количества

норадреналина, сохранявшееся и на 16-й день жизни. Были отмечены изменения и в серотониновой системе: на 16-й день в гипоталамусе; коре и в заднем мозгу содержание серотонина было повышено. На 16-й день в коре, а на 23-й день в коре и гипоталамусе было установлено повышение концентрации 5-гидроксииндолуксусной кислоты, что указывает на ускорение серотонинового метаболизма. По мере развития животных часть нарушений компенсировалась, однако некоторые оставались до полового созревания, и в гипоталамусе 60-дневных крыс все еще можно было обнаружить повышенное содержание норадреналина и серотонина [41].

Действие стрессора зависит от стадии развития эмбриона: Так, достаточно сильный стресс (15 ударов электрического тока ежедневно) от 6-го до 12-го дня беременности не оказывал влияния на содержание норадреналина, серотонина и 5-гидроксииндолуксусной кислоты в стволе мозга 1-, 12- и 25-дневных крыс [42]. Автор полагает, что отрицательные результаты связаны с типом стрессора, однако скорее они были обусловлены ранней стадией развития плода, поскольку видимые признаки начала формирования норадреналиновой и серотониновой систем в головном мозгу крыс выявляются не ранее второй половины беременности. Когда же стресс охватил и вторую половину беременности, проявлялись значительные изменения содержания катехоламинов во многих ядрах головного мозга 3-недельных плодов [43]. Часть этих изменений оставалась на длительный срок: уменьшение количества норадреналина в среднем вышвышени, преоптическом и паравентрикулярном ядрах и повышение количества дофамина в аркуатных ядрах и энторинальной коре определяли к 3-месячному возрасту [44].

Пренатальный стресс вызывал длительные нарушения в развитии рецепторного аппарата потомков. В этих условиях в коре головного мозга у родившихся крыс на 16-й день жизни обнаруживали снижение числа  $\alpha_1$ - и  $\beta$ -адренорецепторов, а у половозрелых животных — снижение числа  $\alpha_2$ -адренорецепторов [45], повышение связывания [ $^3H$ ]серотонина в коре и ослабление его в гиппокампе [46]. Наряду с этим повышалась способность связывания меченого спиперона без изменения величины  $K_d$ , что свидетельствует об увеличении числа серотониновых рецепторов второго типа [46].

Значительные нарушения обнаруживали и при действии стрессоров в ранний период после рождения. Так, гипоксия в первый день жизни нарушала синаптогенез и изменяла активность ферментов, участвующих в синтезе биогенных аминов. На 15-й день у животных повышался захват меченого норадреналина гомогенатами ткани ствола мозга, содержащими синаптосомную фракцию [47], а на 28-й день угнеталась активность тирозин- и триптофангидроксилазы [48]. Если же в 1-й день жизни стресс имитировали введением гидрокортизона, то через 7 и 14 дней в целом мозгу активность триптофангидроксилазы повышалась [49], а на 30-й день увеличивалось содержание серотонина и норадреналина [50]. Сходное повышение количества этих моноаминов было у половозрелых крыс после введения гидрокортизона на 2—5-й дни жизни [51]. Можно пред-

положить, что такое повышение связано с длительной активацией соответствующих ферментных систем. Во всяком случае после введения гидрокортизона на 2—7-й дни у 8- и 14-дневных крыс в заднем мозгу находили повышенную активность тирозингидроксилазы [52].

После рождения глюкокортикоиды способны нарушать на длительный срок активность и другого фермента—фенилэтаноламин-N-метилтрансферазы [53], что свидетельствует об их способности оказывать повреждающее действие и на адренергическую систему головного мозга крыс.

Таким образом, не вызывает сомнений, что стрессорные воздействия в перинатальном периоде вызывают длительные нарушения моноаминовых систем. Эти нарушения касаются многих показателей их функционирования: содержания биогенных аминов, их метаболизма, состояния рецепторного аппарата.

Нужно признать, что пока еще невозможно выявить признаки нарушений моноаминовых систем в головном мозгу, которые отражали бы действие в раннем онтогенезе специфического компонента патологического экзогенного фактора. Характер длительных нарушений зависит от множества нередко с трудом поддающихся учету причин. Помимо специфических особенностей действующего начала, играет роль стадия онтогенеза и, следовательно, степень зрелости моноаминовых механизмов, наследственные особенности индивидуума, условия его существования. Тем более удивительно сходство нарушений серотониновой и катехоламинной систем мозга после действия в раннем периоде развития таких различных факторов как гормоны, белковая недостаточность, алкоголь и наркотики.

Хотя часть нарушений, вызываемых этими факторами, со временем исчезает, все же нередко и после полового созревания можно обнаружить сдвиги содержания биогенных аминов, нарушения их метаболизма, рецепторного аппарата или активности ферментов. Такая общность изменений наводит на мысль, что, помимо специфических компонентов, в действии патологических факторов большую роль играет общий и, следовательно, неспецифический механизм. Таким механизмом является, очевидно, возникающий общий адаптационный синдром, поскольку белковое голодание [54], а также алкоголь [55] и наркотики [56] помимо специфического влияния на биохимические процессы в организме действуют как стрессоры, стимулируя гипоталамико-адренкортикальную систему и влияя на другие нейроэндокринные системы [57], участвующие в проявлениях стресса.

Следовательно, можно прийти к заключению, что общность длительных повреждений центральных моноаминовых механизмов, выявляемых после патологических воздействий в раннем онтогенезе, связана в значительной степени с нарушениями баланса стероидных и пептидных гормонов, в частности, влияющих на становление в процессе индивидуального развития серотониновой и катехоламинной систем головного мозга.

Моноамины мозга участвуют в регуляции множества функций. Поэтому возникает вопрос, представляющий существенный теоретический и

практический интерес: на каких функциях отражаются обнаруживаемые нарушения? Этот принципиальной важности вопрос остается в значительной степени открытым. Тем не менее многолетние исследования нашей лаборатории позволили установить связь между вызываемыми в раннем онтогенезе стрессорами или глюкокортикоидами изменениями норадреналиновой системы мозга и возникающими у взрослых животных нарушениями стрессорной реактивности.

Было обнаружено, что действие в последней трети беременности стрессоров [58] или имитация их действия двукратным или даже однократным введением гидрокортизона [59] сопровождается торможением реакции гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы (ГГАС) взрослых потомков на эмоциональный стресс [59] и угнетением у них эмоционального поведения на открытой площадке [60]. Удалось также установить, что у взрослых крыс степень ингибирования реакции ГГАС на эмоциональный стресс обратно пропорциональна уровню содержания глюкокортикоидов в крови их матерей в последней трети беременности [60, 61]. Последующий анализ изменений стрессорной реактивности выявил, что они тесно связаны с действием выбрасываемых при стрессе в кровь матери глюкокортикоидных гормонов коры надпочечников на норадреналиновую систему головного мозга плода. Основные доказательства этой связи таковы.

1. Реакция ГГАС взрослых потомков снижена на введение в боковую желудочек мозга норадреналина, в отличие от реакции на введение в таких же условиях серотонина и карбохолина [59, 62], что свидетельствует об относительной избирательности повреждения во время беременности норадреналиновых механизмов, связанных с регуляцией данной нейроэндокринной системы.

2. Степень снижения реакции ГГАС на внутрижелудочковое введение норадреналина оказалась обратно пропорциональной концентрации глюкокортикоидов в крови матерей, но положительно и достоверно коррелировала с реакцией потомков на эмоциональный стресс [60, 61]. Следовательно, в этих работах был доказан принципиальный факт: у взрослых крыс, матери которых в последнюю треть беременности были подвергнуты действию стресса, происходит снижение чувствительности центральных адренорецепторов, связанных с регуляцией функции ГГАС в условиях эмоционального стресса.

3. Снижение чувствительности норадренергической системы головного мозга является, очевидно, причиной и того, что у потомков матерей, получавших гормоны коры надпочечников, содержание норадреналина в больших полушариях [63] и гипоталамусе [64], в отличие от его содержания в мозгу потомков интактных матерей, не снижалось на фоне эмоционального стресса.

4. Наконец, у взрослых крыс [65] и мышей [66], рожденных матерями, которым вводили глюкокортикоиды, в полушариях, стволе, гипоталамусе и полосатом теле активность тирозингидроксилазы как в исход-

кем состоянии, так и при эмоциональном стрессе достоверно отличалась от таковой в мозгу потомков интактных самок.

Изменения норадренергической системы, являющиеся, видимо, генерализованными, поскольку затрагивают механизмы, участвующие в регуляции и других функций, не связанных с гипофизарно-адренкортикальной системой. Хотя этот вопрос не был подробно исследован, показано, что после введения гидрокортизона на 16- и 18-й дни беременности длительно нарушаются центральные норадренергические механизмы, участвующие в регуляции температуры тела [62, 63].

Дальнейшие исследования позволили обнаружить еще две важные закономерности. Во-первых, оказалось, что чувствительность норадреналиновой системы мозга плодов к повреждающему действию гормонов коры надпочечников генетически детерминирована [56, 62] и является доминантным признаком [62, 67]. От наследственных свойств животных зависит характер нарушения в мозгу содержания норадреналина [65] и активности тирозингидроксилазы [66], а также изменения чувствительности норадренергических рецепторов, связанных с регуляцией ГГАС [59, 62].

Во-вторых, характер нарушений норадреналиновых механизмов, регулирующих стрессорную реактивность, зависит от стадии индивидуального развития организма. Поэтому изменения, вызванные стрессорами и глюкокортикоидами в пренатальный период, отличались от эффектов подобных воздействий после рождения. Например, в отличие от пренатального периода, введение гидрокортизона на 7—9-й дни после рождения не изменяло у взрослых крыс реакции ГГАС на эмоциональный стресс и на внутрижелудочковое введение норадреналина [58]. Следовательно, на 2-й неделе жизни норадренергическая система мозга, связанная с регуляцией стрессорной реактивности, оказалась нечувствительной к действию гормонов коры надпочечников. На 3-й неделе глюкокортикоиды вновь были способны модифицировать норадреналиновые механизмы. Введение дексаметазона на 17—19-й дни, то есть во время становления суточного ритма ГГАС, сопровождалось у взрослых крыс ингибированием циркадного ритма реакции ГГАС на 1-часовое плавание [68, 69] и на введение норадреналина в боковой желудочек головного мозга [70].

Длительный эффект, оказываемый стрессорами в ранний постнатальный период онтогенеза, связан не только с повышением в крови концентрации гормонов коры надпочечников. Очевидно, действие стрессоров значительно сложнее. Например, введение на 2—8-й дни жизни фрагмента АКТГ<sub>4-10</sub>, не обладающего стероидогенным эффектом, повышало, как обычный стрессор, активность тирозингидроксилазы в голубом пятне и полосатом теле 3-месячных крыс [71]. Введение на 7—9-й дни физиологического раствора, несмотря на отсутствие повышения в крови концентрации кортикостероидов, вызывало у половозрелых крыс повышение реакции ГГАС на внутрижелудочковое введение норадреналина [58]. Следовательно, можно полагать, что действие стресса в раннем постна-

кальном онтогенезе реализуется не только посредством ГГАС, но и через другие нейроэндокринные системы.

Нужно признать, что в действии стрессоров и глюкокортикоидов все еще много неясного, и их влияние зависит от множества, часто не учитываемых, причин. Остается неизвестным и патогенез тех нарушений, которые приводят к изменениям центральных моноаминовых систем взрослого организма. Не исключено, что стрессоры посредством гормонов, в первую очередь глюкокортикоидных, действуют в раннем онтогенезе на реализацию генетической информации в качестве генетических индукторов [62].

## LONG-LASTING ALTERATIONS OF BRAIN MONOAMINE SYSTEMS INDUCED BY HARMFUL ENVIRONMENTAL FACTORS IN THE EARLY ONTOGENY

NAUMENKO E. V.

Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk, USSR

Data concerning long-lasting alterations of brain catecholamine and serotonin systems after protein malnutrition, alcohol, narcotic or glucocorticoid treatment, as well as systemic and emotional stress effect in the early ontogeny have been analyzed and summarized. The evidence from the author's laboratory pointing to a connection between the emotional stress response and modification of the brain noradrenergic mechanism in adults induced by stress or prenatal glucocorticoid exposure and the dependence of the effects mentioned on genetical factors are presented.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Shoemaker W. J., Wurtman R. J. *Science*, v. 171, p. 1017-1019, 1971.
2. Ramanamurthy P. S. V. *J. Neurochem.*, v. 28, p. 253-254, 1977.
3. Lee C.-J., Dubos R. J. *Exp. Med.*, v. 136, p. 1031-1042, 1972.
4. Stern W. C., Forbes W. B., Resnik O., Morgane P. J. *Brain Res.*, v. 79, p. 375-394, 1974.
5. Sobotka T. J., Cook M. F., Brodie R. E. *Brain Res.*, v. 65, p. 443-457, 1974.
6. Stern W. C., Miller M., Forbes W. B., Morgane P. J., Resnik O. *Exp. Neurol.*, v. 49, p. 314-326, 1975.
7. Hawrylowicz E. J., Kissane J. Q.—In: *Biogenic Amines in Development* (eds. H. Parvez, S. Parvez), p. 493-517, Elsevier North Holl. Biomed. Press, Amsterdam, 1980.
8. Kalyanasundaram S., Ramanamurthy P. S. V. *J. Neurochem.*, v. 36, p. 1580-1582, 1981.
9. Shoemaker W. J., Wurtman R. J. *J. Nutr.*, v. 103, p. 1537-1547, 1973.
10. Marichich E. S., Molina V. A., Qrsinger O. A. *J. Nutr.*, v. 109, p. 1045-1050, 1979.
11. Wiggins R. C., Fuller G., Enna S. J. *Life Sci.*, v. 35, p. 2085-2094, 1984.
12. Parvez S., Imahan G., Parvez H.—In: *Biogenic Amines in Development* (eds.

H. Parvez, S. Parvez), p. 441-492, Elsevier North Holl. Biomed. Press, Amsterdam, 1980.

13. Keller E. A., Munaro N. I., Orsingher O. A. *Science*, v. 215, p. 1269-1270, 1982.
14. Nittler M., Leahy J. P., Stern W. C., Morgane P. J., Resnik O. *Exp. Neurol.*, v. 57, 142-157, 1977.
15. Smart J. L., Tricklebank M. D., Adlard B. P. F., Dobbing J. *Pediat. Res.*, v. 17, p. 807-811, 1976.
16. Hernandez R. J.—In: *Catecholamines: Basic and Clinical Frontiers* (eds. E. Usdin, I. J. Kopin, J. P. Barchas), p. 830-832, Perg. Press, N. Y., 1979.
17. Hernandez R. J., Chagoyz G. *Develop. Brain Res.*, v. 25, p. 221-226, 1986.
18. Nelson M. F., Pison H. F., Little L. D. *Life Sci.*, v. 28, p. 231-237, 1981.
19. Spear L. P., Sealza F. M. *Develop. Brain Res.*, v. 18, p. 113-117, 1985.
20. Hernandez R. J. *Experientia*, v. 29, p. 1487-1488, 1973.
21. Kaladhar M., Narasinga R. B. S. *J. Neurochem.*, v. 40, p. 1768-1770, 1983.
22. Hall R. D., Leahy J. P. *Physiol. Behav.*, v. 31, p. 187-195, 1983.
23. Буров Ю. В., Вадришкова Н. Н. Нейрохимия и фармакология алкоголизма. М., Медицина, 1985.
24. Ruthven W., Druse M. J. *Neurochem.*, v. 44, p. 57-62, 1985.
25. Deterding N., Collins R. M., Hawkins R. L., Ozand P. T., Karahasan A. J. *Neurochem.*, v. 34, p. 1587-1593, 1980.
26. Deterding N., Collins R. M., Hawkins R. L., Ozand P. T., Karahasan A. J. *Neurochem.*, v. 34, p. 1788-1791, 1980.
27. Deterding N., Collins R. M., Hawkins R. L., Ozand P. T., Karahasan A. J. *Neurochem.*, v. 36, p. 2094-2096, 1981.
28. Krstak M., Elts J., Poschlova V., Masek K. *J. Stud. Alcohol.*, v. 38, p. 1696-1704, 1977.
29. Rawat A. K. *J. Neurochem.*, v. 28, 1175-1182, 1977.
30. Deterding N., Edwards E., Ozand P., Karahasan A. J. *Neurochem.*, v. 34, p. 297-301, 1980.
31. Branchey L., Friedhoff A. J. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 273, p. 328-330, 1976.
32. Thadani P. V., Lau C., Slotkin T. A., Schanberg S. M. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, v. 200, p. 292-297, 1977.
33. Slotkin T. A., Schanberg S. M., Kuhn C. M. *Experientia*, v. 36, p. 1005-1007, 1980.
34. Lucchi L., Covelli V., Petkov V. V., Spino P.-F., Trabucchi M. *Pharm., Biochem. and Behav.*, v. 19, p. 567-570, 1983.
35. Nelson L. R., Taylor A. N., Lewis J. W., Branch B. J., Liebeskind J. C. *Brain Res.*, v. 372, p. 234-240, 1986.
36. Dalterio S., Steger R., Mayfield D., Bartke A. *Pharm., Biochem. and Behav.*, v. 20, p. 107-113, 1984.
37. Dalterio S., Steger R., Mayfield D., Bartke A. *Pharm., Biochem. and Behav.*, v. 20, p. 115-123, 1984.
38. Lau C., Bartolomei M., Slotkin T. A. *Neuropharmacology*, v. 16, p. 473-478, 1977.
39. Slotkin T. A., Whitmore W. L., Salvaggio M., Siedler F. *Life Sci.*, v. 24, p. 1223-1230, 1979.
40. Plant S. M., Graham C. W., Lelner K. Y. *Develop. Psychobiol.*, v. 5, p. 215-221, 1972.
41. Peters D. A. V. *Pharm., Biochem. and Behav.*, v. 17, p. 721-725, 1982.
42. Sabrian S. K. *Develop. Psychobiol.*, v. 10, p. 41-51, 1977.
43. Moyer J. A., Herrenkohl L. R., Jacobowitz D. M. *Brain Res.*, v. 121, p. 383-393, 1977.
44. Moyer J. A., Herrenkohl L. R., Jacobowitz D. M. *Brain Res.*, v. 141, p. 175-178, 1978.

45. *Peters D. A. V. Pharm., Biochem. and Behav.*, v. 21, p. 417-422, 1984.
46. *Peters D. A. V. Pharm., Biochem. and Behav.*, v. 24, p. 1577-1582, 1986.
47. *Slotkin T. A., Cowdery T. S., Orband J., Pachman S., Whitmore L. J. Brain Res.*, v. 374, p. 63-74, 1986.
48. *Hedner T., Landborg P., Engel J. Pharm., Biochem. and Behav.*, v. 10, p. 647-650, 1979.
49. *Yuwiler A., Simon M., Bennett B., Plotkin S., Wallace B., Brammer G., Ulrich R. Endocrinol. experiment.*, v. 12, p. 21-31, 1978.
50. *Ulrich R., Yuwiler A., Geller E. Neuroendocrinology*, v. 19, p. 259-265, 1975.
51. *Nyakas C. Acta physiol. Acad. sci. hung.*, v. 50, p. 127-130, 1977.
52. *Nyakas C., Viltsek J., Ehdröcsi E.*—In: *Catecholamine and Stress, Recent Advances* (eds. E. Usdin, R. Kvetnansky, I. J. Kopin), p. 375-380. Elsevier/North Holl., Inc., N. Y., 1980.
53. *Turner B. B., Katz J., Carroll B. J. Brain Res.*, v. 116, p. 421-430, 1979.
54. *Crim M. C., Munro H. N.*—In: *Endocrinology* (eds. De Groot et al.), v. 3, p. 1987-2000. Grune and Stratton, N. Y., 1973.
55. *Pohorecky L. A., Rast E., Wets J. M., Michalak V. Clin. Exp. Res.*, v. 4, p. 423-426, 1980.
56. *Meltes J., Brant J. F., Van Vugt D. A., Smith A. F. Life Sci.*, v. 24, p. 1325-1336, 1979.
57. *Müller E. E., Nistco G., Scopagnini U.*—*Neurotransmitters and Anterior Pituitary Function*. Acad. Press, N. Y., 281 p., 1977.
58. *Naumenko E. V., Maslova L. N. Endocrinol. experiment*, v. 19, p. 171-178, 1985.
59. *Науменко Е. В., Дытало Н. Н. Онтогенез*, v. 10, с. 476-482, 1979.
60. *Naumenko E. V., Dygalo N. N.*—In: *Stress: The Role of Catecholamines and Other Neurotransmitters* (eds. E. Usdin, R. Kvetnansky, J. Axelrod) p. 839-847. Gordon and Breach Sci. Publ. Inc., N. Y., 1984.
61. *Дытало Н. Н., Науменко Е. В. Докл. АН СССР*, т. 271, с. 1003-1006, 1983.
62. *Naumenko E. V., Dygalo N. N.*—In: *Biogenic Amines in Development* (eds. H. Parvez, S. Parvez), p. 373-388. Elsevier/North Holl, Amsterdam, 1980.
63. *Науменко Е. В., Дытало Н. Н., Кудрявцева Н. Н., Докл. АН СССР*, т. 248, с. 1004-1006, 1979.
64. *Дытало Н. Н., Шишкина Г. Т., Миронов О. С., Бородин П. М., Науменко Е. В. Генетика*, т. 22, с. 500-506, 1986.
65. *Дытало Н. Н. Журн. общ. биол.*, т. 47, с. 455-457, 1986.
66. *Dygalo N. N., Yudin N. S., Naumenko E. V.*—In: *Fourth Sympos. on Catecholamines and Other Neurotransmitters in Stress, Smolenice Castle*, p. 26, Abstr., Czechoslovakia, 1987.
67. *Дытало Н. Н., Науменко Е. В. Генетика*, т. 20, с. 1974-1980, 1984.
68. *Маркель А. Л., Казин Э. М., Лурье С. Б., Науменко Е. В. Онтогенез*, т. 9, с. 160-165, 1978.
69. *Naumenko E. V., Markel A. L., Lurie S. B., Kazin E. M. Chronobiol. Internat.*, v. 2, p. 243-251, 1985.
70. *Маслова Л. Н., Лурье С. Б., Лукин Т. А., Решетин А. М., Науменко Е. В. Онтогенез*, т. 17, с. 56-61, 1986.
71. *Nyakas C., Lévary G., Viltsek J., Endrocsi E. Devel. Neurosci.*, v. 4, p. 225-232, 1981.

Поступила 12. I. 1983



## РЕЦЕНЗИИ

К. С. РАЕВСКИЙ, В. П. ГЕОРГИЕВ «Медиаторные аминокислоты: нейрофармакологические и нейрохимические аспекты», М., Медицина, 1986. 239 с.

Рецензируемая монография посвящена как важным нейрофармакологическим вопросам, так и не менее существенной нейрохимической проблеме—метаболизму нейромедиаторных аминокислот в головном мозгу, биохимическим основам влияния этих природных агентов и их искусственных аналогов, а также антагонистов на функциональное состояние нервных структур. Прямое участие в химической передаче нервной активности таких декарбоксилированных производных аминокислот (тирозина, триптофана и серина), как катехоламины, серотонин и ацетилхолин давно уже раскрыто, и роль этих нейромедиаторов всесторонне изучают. В последние же годы после открытия нейромедиаторной функции специфического компонента нервной ткани—ГАМК были обнаружены нейромедиаторные (и нейромодуляторные) свойства и таких свободных немодифицированных аминокислот, как глутаминовая и аспарагиновая, а также глицин; оказалась вероятной и нейромедиаторная роль окисленного продукта декарбоксилированного цистеина—таурина (2-аминоэтансульфоновой кислоты), аналога  $\beta$ -аланина.

Небольшая по объему книга, являющаяся результатом творческого сотрудничества советского (К. С. Раевский) и болгарского (В. П. Георгиев) специалистов, содержит большой, очень информативный при сжатости изложения материал, основанный на литературных и собственных экспериментальных данных авторов, уделивших должное внимание и клиническим аспектам проблемы нейромедиаторных аминокислот. Монография состоит из «Предисловия» (авторы—акад. АМН СССР В. В. Закусев и член-корр. Болгарской АН В. Петков), краткого «Введения», 8-и глав основного текста, «Заключения», «Резюме» и «Списка литературы» с 150 источниками, опубликованными в основном после 1980 г.

После сжатого изложения современных знаний о медиаторных механизмах центрального возбуждения и торможения (глава I) авторы в своем критическом обзоре основное внимание уделали более изученному в настоящее время вопросу, посвященному ГАМК; во II—V главах приведены обширные сведения о функциональной нейрохимии системы ГАМК, охарактеризованы фармакологические агенты, воздействующие на

систему ГАМК в различных отделах головного мозга, рассмотрено участие ГАМК и других нейромедиаторных аминокислот в процессах центральной регуляции физиологических функций, а также в механизме действия различных нейротропных средств. В VI главе приведены данные, свидетельствующие о роли глицина и таурина как возможных тормозных нейромедиаторах, а в VII главе описаны функции аминокислот в качестве возбуждающих передатчиков. При этом авторы в рамках небольшой книги рассмотрели фармакологические эффекты, вызываемые многочисленными распространенными ныне синтетическими синергистами и антагонистами нейромедиаторных аминокислот, включая молекулярные механизмы действия подобных агентов, и с нейрохимических позиций. Следует подчеркнуть, что ряд таких веществ нашел уже широкое применение в клинической практике. Наконец, большое внимание читателей должна привлечь VIII глава, в которой авторы очень содержательно обсудили такой важный медицинский вопрос, как нарушения функций аминокислот-нейромедиаторов при нервно-психических патологических процессах и пути их фармакотерапии. В «Заключении» авторы особо остановились на вопросе о функциональных рецепторах нейромедиаторных аминокислот, прежде всего ГАМК.

Весьма своевременно опубликованная монография К. С. Раевского и В. П. Георгиева, несомненно, должна вызвать интерес не только со стороны нейрохимиков, нейрофизиологов и нейрофармакологов, но и клиницистов-невропатологов и психиатров. Эту книгу по праву можно признать как ценный вклад в нейрохимическую фармакологию и функциональную нейрохимию.

ДЕМИН Н. Н.

SYNAPTIC TRANSMITTERS AND RECEPTORS (ED. S. TUČEK),  
ACADEMIA, PRAHA, 1987, 438 p.

СИНАПТИЧЕСКИЕ ТРАНСМИТТЕРЫ И РЕЦЕПТОРЫ (под  
ред. С. Тучека); Академия, Прага, 1987, 438 с.

Предлагаемая читателю книга представляет собой сборник материалов, составленных на базе пленарных, симпозиальных лекций, сообщений на круглых столах VI конференции Европейского нейрохимического общества, посвященной проблемам исследования синаптической передачи и синаптических рецепторов, которая состоялась в Праге с 1 по 6 сентября 1986 г. Вместе со вторым сборником материалов конференции данное издание позволяет получить самое современное представление о состоянии исследований в области изучения молекулярных основ функционирования нервной системы.

систему ГАМК в различных отделах головного мозга, рассмотрено участие ГАМК и других нейромедиаторных аминокислот в процессах центральной регуляции физиологических функций, а также в механизме действия различных нейротропных средств. В VI главе приведены данные, свидетельствующие о роли глицина и таурина как возможных тормозных нейромедиаторах, а в VII главе описаны функции аминокислот в качестве возбуждающих передатчиков. При этом авторы в рамках небольшой книги рассмотрели фармакологические эффекты, вызываемые многочисленными распространенными ныне синтетическими синергистами и антагонистами нейромедиаторных аминокислот, включая молекулярные механизмы действия подобных агентов, и с нейрохимических позиций. Следует подчеркнуть, что ряд таких веществ нашел уже широкое применение в клинической практике. Наконец, большое внимание читателей должна привлечь VIII глава, в которой авторы очень содержательно обсудили такой важный медицинский вопрос, как нарушения функций аминокислот-нейромедиаторов при нервно-психических патологических процессах и пути их фармакотерапии. В «Заключении» авторы особо остановились на вопросе о функциональных рецепторах нейромедиаторных аминокислот, прежде всего ГАМК.

Весьма своевременно опубликованная монография К. С. Раевского и В. П. Георгиева, несомненно, должна вызвать интерес не только со стороны нейрохимиков, нейрофизиологов и нейрофармакологов, но и клиницистов-невропатологов и психиатров. Эту книгу по праву можно признать как ценный вклад в нейрохимическую фармакологию и функциональную нейрохимию.

ДЕМИН Н. Н.

SYNAPTIC TRANSMITTERS AND RECEPTORS (ED. S. TUČEK),  
ACADEMIA, PRAHA, 1987, 438 p.

СИНАПТИЧЕСКИЕ ТРАНСМИТТЕРЫ И РЕЦЕПТОРЫ (под  
ред. С. Тучека); Академия, Прага, 1987, 438 с.

Предлагаемая читателю книга представляет собой сборник материалов, составленных на базе пленарных, симпозиальных лекций, сообщений на круглых столах VI конференции Европейского нейрохимического общества, посвященной проблемам исследования синаптической передачи и синаптических рецепторов, которая состоялась в Праге с 1 по 6 сентября 1986 г. Вместе со вторым сборником материалов конференции данное издание позволяет получить самое современное представление о состоянии исследований в области изучения молекулярных основ функционирования нервной системы.

Рецензируемая книга включает восемь глав. В I главе («Молекулярные механизмы хранения и секреции нейротрансмиттеров») большое внимание уделено анализу механизма действия протонной АТФазы хромаффинных гранул, роли цитоскелета в регуляции процесса секреции нейрого르몬ов, вопросам биосинтеза и хранения хромогранинов А, В, С в различных органеллах. Ряд статей посвящен вопросам молекулярной и функциональной организации холинэргических синаптических пузырьков, характеристике специфичного для холинэргических нейронов антигена, механизму действия ингибитора транспорта АХ АН5183, изучению механизмов функционирования ГАМК-эргической системы половых органов женщины и крыс-самок. В той же главе представлен обширный материал, касающийся анализа строения и молекулярной фармакологии потенциалзависимых кальциевых каналов.

Актуальнейшей проблемой — исследованию синаптических рецепторов в мозгу человека посвящена II глава («Синаптические рецепторы в человеческом мозгу»). Статьи этого интереснейшего раздела касаются вопросов распределения нейрорецепторов в мозгу человека. Рассмотрено применение методов автордиографии, радиолигандов анализа, позитронной томографии для решения этих вопросов. Особого внимания здесь заслуживает метод позитронной томографии (РЕТ), использование которого позволяет проводить изучение распределения и свойств рецепторов нейротрансмиттеров непосредственно в организме человека. Показана высокая эффективность позитронной томографии при изучении фармакокинетики лекарственных препаратов.

Большое внимание в книге уделено изучению мускариновых и никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (глава III «Мускариновые и никотиновые ацетилхолиновые рецепторы»). Целый ряд статей этого раздела посвящен вопросам гетерогенности рецепторов, кооперативных и аллостерических взаимодействий между центрами связывания рецепторов, механизма клеточного ответа на действие лигандов мускариновых рецепторов. Рассмотрены свойства мускариновых рецепторов в культурах клеток; методами генной инженерии проведен сравнительный анализ строения никотиновых ацетилхолиновых рецепторов различных биологических объектов.

Одной из наиболее «горячих точек» нейробиологии — исследованию роли в нейробиохимических процессах нейропептидов, их рецепторов и ферментов деградации посвящена IV глава («Нейропептиды, их рецепторы и ферменты деградации»). В этом разделе книги рассмотрены вопросы о роли нейропептидов в ЦНС, физико-химического изучения взаимодействий нейропептидов, в частности опиоидной природы, с рецепторами, клонирования генов нейропептидов. Значительное внимание уделено ферментам деградации нейропептидов, в частности ферментам превращения окисных пептидов, вазоактивных пептидов, нейротензина и др.

V глава книги («Рецепторконтролируемая аденилатциклаза») посвящена регуляции активности аденилатциклазы через сопряженные с фер-

ментом нейрорецепторы. В статьях этого раздела рассмотрены вопросы модуляции активности аденилатциклазы катехоламинами, ГАМК, фактором роста нервов.

Глава VI («Фосфоинозитиды и нервная передача») касается вопросов участия фосфоинозитидов в механизме передачи нервного сигнала. Помимо общей оценки состояния проблемы, в этом разделе подробно рассмотрены подходы и методы изучения метаболизма фосфоинозитидов в мозгу, взаимосвязи гидролиза этих липидов, с функциональной активностью нервных клеток.

Исключительно важной проблеме участия нейротрансмиттеров и пептидов в механизме формирования стрессорных реакций организма посвящена VII глава «Нейротрансмиттеры и пептиды при стрессе»). В этом разделе подробно рассмотрены вопросы центральной регуляции функций надпочечников у животных при стрессе, изменений в процессе стресса уровней релизинг-фактора кортикотропина и вазопрессина в гипоталамусе, метаболизма катехоламинов и индоламинов в различных отделах мозга и крови, концентрации в крови опиоидных пептидов. Значительное внимание уделено роли кортикотропина, гормона роста, пролактина, гонадотропинов, кортизола в формировании реакций организма на стрессорное воздействие.

Проблемам изучения мембран нейронов, ионных каналов, а также взаимодействия с ними нейротоксинов посвящена последняя глава («Нейрональные мембраны, ионные каналы и нейротоксины»). В этом разделе сборника рассмотрена динамика липидов в процессе связывания лигандов с рецепторами. Значительный цикл работ посвящен взаимодействию токсинов с натриевыми, калиевыми, кальциевыми каналами.

Представленные в предлагаемом сборнике работы написаны ведущими учеными-нейрохимиками: V. P. Whittaker, S. Tuček, E. Barnard, J. C. Baron, T. Bartfai, J. Enna, L. Erdő, M. Hapley, M. Hirsch, P. Laduron, M. Lazdunski, G. Lunt, S. Nahorski, N. Osborne, J. I. Percy, D. G. Smyth, M. Sokolovsky, A. Tunner, R. Valle, H. Winkler, H. Zimmermann, A. A. Галояном, Л. Д. Бергельсоном и др.

В заключение хотелось бы отметить, что по широте и глубине охватываемых вопросов, постановке научных проблем книга, несомненно, занимает важное место среди современных подобных изданий. Данная книга позволяет проследить тенденции развития современной рецептологии и биохимии нейротрансмиттеров, что представляет исключительную ценность как для исследователей, работающих в указанных областях, так и для тех научных работников, которые собираются заняться этими проблемами.

ВАРФОЛОМЕЕВ С. Д.  
ЗАЙЦЕВ С. В.

МЕТАБОЛИЗМ И РАЗВИТИЕ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ (под  
ред. С. Тучека), Академия, Прага, 1987, 400 с.

Эта книга отражает последние достижения и современный уровень исследований в важнейших отраслях нейрохимии и молекулярной биологии.

Большое внимание VI конференции Европейского нейрохимического общества уделялось биохимическим механизмам межклеточного взаимодействия в процессе развития нервной системы. В ходе онтогенетического развития нервные клетки претерпевают пролиферацию, миграцию, избирательную агрегацию и последующее созревание. Регуляция этих событий осуществляется с помощью различных факторов—веществ клеточной адгезии, факторов роста, протеолитических ферментов и других соединений. В разделе, посвященном роли сигнальных молекул в клеточном узнавании, росте и дифференцировке нервной системы дается характеристика изученных к настоящему времени веществ клеточной адгезии, обеспечивающих специфическое узнавание и взаимодействие клеток нервной ткани (Faissner, ФРГ; Wock и соавт., Дания). Эти вещества представляют собой гликопротеины. Один из этих белков (N-CAM) экспрессирован во всех основных клетках центральной и периферической нервной системы и на поверхности мышечных клеток, опосредует их взаимодействие. Молекулы клеточной адгезии L1 экспрессированы в ткани мозга млекопитающих лишь на поверхности постмитотических нейронов и осуществляют  $Ca^{2+}$ -независимую агрегацию нервных клеток. Вещество клеточной адгезии J1 присутствует лишь на поверхности глиальных клеток, оно участвует в формировании структур экстрацеллюлярного матрикса. К числу веществ клеточной адгезии, характерных для нервной ткани, относится и MAG—связанный с миелином гликопротеин. Эти соединения имеют не только различные детерминанты, но и общую антигенную, выявляемую также на поверхности естественных клеток-киллеров человека. С помощью методов молекулярной генетики были установлены видовые различия в структурной организации наиболее изученного из этих соединений—N-CAM. К числу посттрансляционных изменений, которые претерпевают молекулы N-CAM и L1, относятся гликозилирование, фосфорилирование, сульфирование. Молекулы N-CAM (в отличие от молекул L1) подвергаются также полисинализации. Эти соединения имеют общие углеводные последовательности с ганглиозидами, которые, по современным представлениям, также участвуют в процессах адгезии клеток нервной ткани.

Не меньший интерес для понимания биохимических механизмов взаимодействия клеток нервной ткани представляют нейротрофические, нейритогенные и нейротоксические факторы, химическая природа которых как показали исследования последних лет, различна. В настоящее

время в химически чистом виде выделено три белка с нейротрофическим эффектом, из которых 'лучше' всего изучены фактор роста нервов (NGF), обладающий способностью воздействия на холинергические нейроны мозга и другие нервные клетки, и нейротрофический фактор, выделенный из мозга млекопитающих (BDNF). Эти вещества обладают также нейритогенным эффектом. В процессе развития мозга при установлении межнейрональных контактов происходит, очевидно, конкуренция за нейротрофические факторы, выделяемые клеткой-мишенью: те нейроны, аксоны которых не получают доступа к этим факторам, отмирают (G. Mooney и соавт., Дания). Среди медиаторов нейротрофическим и нейритогенным эффектом обладает, как оказалось, ГАМК. Ее метаболитический предшественник и функциональный антагонист—глутаминовая кислота, напротив, является нейротоксическим фактором, так называемым эксайтотоксином (T. Wieloch, Швеция). И, наконец, в роли нейротрофических и нейритогенных факторов выступают ганглиозиды. Получены многочисленные свидетельства того, что экзогенные ганглиозиды способствуют образованию отростков и регенерации нервных клеток мозга в опытах *in vivo* и *in vitro* (W. Seifert и соавт., ФРГ; E. Javin и соавт., Израиль).

На состояние нервных клеток также оказывают влияние вещества, выделяемые глией. В разделе, посвященном биологии глии, описана расщипровка с помощью методов молекулярной генетики первичной структуры одного такого белка, стимулирующего образование отростков нейронами и тормозящего миграцию нейробластов из экстрагранулярного слоя мозжечка в интрагранулярный. Этот белок, как оказалось, является сильным ингибитором сериновых протеаз. Он экспрессирован почти исключительно в клетках нервной ткани (S. Gloor и соавт., Швейцария). Химически идентифицированы и другие соединения, выделяемые ганглиями клетками и оказывающие влияние на дифференцировку, миграцию и выживание нейронов. Некоторые из них, например, ламинин, является компонентом межклеточного пространства (D. Monard и соавт., ФРГ; N. Vassalli, Франция).

Интересные данные, проливающие свет на механизм действия ганглиозидов, приведены в разделе, посвященном этим соединениям. Как оказалось, ганглиозиды в концентрации  $10^{-8}$ — $10^{-7}$  М способны активировать как  $Ca^{2+}$ -зависимые, так и  $Ca^{2+}$ -независимые протеникиназные системы, причем для проявления активирующего действия ганглиозидов необходимо сохранение структур клеточных мембран (Y. Nagai и соавт., Япония). В работе G. Tettamanli и соавт. (Италия) обсуждены молекулярные основы функциональной активности ганглиозидов клеточных мембран, особое внимание уделяется их способности образовывать кластеры, мисцеллы, взаимодействовать с гликопротеинами. При изучении природных адаптаций (Н. Ф. Аврова, СССР) было показано, что функциональная активность ганглиозидов клеточных мембран зависит от строения не только углеводного компонента, но и керамидной части молекулы.

Ряд разделов книги посвящен обмену веществ нервной ткани при

патологии— дегенеративных болезнях, ишемическом поражении мозга и нейропатологии аксонального транспорта. Обращает на себя внимание тесная взаимосвязь и взаимообогащение исследований молекулярных механизмов развития нервной системы и ее патологических изменений. Так, причинами гибели нейронов при болезнях Альцгеймера и Хантингтона, ишемических поражениях мозга и других патологиях могут, очевидно, быть те же причины, которые вызывают гибель части нервных клеток в онтогенезе: недостаток нейротрофических факторов, увеличение концентрации эксайтотоксинов (глутаминовой, аспарагиновой, кинолиновой кислот), чрезмерная активность протеолитических ферментов, приводящая к перевариванию элементов цитоскелета, и другие (Bodsch и соавт., ФРГ; S. Stipek и соавт., ЧССР; A. N. Davison, Англия). Нарушение баланса в интегральном влиянии разных факторов, определяющих активность нервных клеток, может приводить к патологическим изменениям и гибели нейронов. Получены свидетельства того, что в основе этих изменений при болезни Альцгеймера лежат, по-видимому, такие нарушения генетического аппарата нейронов, как снижение способности клеток устранять имеющиеся, хотя и незначительные, нарушения в структуре ДНК (H. S. Bachelard и соавт., Англия). Нарушение энергетического обмена мозга называют также в числе возможных причин паркинсонизма (L. Battistin и соавт., Италия). Одной из причин массовой гибели клеток нервной ткани является, очевидно, ацидоз, возникающий при ишемических поражениях мозга в результате активации гликолиза (B. K. Siesjö, Швеция). К развитию нейропатий приводят также нарушения аксонального транспорта при диабете, перерезках нервов, действии токсинов и других патологических состояниях. Процесс регенерации аксона, установление новых синаптических контактов зависят от системы аксонального транспорта. Способность нервной системы сохранять свою структурную и функциональную организацию обусловлена пластичностью нервной ткани. Нервные клетки, очевидно, имеют свою «программу регенерации», в осуществлении которой важнейшая роль принадлежит генетическому аппарату, о чем свидетельствует изменение состава синтезируемых клеткой мРНК и значительное увеличение синтеза структурных белков (G. M. Kreutzberg и W. Tetzlaff, Канада). Ускорение регенерации нервных клеток наблюдается при экзогенном введении ганглиозидов. При этом улучшаются неврологические симптомы, вызванные экспериментальным аллоксановым диабетом, нормализуется аксональный транспорт (A. Gorio, A. M. Di Giulio, Италия). Ганглиозиды уже нашли применение в клинической практике при лечении периферических нейропатий человека различной этиологии, в том числе вызванных диабетом.

Большой раздел книги посвящен механизму действия  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы. В статье О. Д. Лопиной и соавт. (СССР) приводятся данные, поддерживающие гипотезу о том, что изменение сродства фермента к  $\text{K}^+$  и  $\text{Na}^+$  в результате его депротонирования играет решающую роль в сопряжении транспорта ионов и гидролитической функции  $\text{Na}^+$ -касоса. В связи с тем, что этот фермент играет важную роль в проведении нерв-

ного импульса большой интерес представляет изучение влияющих эндогенных регуляторов активности фермента: арахидоновой кислоты, катехоламинов, сердечных гликозидов и других (G. Rodrigez de Lores Arnais и соавт. Аргентина; F. Vyskocil и соавт. ЧССР).

Несколько особняком от общего содержания книги стоят работы, представленные в разделе «Новые подходы к регуляции метаболизма», посвященные изучению активности ферментов энергетического обмена в различных тканях организма. Представляет несомненный интерес для нейрохимиков работы, посвященные использованию методов ЯМР-спектроскопии для изучения энергетического метаболизма (H. S. Bachelard и соавт., Англия; В. В. Куприянов и соавт., СССР), анализу структурной организации и функционирования гликолитического мультиэнзимного комплекса эритроцитов (Б. И. Курганов, СССР), работы по изучению взаимосвязи между сократительной функцией сердечной мышцы, активностью креатинкиназы и уровнем потребления  $O_2$ .

В настоящее время усиленно разрабатываются методы анализа белков СМЖ в диагностических целях. В книге дается анализ современного состояния проблемы. Для анализа профилей иммуноглобулинов и других белков СМЖ широко применяются методы двумерного электрофореза в ПААГ, ИЭФ с последующим иммуноблоттингом. Показана возможность использования данных по содержанию в СМЖ мозгоспецифических белков (основного белка миелина, кислого глияльного фибриллярного белка S-100 и других) для установления органических поражений ЦНС при энцефалитах, травмах, опухолях и других патологических состояниях. Сравнивая профили белков СМЖ и плазмы крови, можно судить о состоянии ГЭБ. Выявлены показатели, характерные для рассеянного склероза, вирусного и туберкулезного менингита, энцефалита (С. J. M. Sindic и соавт., Бельгия). Дальнейшие исследования в этой области перспективны для разработки биохимических методов дифференциальной диагностики.

В заключение следует отметить, что рецензируемая книга отражает характерное для современного этапа развития науки объединение усилий молекулярных нейробиологов, иммунологов, нейропатологов, нейрофармакологов для решения задач, стоящих перед нейрохимией. При этом, наряду с традиционными, широко применяются такие методические приемы смежных областей науки, как методы молекулярной генетики, иммунологические и физиологические подходы.

Книга дает представление о последних достижениях в исследовании молекулярных основ развития нервной ткани и нарушений ее метаболизма при болезнях, связанных с поражениями ЦНС, и представляет несомненный интерес не только для нейрохимиков, но и для широкого круга физиологов, морфологов, клиницистов, работающих в области изучения нервной системы.

АВРОВА Н. Ф.  
НАЛИВАЕВА Н. Н.



РЕФЕРАТЫ СТАТЕЙ, НАПРАВЛЕННЫХ НА ДЕПОНИРОВАНИЕ В ВИНТИ

УДК 577.311.042.5

О НЕКОТОРЫХ СВОЙСТВАХ ПЕПТИДНОГО ИНГИБИТОРА  
ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ

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

В поддержании уровня циклических нуклеотидов, в частности для регуляции активности множественных форм ФДЭ циклических нуклеотидов, большое значение имеют естественные активаторы и ингибиторы ФДЭ.

Ранее нами сообщалось о факторе гипоталамусе, ингибирующем активность ФДЭ мозга (Сарибекян Г. А. и соавт., Тезисы докл. симпозиума «Циклические нуклеотиды и система регуляции ферментативных реакций», Рязань, 1985). Ингибитор является низкомолекулярным термостабильным пептидом.

В настоящей работе приводятся новые данные о дальнейшей очистке указанного пептида и характеристике некоторых его свойств.

После предварительной очистки пептидного фактора хлороформ-метанольной экстракцией и гель-фильтрацией его подвергали высоковольтному электрофорезу (ЭФ) на бумаге при рН 3,5 в пиридинацетатном буфере 0,8 М. Полученные данные показали, что пептидный фактор разделяется на ряд фракций, три из которых ингибируют ФДЭ циклических нуклеотидов. Среди этих фракций есть как ингибритриположительные, так и ингибритриотрицательные.

Для определения суммарного заряда пептидного фактора ЭФ вели при рН 6,5 в 1,5 М пиридинацетатном буфере. Оказалось, что три вышеуказанные фракции, обладающие активностью, движутся к катоду.

После высоковольтного ЭФ каждую из фракций, ингибирующих ФДЭ, подвергали дальнейшей очистке хроматографией на бумаге FN-11 в системе растворителей и-бутанолуксусная кислота:вода (4:1:5), что привело к разделению ингибирующих фракций еще на ряд подфракций.

Анализ аминокислотного состава и N-концевых аминокислот фракций, ингибирующих ФДЭ, свидетельствует о том, что активные фракции представляют собой в основном короткие 5- и 4-членные пептиды. Три ингибирующие активность ФДЭ подфракции имеют следующий состав:

1) глицин, треонин, глутаминовая кислота, фенилаланин, глицин, с N-концевой аминокислотой глицин; 2) треонин, глутаминовая кислота, глицин, лизин, с N-концевой аминокислотой глицин; 3) триптофан, глицин<sub>1-2</sub>, треонин, валин, с N-концевой аминокислотой валин.

Представляет интерес вопрос о том, являются ли указанные активные фракции пептидов самостоятельными ингибиторами, или это фрагменты одного общего предшественника. Выяснение этого вопроса требует дальнейших исследований.

6 с., ил., библиогр. 8

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Поступила 10 XI 1987

Рукопись депонирована в ВИНТИ

УДК 612.82+612.766.22

## ВЛИЯНИЕ ДЕЛЬТА-СОИ ИНДУЦИРУЮЩЕГО ПЕПТИДА НА СИСТЕМУ ГАМК В МОЗГУ КРЫС ПРИ ГИПОКИНЕЗИИ

МЕНДЖЕРИЦКИЙ А. М., УСКОВА Н. И., ЧОРАЯН И. О.

Существует предположение о модуляторном характере антистрессорного действия дельта-сои индуцирующего пептида (ДСИП), опосредованном через системы нейромедиаторов. В связи с этим представляется важным изучение влияния ДСИП на нейромедиаторные системы, принимающие участие в ответе организма на стрессорное воздействие. Одной из таких систем является ГАМК-ергическая система, основная тормозная система мозга, играющая важную роль в ограничении стресс-реакции и предупреждении стрессорных повреждений.

Целью данной работы было изучение влияния введения ДСИП на состояние некоторых показателей ГАМК-ергической системы мозга при гипокинезии. Выбор модели обусловлен изучением функционального состояния мозга при различных видах деятельности, связанных с длительным ограничением подвижности.

Введение ДСИП интактным животным не вызвало статистически достоверных изменений содержания ГАМК и активности ферментов ее метаболизма. После 6-часовой гипокинезии содержание ГАМК в мозгу крыс уменьшилось на 23% по сравнению с уровнем ГАМК в мозгу контрольных животных, уменьшилась также активность ферментов ее обмена. Активность ГДК снизилась на 46%, а активность ГАМК-Т — на 32%.

Предварительное, за 1 ч до гипокинезии, введение ДСИП приводило к нормализации уровня ГАМК в мозгу стрессированных животных. У этой группы животных содержание ГАМК в мозгу на 25% превышало ее содержание в мозгу стрессированных крыс, что обеспечивалось повышением активности ГДК на 71% и активности ГАМК-Т на 31% по

1) глицин, треонин, глутаминовая кислота, фенилаланин, глицин, с N-концевой аминокислотой глицин; 2) треонин, глутаминовая кислота, глицин, лизин, с N-концевой аминокислотой глицин; 3) триптофан, глицин<sub>1-2</sub>, треонин, валин, с N-концевой аминокислотой валин.

Представляет интерес вопрос о том, являются ли указанные активные фракции пептидов самостоятельными ингибиторами, или это фрагменты одного общего предшественника. Выяснение этого вопроса требует дальнейших исследований.

6 с., ил., библиогр. 8

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Поступила 10 XI 1987

Рукопись депонирована в ВИНТИ

УДК 612.82+612.766.22

## ВЛИЯНИЕ ДЕЛЬТА-СОИ ИНДУЦИРУЮЩЕГО ПЕПТИДА НА СИСТЕМУ ГАМК В МОЗГУ КРЫС ПРИ ГИПОКИНЕЗИИ

МЕНДЖЕРИЦКИЙ А. М., УСКОВА Н. И., ЧОРАЯН И. О.

Существует предположение о модуляторном характере антистрессорного действия дельта-сои индуцирующего пептида (ДСИП), опосредованном через системы нейромедиаторов. В связи с этим представляется важным изучение влияния ДСИП на нейромедиаторные системы, принимающие участие в ответе организма на стрессорное воздействие. Одной из таких систем является ГАМК-ергическая система, основная тормозная система мозга, играющая важную роль в ограничении стресс-реакции и предупреждении стрессорных повреждений.

Целью данной работы было изучение влияния введения ДСИП на состояние некоторых показателей ГАМК-ергической системы мозга при гипокинезии. Выбор модели обусловлен изучением функционального состояния мозга при различных видах деятельности, связанных с длительным ограничением подвижности.

Введение ДСИП интактным животным не вызвало статистически достоверных изменений содержания ГАМК и активности ферментов ее метаболизма. После 6-часовой гипокинезии содержание ГАМК в мозгу крыс уменьшилось на 23% по сравнению с уровнем ГАМК в мозгу контрольных животных, уменьшилась также активность ферментов ее обмена. Активность ГДК снизилась на 46%, а активность ГАМК-Т — на 32%.

Предварительное, за 1 ч до гипокинезии, введение ДСИП приводило к нормализации уровня ГАМК в мозгу стрессированных животных. У этой группы животных содержание ГАМК в мозгу на 25% превышало ее содержание в мозгу стрессированных крыс, что обеспечивалось повышением активности ГДК на 71% и активности ГАМК-Т на 31% по

сравнению с активностью ферментов в мозгу стрессированных животных.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что ДСИП вызывает изменения в метаболизме ГАМК у стрессированных животных, направленные на нормализацию состояния некоторых показателей ГАМК-ергической системы мозга. Введение ДСИП препятствует снижению содержания ГАМК и активности ферментов ее обмена в мозгу животных, подвергшихся действию гипокнезии.

6 с., ил., библиогр. 11

НИИ нейрокибернетики,

кафедра биохимии и биотехнологии РГУ

Поступила 22. XII. 1957

Рукопись депонирована в ВИНТИ

УДК 616.8.009.863+612.822+519.3+612.63

## ВЛИЯНИЕ ВНУТРИУТРОБНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ АЛКОГОЛЯ НА СВЯЗЫВАНИЕ [<sup>3</sup>H]ДИАЗЕПАМА С СИНАПТИЧЕСКИМИ МЕМБРАНАМИ НЕОКОРТЕКСА КРЫС В ПОСТНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ

ЖУЛИН В. В.

Изучали параметры связывания [<sup>3</sup>H]дiazепама с синаптическими мембранами неокортекса крыс-самцов в возрасте 3,5 месяца, матери которых во время беременности получали этанол в дозе 2÷4 г/кг в день.

Для оценки особенностей связывания [<sup>3</sup>H]дiazепама в подопытной и контрольной группах использовали анализ по Скэтчарду, в соответствии с которым данные, относящиеся к группе подопытных животных, были описаны с помощью мономолекулярного механизма связывания лиганда с рецептором, а результаты исследования контрольной группы аппроксимированы моделью двух независимых участков связывания. При этом у подопытных животных максимальное число доступных мест связывания ( $B_{max}$ ) составило  $320,6 \pm 14,7$  фмоль/мг белка и сродство ( $K_d = 2,31 \pm 0,10$  нМ), а связывание, соответствующее группе контрольных животных, представлено в виде суммы двух компонентов: высокоаффинного ( $K_d = 1,52 \pm 0,13$  нМ,  $B_{max} = 220,0 \pm 17,5$  фмоль/мг белка) и низкоаффинного ( $K_d = 27,0 \pm 2,3$  нМ,  $B_{max} = 380,0 \pm 30,2$  фмоль/мг белка) с суммарным уровнем связывания  $600,0 \pm 47,6$  фмоль/мг белка. Таким образом, воздействие алкоголя во внутриутробном периоде привело у взрослых крыс к значительному снижению уровня связывания [<sup>3</sup>H]дiazепама с синаптическими мембранами мозга.

По-видимому, снижение количества бензодiazепиновых рецепторов и соответственно ослабление модулирующего влияния на ГАМК-ергиче-

сравнению с активностью ферментов в мозгу стрессированных животных.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что ДСИП вызывает изменения в метаболизме ГАМК у стрессированных животных, направленные на нормализацию состояния некоторых показателей ГАМК-ергической системы мозга. Введение ДСИП препятствует снижению содержания ГАМК и активности ферментов ее обмена в мозгу животных, подвергшихся действию гипоксезии.

6 с., ил., библиогр. 11

НИИ нейрокибернетики,

кафедра биохимии и биотехнологии РГУ

Поступила 22. XII. 1957

Рукопись депонирована в ВИНТИ

УДК 616.8.009.863+612.822+519.3+612.63

## ВЛИЯНИЕ ВНУТРИУТРОБНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ АЛКОГОЛЯ НА СВЯЗЫВАНИЕ [<sup>3</sup>H]ДИАЗЕПАМА С СИНАПТИЧЕСКИМИ МЕМБРАНАМИ НЕОКОРТЕКСА КРЫС В ПОСТНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ

ЖУЛИН В. В.

Изучали параметры связывания [<sup>3</sup>H]дiazепама с синаптическими мембранами неокортекса крыс-самцов в возрасте 3,5 месяца, матери которых во время беременности получали этанол в дозе 2÷4 г/кг в день.

Для оценки особенностей связывания [<sup>3</sup>H]дiazепама в подопытной и контрольной группах использовали анализ по Скэтчарду, в соответствии с которым данные, относящиеся к группе подопытных животных, были описаны с помощью мономолекулярного механизма связывания лиганда с рецептором, а результаты исследования контрольной группы аппроксимированы моделью двух независимых участков связывания. При этом у подопытных животных максимальное число доступных мест связывания ( $B_{max}$ ) составило  $320,6 \pm 14,7$  фмоль/мг белка и сродство ( $K_d = 2,31 \pm 0,10$  нМ), а связывание, соответствующее группе контрольных животных, представлено в виде суммы двух компонентов: высокоаффинного ( $K_d = 1,52 \pm 0,13$  нМ,  $B_{max} = 220,0 \pm 17,5$  фмоль/мг белка) и низкоаффинного ( $K_d = 27,0 \pm 2,3$  нМ,  $B_{max} = 380,0 \pm 30,2$  фмоль/мг белка) с суммарным уровнем связывания  $600,0 \pm 47,6$  фмоль/мг белка. Таким образом, воздействие алкоголя во внутриутробном периоде привело у взрослых крыс к значительному снижению уровня связывания [<sup>3</sup>H]дiazепама с синаптическими мембранами мозга.

По-видимому, снижение количества бензодiazепиновых рецепторов и соответственно ослабление модулирующего влияния на ГАМК-ергиче-

скую систему может служить одной из причин увеличения двигательной активности, повышения возбудимости у животных, перенесших антенатальное воздействие алкоголя.

Также следует отметить, что в коре мозга новорожденных крыс обнаружена лишь одна популяция бензодиазепиновых рецепторов, в то время как у половозрелых животных выявлено по меньшей мере два участка связывания. Поэтому гомогенную популяцию рецепторов у подопытных животных можно рассматривать как вызванную внутриутробным воздействием алкоголя задержку развития.

6 с., 1 ил., библиогр. 14  
Институт ВНД и НФ АН СССР, Москва

Поступила 9. I 1988

Рукопись депонирована в ВИНТИ

---

Новое о пептидах мозга. т. I. J. Wiley and Sons. Ltd., Англия, 270 с., 1978.

Brain peptides update. v. I. (ed. D. T. Krieger) J. Wiley and Sons. Ltd, Baffinshane, Chichester, England, 270 p., 1978.

В первом разделе книги описываются сведения о нейропептидах, опубликованные до 1987 г., включающие данные о биосинтезе, структурной характеристике, рецепторах и ферментативной деградации, а также о технике определения и анализа точного анатомического распределения пептидов. В дополнительной главе этого раздела, написанной Puth Siegal, сообщается о достижениях в области *in situ* гибридизации. Во втором разделе анализируются недавние успехи по изучению специфических нейропептидов, включая TRH, клонирование которых осуществлено в последнее время, новые данные по холецистокинину, приводится описание гена VIP. Две главы посвящены энкефалинам и другим опиоидным пептидам. Одна из глав содержит обзор новейших исследований по структуре и функции бомбезина, GRP и по ангиотензиновой системы мозга. Особый интерес для психиатров представляет глава о достижениях химии пептидных гормонов применительно к психиатрии. Обзор нейротропных факторов является материалом еще одной из глав этого раздела.

## СОДЕРЖАНИЕ

Баян А. С., Круликов Р. И. Аутодрепоресепторы и стабильность адреналин-ческой передачи	165
Жулин В. В., Заблудовский А. Л. Влияние депривации парадоксальной фазы сна у беременных крыс на связывание [ <sup>3</sup> H]диазепама с синаптическими мембранами коры больших полушарий мозга на разных стадиях онтогенеза потомства крыс	172
Боровок Н. В., Молочкина Е. М., Дубинская Н. И., Бурлакова Е. Б. Липидная компонента синапсом головного мозга мышей как модулятор активности серотонинергической системы. 1. Изменения липидной компоненты синапсом головного мозга мышей при активации серотонинергической нейромедиаторной системы п-хлорамфетаминном и введения антиоксиданта	178
Куликова О. Г., Богданова Н. А., Разуновская Н. И. Действие антифенинов на эндогенное фосфорилирование белков хроматина нейронов головного мозга	189
Майзелис М. Я., Заблудовский А. Л., Шихов С. Н. Влияния пирacetама на включение меченых аминокислот в белки мозга животных, перенесших внутриутробные воздействия этилового алкоголя	197
Войтенко Н. Н., Савинкова Л. К., Москвитина Т. А., Горкин В. Э. Особенности MAO мозга серебристо-черных лисиц с наследственно закрепленной низкой агрессивностью	204
Балашова Е. К., Кузусева Л. И., Розенгарт В. И., Шерстобитов О. Е. Взаимодействие эзерина и байгона с ацетилхолинэстеразой мозга мышей <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i>	211
Шарова Н. П., Гураци Б. Я., Галоян А. А. О взаимосвязи между фосфодиэстеразой циклических нуклеотидов и 5'-нуклеотидазой гипоталамуса быка	217
Хватова Е. М., Гарсия А. Исследование кинетических свойств изоферментов малатдегидрогеназы мозга крыс при гипероксии	225
Аврущенко М. Ш., Маршак Т. Л. Содержание ДНК в нейронах ЦНС интактных и перенесших клиническую смерть собак	232

### Краткие сообщения

Бондарь О. И., Матышевская О. П., Васильев А. Н. Накопление Са <sup>2+</sup> синапсомами головного мозга в условиях деполяризации в динамике экспериментальной легкой черепно-мозговой травмы	238
Бунятян Г. Г., Микеладзе Д. Г., Абутидзе К. Д., Меликян А. М., Налбандян Р. М. Связывание лигандов D <sub>2</sub> -дофаминовых рецепторов с крайне кислым медьсодержащим белком мозга—нейрокупереном	242
Гасанова А. Г., Самедова Н. Ф., Исмаилов Ю. Б., Мамедов Э. Г. Влияние частоты стимуляции нейронов голубого пятна на содержание норадреналина и серотонина в коре больших полушарий головного мозга кроликов	247
Гринкевич Л. Н., Лисачев П. Д., Штарк М. Б. Влияние ацетилхолина на синтез белка в идентифицированных нейронах виноградной улитки	251
Иванов В. А., Семенова Т. П., Третьяк Т. М., Громова Е. А. Влияние норадреналина и серотонина на активность ДНКазы головного мозга крыс	255
Таранова Н. П., Нилова Н. С. Динамика индуцированного перекисного окисления липидов в синапсомах коры головного мозга крыс при нарушении сна	259

Методы исследования

Бондарева В. М., Лейбуш Б. Н., Русаков Ю. И. Выделение исулина из ткани мозга крыс и его биологическая характеристика . . . . . 268

Обзоры

Попова Н. К., Жанаева Е. Ю. Свойства, регуляция активности и функциональная роль триптофангидроксилазы мозга . . . . . 274  
Науменко Е. В. Длительные нарушения моноаминовых систем головного мозга, вызванные действием вредных факторов внешней среды в раннем онтогенезе . . . . . 288

Рецензии

Демин Н. Н., Раевский К. С., Георгиев В. П. «Медиаторные аминосиды: нейрофармакологические и нейрохимические аспекты» . . . . . 303

Хроника

Варфоломеев С. Д., Зайцева С. В. Синаптические трансмиттеры и рецепторы . . . 304  
Аврова Н. Ф., Наливаева Н. Н. Метаболизм и развитие нервной системы . . . . . 307

Резюме статей, направленных на депонирование в ВИНТИ

Сарибекян Г. А., Галфян В. Г., Киракосян А. С. О некоторых свойствах пептидного ингибитора фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов . . . . . 311  
Менджеричкий А. М., Ускова Н. И., Чароян И. О. Влияние дельта-сои индуцирующего пептида на систему ГАМК в мозгу при иммобилизационном стрессе у крыс . . . . . 312  
Жулин В. В. Влияние внутриутробного воздействия алкоголя на связывание [<sup>3</sup>H]диазепама с синаптическими мембранами неокортекса крыс в постнатальном периоде . . . . . 313

## CONTENTS

<i>Bazyan A. S., Kruglikov P. I.</i> Autoadrenoreceptors and stability of adrenergic transmission . . . . .	165
<i>Zhulin V. V., Zabludovsky A. L.</i> Effect of rapid eye movement sleep deprivation during pregnancy on [ <sup>3</sup> H]-diazepam binding to synaptosomal membranes of rat neocortex on the different stages of postnatal development . . . . .	172
<i>Borovok N. V., Molotchkina Ye. M., Dubinskaya N. I., Burlakova Ye. B.</i> Lipid component of mice brain synaptosomes modulate activity of serotonergic system. I. Changes in mice brain synaptosomal lipids under the activation under serotonergic neurotransmitter system by p-chloramphethamine injections and after antioxidant administration . . . . .	178
<i>Kulikova O. G., Bogdanova N. A., Razumovskaya N. I.</i> Effects of antifeines on endogenous protein phosphorylation in rat brain chromatin . . . . .	189
<i>Maizelis M. Ya., Zabludovsky A. L., Shikhov S. N.</i> Influence of pyracetam on brain protein metabolism in animals with prenatal exposure to ethanol . . . . .	197
<i>Voitenko N. N., Savinkova L. K., Moskvitina T. A., Gorkin V. Z.</i> Peculiarities of MAO from the brain of gray foxes with hereditary low aggressiveness . . . . .	204
<i>Balashova E. K., Kugusheva L. I., Rosengart V. I., Sherstobitov O. E.</i> Reaction of ezerin and bigone with mice brain AChE in vivo and in vitro . . . . .	211
<i>Sharova N. P., Gurvits B. Ya., Galoyan A. A.</i> Interrelation between bovine hypothalamus cyclic nucleotide phosphodiesterase and 5'-nucleotidase . . . . .	217
<i>Khvatova E. M., Garsia A.</i> Study of kinetic properties of hypoxyc rats MDH isoenzymes . . . . .	225
<i>Avrushchenko M. Sh., Marshak T. L.</i> DNA content in the neurons of CNS of control dogs and those who suffered from clinical death . . . . .	232

### Short communications

<i>Bondar O. I., Matyshevskaya O. P., Vasiliev A. N.</i> Ca <sup>2+</sup> -uptake by rabbit brain synaptosomes in depolarizing media during head injury . . . . .	238
<i>Buniatian G. H., Mikeladze D. G., Abutidze K. D., Melikyan A. M., Nalbandyan R. M.</i> Binding of D <sub>2</sub> -dopamine receptors ligands with extremely acid copper containing protein-neurocuprein . . . . .	242
<i>Gasanova L. G., Samedova N. F., Ismailov J. B., Mamcdov Z. G.</i> Effect of locus coeruleus stimulation frequency on monoamine-norepinephrine and serotonin content in rabbit brain cortex . . . . .	247
<i>Grinkevitch L. M., Lisachev P. D., Shtark M. B.</i> Acetylcholine induced protein biosynthesis in the neurons of helix pomatia . . . . .	251
<i>Ivanov V. A., Senyonova T. P., Tretyak T. M., Gromova E. A.</i> Effect of noradrenaline and serotonin on the activity of rat brain DNase . . . . .	255
<i>Taranova N. P., Nilova N. S.</i> Dynamics of the induced lipid peroxidation in rat brain cortex synaptosomes after sleep disturbance . . . . .	259
<i>Moiseev I. N.</i> Peculiarities of brain oxidative metabolism in mice with different sensibility to corazol treatment . . . . .	264

### Methods

<i>Bondareva V. M., Leibush B. N., Rusakov Yu. I.</i> Rat brain insulin: isolation and biological characteristics . . . . .	268
---	-----

## Reviews

<i>Popova N. K., Janaeva E. J.</i> Brain tryptophan hydroxylase: properties, regulation and functional role . . . . .	274
<i>Naumenko E. V.</i> Long-lasting alterations of brain monoamine systems induced by harmful environmental factors in the early ontogeny . . . . .	288

## Comments

<i>Doemin N. N., Rayevskiy K. C., Gorgiev V. P.</i> „Transmitter amino acids: neuropharmacological and neurochemical aspects” . . . . .	303
<i>Varfolomeev S. D., Zaitsev S. V.</i> „Synaptic Transmitters and Receptors” . . . . .	304
<i>Avrova N. F., Nalivayeva N. N.</i> Metabolism and development of nervous system” . . . . .	307

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

<i>Saribekyan G. A., Galfayan V. T., Kirakosova A. S.</i> Some properties of peptide inhibitors of cyclic nucleotide PDE . . . . .	311
<i>Mendzheritskiy A. M., Uskova N. I., Charoyan I. O.</i> Effect of DSIP on GABA system of brain . . . . .	312
<i>Zhulin V. V.</i> Effect of prenatal alcohol exposure on <sup>3</sup> H diazepam binding with rat neocortex synaptic membranes in postnatal period. . . . .	313

## INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

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

The Editorial Office  
Journal „Neirokhiemia“  
P. Sevak str. 5/1, Yerevan, 375044, USSR

### Arrangement of the manuscript

1. The first page should bear:
  - a) the title, concise but informative
  - b) the complete names of the author(s)
  - c) the name of the lab where the work was carried out
  - d) the address to which correspondence should be sent
2. Each paper should be preceded by a Summary giving a brief account to the most relevant contributions of the paper (100–200 words, 1,5 spacing) It's important to indicate the goal, the methods, the results and conclusions.
3. Experimental papers should be divided into the following sections: Materials and Methods, Results and Discussion, Reference List. It may be often advantageous to have only 2 sections: Results and Discussion. There's no need to split short communication.
4. Bibliographic citations should be made in numerical order (not more than 25 References for articles, 80—for reviews, 15—for short communications), in square brackets and in order of their citation in the text. The form of listed references is as follows: surname and initials of authors, journal name, volume and issue number, inclusive page numbers and year. For book titles the style is similar but contains book title—“In” followed by initials, surname of editor, the name and location of the publishing company.
5. Tables should be typed on separate pages and numbered in the order they appear in the text. They must have heading and contain only usually adopted abbreviations. Figures and graphs should be drawn separately on good quality drawing or tracing paper and put into envelope. Photographs should be glossy and as rich in contrast as possible. The back of each figure and photo should be labelled lightly in soft pencil to show the top of it, the author's name and the figure and photo number. Legends to figures and photos should be typed on separate pages.
6. The Editorial Board has got the right to shorten and improve the text not altering the main meaning.
7. Proofs are not sent to authors. For each article reprints are supplied free of charge.