

ТОМ 8, № 1, 1989

ISSN 0203-493X

НЕЙРОХИМИЯ

ՆԵՅՐՈՔԻՄԻԱ



АКАДЕМИЯ НАУК СССР
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

НЕЙРОХИМИЯ ՆԵՅՐՈՔԻՄԻԱ

ТОМ 8, ВЫП. 1
ЯНВАРЬ—МАРТ

Журнал основан в 1982 году
Выходит 4 раза в год

ИЗДАТЕЛЬСТВО АН АРМЯНСКОЙ ССР
ԵՐԵՎԱՆ 1989

Ст. редактор Э. А. Хачатурови
Лит. сотрудник Г. Р. Григорян
Тех. редактор Л. А. Азизбемян

Сдано в набор 12.01.1989 г. Подписано в печать 18.04.1989 г. ВФ 03981.
Формат 70×108¹/₁₆. Бумага № 1. «глубокой печати». Высокая печать. п. л. 10,0+1 вкл.
Усл. печ. лист. 14,18. Усл. кр. отт. 14,18. Учет.-изд. 11,13. Тираж 665. Заказ 36.
Издат. 7563. Цена 1 р. 65 к.

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

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

Типография Издательства Академии наук АрмССР, 375019, Ереван-19,
пр. Маршала Баграмяна, 24.

Редакционная коллегия

А. А. ГАЛОЯН—главный редактор

Н. Ф. АВРОВА, Г. В. АПРИКЯН, А. В. АРУТЮНЯН (зам. главного редактора),
Л. С. АРУТЮНЯН (отв. секретарь), И. П. АШМАРИН, Р. Н. ГЛЕБОВ,
К. Г. КАРАГЕЗЯН, В. К. ЛИШКО, В. С. ОГАНЕСЯН,
К. С. РАЕВСКИЙ, Л. Я. ТЯХЕПЫЛД, Г. С. ХАЧАТРЯН.

Редакционный совет

Н. Г. АЛЕКСИДЗЕ, О. Г. БАКЛАВАДЖЯН, А. Ю. БУДАНЦЕВ, В. А. БЕРЕЗИН,
М. Е. ВАРТАНЯН, Г. П. ГЕОРГИЕВ, М. А. ДАВТЯН, С. А. ДАМБИНОВА,
Н. Н. ДЕМИН, Н. Д. ЕЩЕНКО, П. Г. КОСТЮК, Б. Н. МАНУХИН,
Д. Г. МИЖЕЛАДЗЕ, Ю. А. ПАНКОВ, А. Т. ПИКУЛЕВ, Н. К. ПОПОВА,
В. И. РОЗЕНГАРТ, В. П. СКУЛАЧЕВ, Н. П. ТАРАНОВА,
С. Х. ХАЙДАРЛИУ, Е. М. ХВАТОВА, Р. Н. ЭТИНГОВ

К СВЕДЕНИЮ ЧИТАТЕЛЕЙ!

Журнал «НЕЙРОХИМИЯ» (орган АН СССР и АН АрмССР) основан в 1982 г. В нем публикуются статьи по актуальным вопросам функциональной нейрохимии, касающимся структуры и биологической роли специфических белков, нейропептидов, нуклеиновых кислот и нуклеотидов, липидов и других соединений нервной ткани, биохимии трансмиттеров и их рецепторов, глии и нейронов, хромоаффинных гранул и т. д.

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

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

Подписку на журнал «Нейрохимия» можно осуществить во всех отделениях «Союзпечати» (индекс для подписки — 70637), а за границей через агентство «Международная книга». Журнал выходит 4 раза в год. Цена одного номера — 1 руб. 65 коп.

РЕДКОЛЛЕГИЯ



УДК 577.354.9

ВЛИЯНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ ВОДОРАСТВОРИМЫХ
ФЕНОЛЬНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ НА АКТИВНОСТЬ
М-ХОЛИНЕРГИЧЕСКОЙ РЕЦЕПТОРНОЙ СИСТЕМЫ КРЫС

ХОХЛОВ А. П.

Научно-исследовательский институт урологии, Москва

Изучено влияние *in vivo* и *in vitro* синтетических водорастворимых антиоксидантов из класса экранированных фенолов на активность мускариновой холинергической (м-холинергической) системы головного мозга крыс. Обнаружено, что влияние антиоксидантов на передачу сигнала в указанной рецепторной системе реализуется не на уровне регуляции комплексообразования специфических лигандов с рецепторным центром связывания, а на уровне трансмембранного переноса информационного сигнала. Данное влияние, осуществляемое *in vitro* при концентрациях антиоксидантов выше 10 мкМ, связано, по-видимому, с их неспецифическим взаимодействием с клеточными мембранами и опосредовано изменением физико-химического состояния мембранных липидов. Эффективность действия *in vivo* фенольных антиоксидантов на активность м-холинергической системы головного мозга крыс в наномолярных концентрациях не может быть объяснена с помощью указанного механизма. Предполагено, что подобная низкоконтрационная эффективность объясняется наличием специфических мест связывания для синтетических водорастворимых антиоксидантов из класса экранированных фенолов, взаимодействием данных соединений с клеточными плазматическими мембранами по рецепторному механизму и опосредованным через такое взаимодействие влиянием антиоксидантов на активность различных функциональных систем клетки, в том числе и на активность других мембранных рецепторных систем.

В настоящее время считается не подлежащим сомнению тот факт, что регуляция многочисленных биохимических процессов в организме опосредуется через систему клеточных мембран и, в частности, через физико-химический статус последних. Важнейшую роль в определении направленности указанных процессов играют изменения в липидной фазе мембран клеточных органелл, например, изменения липидного состава, уровня окисленности мембранных липидов, их микровязкости, полярности и др. Изменения многочисленных физико-химических параметров липидной фазы не происходят в отрыве друг от друга, а тесно взаимосвязаны между собой. Вышесказанное нашло отражение в гипотезе о наличии в организме млекопитающих замкнутого самоподдерживающегося контура регуляции, основой которого являются изменения в уровне реакций ПОЛ кле-

точных мембран, в липидном составе и подвижности, регулирующих протекание биохимических реакций в клетке [1].

Ранее нами было показано, что направленное изменение в липидной фазе мембран уровня окислительных реакций (за счет введения животным синтетических антиоксидантов) приводило не только к изменению физико-химических характеристик липидов синапсом головного мозга крыс, но и к изменению активности м-холинергической системы мозга, анализируемой *in vivo* с помощью ареколинового теста [2]. При анализе экспериментальных данных по изменению текучести и состава липидов синапсом выяснилось, что после введения животным водорастворимый антиоксидант проявлял двуфазный характер своего действия на липидный бислой. Первоначально регистрировалось кратковременное изменение ряда липидных показателей в одну, а затем, на гораздо более продолжительный период времени, в другую, отличную от контроля, сторону, что послужило предпосылкой для гипотезы о существовании еще одного (кроме антирадикального) механизма действия синтетических антиоксидантов на клеточный метаболизм. Вероятно, антиоксидант, как биологически активное вещество, действует по типу рецепторного взаимодействия с мембраной. Такого рода действие антиоксидантов на клетку предполагает наличие специфических мест связывания для этих веществ на плазматической мембране клеток. Возможен также рецепторноподобный путь влияния синтетических антиоксидантов на клеточный метаболизм, опосредованный неспецифическим взаимодействием препарата с клеточной мембраной, когда подобное взаимодействие приводит к изменению структуры мембранного бислоя, а следовательно, и к изменению активности мембраносвязанных рецепторных комплексов, специфичных к другим биологически активным веществам.

С целью выяснения правомочности последнего предположения и была выполнена настоящая работа, посвященная изучению влияния *in vivo* и *in vitro* синтетических водорастворимых антиоксидантов из класса экранированных фенолов на активность одной из важнейших рецепторных систем регуляции биологической активности организма—м-холинергической системы головного мозга крыс.

Материалы и методы

В работе были использованы крысы-самцы линии *Wistar*, массой 180—200 г, содержащиеся на стандартном виварном рационе.

Синапсомы изолировали из больших полушарий головного мозга крыс по методу, описанному ранее [3], чистоту препаратов синапсом оценивали с помощью электронной микроскопии ультратонких срезов, после заливки препаратов в «Эпон-812», на электронном микроскопе «JEM-100 CX» (Япония). Полученные изображения для синапсомной фракции существенно не отличались от тех, которые приведены в соответствующей методической работе [4].

Солюбилизацию м-холинорецепторов проводили при 40-минутной обработке фракции синапсом головного мозга крыс 1%-ным раствором ди-

гитонина в среде, содержащей 1 мМ $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$, 1 М NaCl , 50 мМ трис- HCl -буфер, рН 7,4 [5].

При изучении влияния антиоксидантов на процесс комплексообразования лиганда с м-холинорецепторами использовали специфический антагонист этих рецепторов [^3H]хинуклидинилбензилат (ХНБ; «Amersham», Англия, удельная радиоактивность 12,3 Ки/ммоль). Синапсомы (500 мкг белка/мл) инкубировали 60 мин при 25° с [^3H]ХНБ (10 нМ) в среде следующего состава (в мМ): N-2-оксипириперазин, N'-2-этансульфоновая кислота (HEPES)—5; KCl —125; CaCl_2 —1; MgCl_2 —1; KH_2PO_4 —0,5; рН 7,4. Фракцию солюбилизированных м-холинорецепторов (250 мкг белка/мл) инкубировали с [^3H]ХНБ при тех же условиях в среде следующего содержания (в мМ): трис- HCl -буфер—50; $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ —1; NaCl —1; полиэтиленгликоль-6000—7,5%; БСА—0,35%; рН 7,7. Специфическое связывание определяли как долю суммарного, блокируемого атропин-сульфатом (10 мкМ). Разделение связанного и свободного лиганда проводили методом вакуумного фильтрования через фильтры GF («Whatman», Англия) [6]. Во всех случаях учитывалось неспецифическое связывание меченых препаратов с фильтрами.

При исследовании структурного состояния мембранного липидного бислоя методом ЭПР-спектроскопии использовали два гидрофобных спинных зонда: доксильное производное стеариновой кислоты с нитроксидным кольцом при 5-м атоме углеродного скелета (5-доксилстеарат; «Sigma», США) и 2,2,6,6-тетраметил-4-пальмитилоксипиперидин-1-оксил (15С). Конечная концентрация зондов в образцах составляла 100 мкМ; концентрация белка в исследуемых суспензиях синапсом равнялась 5 мг/мл. Подвижность зонда 15С в липидном бислое оценивали по времени вращательной корреляции τ_c из уравнения для быстрого изотропного вращения спин-зондов [7]. В случае зонда 5-доксилстеарата, в качестве меры анизотропии вычисляли параметр упорядоченности S [7].

ПОЛ в синапсоммах оценивали по поглощению конъюгированных дисковых структур при 233 нм, после перевода экстрагированных липидов в гексан. Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре «Hitachi-557» (Япония).

В качестве суммарной оценки отношения активности м-холинэргической рецепторной системы ЦНС крыс к действию определенной дозы антиоксиданта использовали ареколиновый тест [8]. Последовательное введение растворов м-холиномиметика ареколина различной концентрации позволяет определить эффективную дозу, при которой у 50% животных выборки наблюдается тремор спинной мускулатуры (ED_{50}). Смещение этого показателя позволяет судить об изменении чувствительности ЦНС к действию той или иной дозы эффекторного вещества и характеризует изменение активности м-холинэргической рецепторной системы.

Содержание в образцах cGMP определяли радиоиммунным методом с использованием стандартного набора реактивов фирмы «Amersham» (Англия) [9].

В качестве водорастворимых синтетических антиоксидантов в работе

были использованы препараты из класса экранированных фенолов: γ -(4-окси-3,5-дитрет.бутилфенол) пропионовая кислота (фенозан) и калиевая соль фенозана (K^+ -фенозан). Автор благодарит сотрудников института химической физики АН СССР В. В. Ершова и Л. Г. Плеханову за антиоксиданты, предоставленные ими для проведения настоящей работы.

Результаты и обсуждение

На рис. 1, а представлена дозовая зависимость влияния антиоксидантов на активность *in vivo* м-холинергической системы ЦНС крыс, исследованная с помощью ареколинового теста. Можно видеть, что через 30 мин после внутрибрюшинного введения эффективными являются весьма низкие дозы фенозана и K^+ -фенозана—до 1 мкг на кг веса животных; ука-

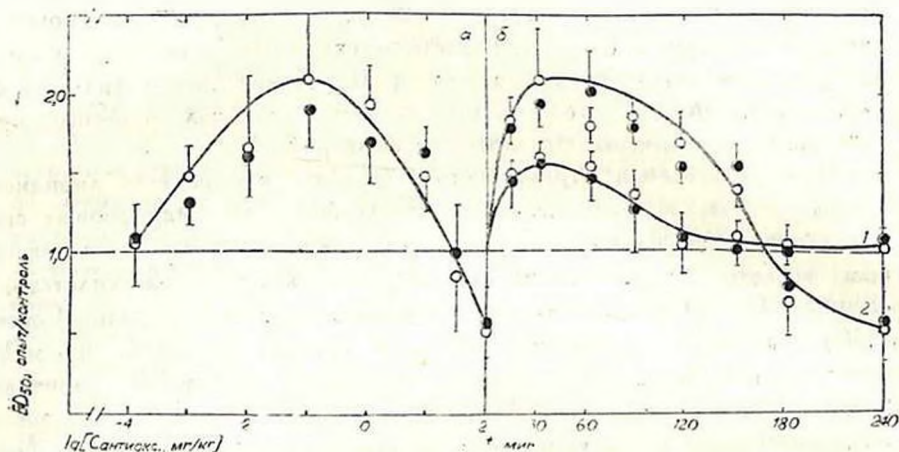


Рис. 1. Дозовая (а) и временная (б) зависимости эффективности треморного действия ареколина при внутрибрюшинном введении крысам фенозана (●) и K^+ -фенозана (○). а—время измерения—30 мин после введения антиоксидантов подопытным животным. б—дозы вводимых антиоксидантов: 10 мкг/кг (1) и 100 мкг/кг (2)

занная нижняя граница эффективных доз приблизительно соответствует наномолярным концентрациям данных препаратов в организме крысы при условии их равномерного распределения по органам. Различные дозы антиоксидантов в одно и то же время после введения вызывают неодинаковые по направленности изменения в активности м-холинергической системы крыс. Через 30 мин после внутрибрюшинного введения животным фенозан и K^+ -фенозан в концентрационном диапазоне от 1 мкг до 10 мг/кг веса вызвали снижение чувствительности нейромедиаторной системы, в то время как дозы фенольных антиоксидантов выше 10 мг/кг ее повышали (рис. 1, а). Временная зависимость эффективности действия ареколина на активность м-холинергической системы ЦНС крыс (рис. 1, б) при внутрибрюшинном введении животным препарата в дозе 100 мкг/кг веса имеет сложную форму: первоначально наблюдается умень-

шение чувствительности ЦНС к действию ареколина, что особенно выражено через 30 мин действия антиоксидантов, а затем она возрастает, превышая контрольные значения. При введении крысам фенозана и К⁺-фенозана в дозе 10 мкг на кг веса тела ко второму часу наблюдается исчезновение эффекта, что, скорее всего, связано с выведением к этому времени малых доз препарата из организма. В то же время, более высокая доза антиоксидантов и по прошествии 2-х ч после введения продолжает оказывать влияние на активность м-холинергической системы: ЦНС крыс (рис. 1. б).

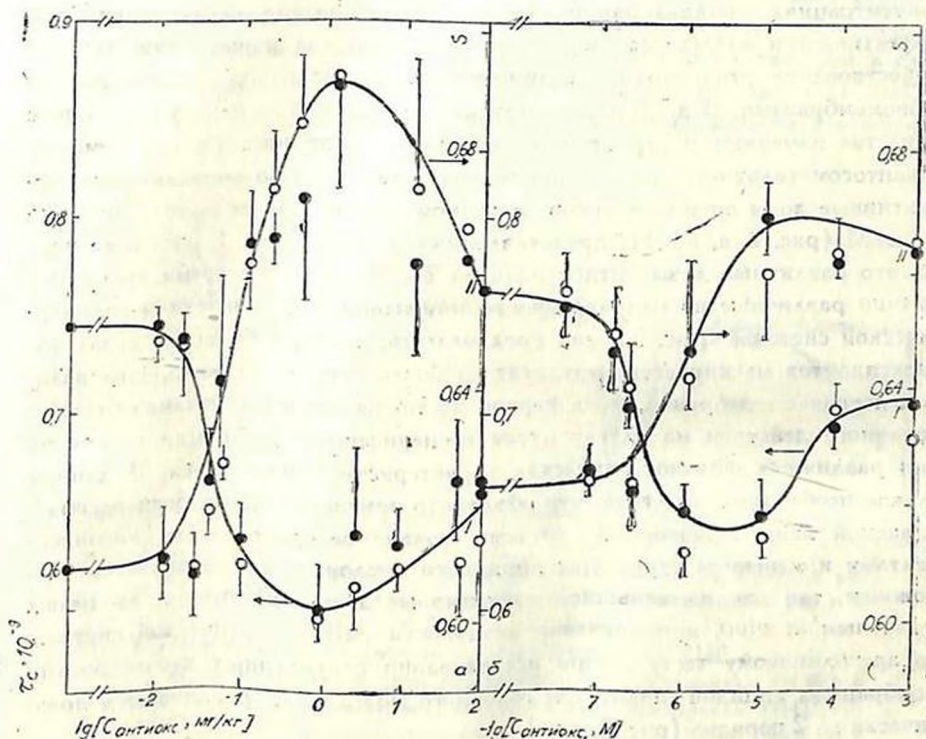


Рис. 2. Дозовые зависимости времени вращательной корреляции τ_c (I; спин-зонд 15С) и параметра упорядоченности липидной фазы S (II, спин-зонд 5-доксилстеарат) синапсом головного мозга крыс при действии фенозана (●) и К⁺-фенозана (○) *in vivo* (а) и *in vitro* (б), $t_{измер.}$ 25°. а—через 30 мин после внутрибрюшинного введения антиоксидантов, б—время инкубации суспенсиции синапсом с антиоксидантами—30 мин при 25°

Анализ структурного состояния липидной фазы синапсом головного мозга крыс через 30 мин после действия *in vivo* антиоксидантов показал, что действие препаратов в дозах от 50 мкг до 100 мг на кг веса подопытных животных вызывало достоверное, по отношению к контролю, уменьшение микровязкости липидного бислоя (рис. 2, а). Упорядоченность липидной фазы мембран синапсом, анализируемая с помощью

5-доксилстеарата, превышала контрольные значения в диапазоне исследованных концентраций фенозана и K^+ -фенозана от 50 мкг до 100 мкг/кг веса животных, с максимумом в области дозы 1 мкг/кг (рис. 2, а). На рис. 2, б можно видеть аналогичный, в целом, ход кривых, описывающих зависимость структурных параметров липидного бислоя синапсом от концентрации примененных антиоксидантов при инкубации *in vitro* в течение 30 мин.

Из всего вышесказанного можно сделать вывод, что фенолсодержащие синтетические антиоксиданты могут оказывать *in vivo* эффективное влияние на активность м-холинергической системы ЦНС в крайне низких концентрациях, порядка наномолярных. На наш взгляд, наличие подобной эффективности малых доз синтетического вещества может указывать на существование рецепторного взаимодействия фенольных антиоксидантов с биомембранами. В достаточно низких дозах *in vivo* и *in vitro* данные вещества изменяют и структурное состояние липидного бислоя мембран синапсом головного мозга подопытных животных, но минимальные эффективные дозы антиоксидантов в данном случае равны приблизительно 0,2 мкМ (рис. 2, а, б). Из представленных данных (рис. 1, а) также видно, что различные дозы антиоксидантов в одно и то же время вызывают *in vivo* различные по направленности изменения в активности м-холинергической системы крыс. Можно предполагать, что при больших дозах антиоксидантов маскируется результат их более тонкого рецепторного взаимодействия с мембраной, и на первое место выдвигается механизм массивного действия на клетку путем неспецифической сорбции и изменения различных физико-химических характеристик биомембран. В данном случае необходимо отметить, что объяснить изменение активности рассматриваемой нейромедиаторной системы только опосредованным антиоксидантами изменением структуры липидного бислоя не представляется возможным, так как наименьшие эффективные дозы препаратов, вводимых животным *in vivo*, при изучении активности м-холинергической системы по ареколиновому тесту и при исследовании структурных характеристик мембранных липидов синапсом головного мозга крыс, различаются практически на 2 порядка (рис. 1, а и 2, а).

В последние годы появились работы, в которых показана роль фосфолипидов и, в частности, продуктов их перекисидации в связывании специфических лигандов с рецепторами в ЦНС [10]. При инкубации *in vitro* в течение 1 ч при 37° суспензии синапсом мы наблюдали индукцию образования первичных продуктов ПОЛ, причем накопление конъюгированных дисновых структур ингибировалось внесением в среду инкубации фенольных антиоксидантов в концентрациях, превышающих 10 мкМ (рис. 3). Исходя из сказанного, можно было бы ожидать эффективного действия в этих дозах ингибиторов ПОЛ на процесс специфического комплексобразования лигандов с м-холинорецепторами; однако такого влияния обнаружено не было. Ни фенозан, ни K^+ -фенозан не влияли *in vitro* на специфическое связывание [3H]ХНБ с м-холинорецепторами синапсом головного мозга крыс в дозах ниже 1 мМ; при весьма значительных концентра-

циях антиоксидантов (выше 1 мМ) указанное связывание ингибировалось (рис. 4). Ранее нами было обнаружено, что при солюбилизации опионидных рецепторов головного мозга крыс дигитонином увеличивалась эффективность влияния синтетического фенольного антиоксиданта на процесс комплексообразования специфического лиганда [^3H]налоксона с этими рецепторами, что мы объясняли увеличением доступности гидрофобной, мембраносвязанной части опионидного рецептора для гидрофильного эффекторного вещества [11]. В случае м-холинорецепторов головного мозга крыс, при их солюбилизации дигитонином, не было обнаружено достоверного увеличения эффективности действия фенозана и K^+ -фенозана на процесс комплексообразования с ними [^3H]ХНБ при сравнении с таковым в случае мембраносвязанных рецепторов. На основании этого нами был сделан вывод, что фенолсодержащие водорастворимые антиоксиданты в концент-

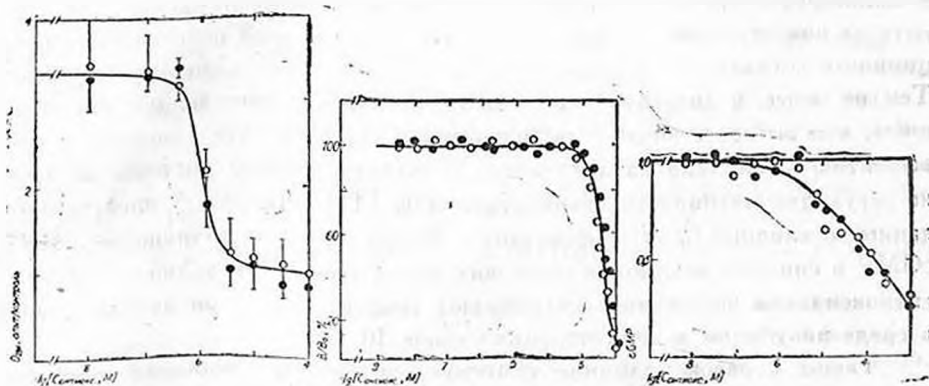


Рис. 3. Изменение содержания конъюгированных диенов по фракции синапсом головного мозга крыс при действии *in vitro* фенозана (●) и K^+ -фенозана (○). Инкубация 15 мин при 37°

Рис. 4. Ингибирование специфического связывания [^3H]ХНБ с фракцией синапсом головного мозга крыс при действии *in vitro* фенозана (●) и K^+ -фенозана (○). B_0 —величина специфического связывания [^3H]ХНБ (расп/мин). В—величина специфического связывания [^3H]ХНБ (расп/мин) в присутствии различных концентраций антиоксидантов.

Рис. 5. Влияние фенозана (●) и K^+ -фенозана (○) на активность синтеза сGMP (пмоль/мг белка·мин, опыт/контроль) во фракции синапсом головного мозга крыс *in vitro*. Время инкубации 60 мин при 37°

рациях ниже 1 мМ практически не оказывают влияния на проведение сигнала в м-холинэргической системе на уровне комплексообразования специфического лиганда (в данном случае [^3H]ХНБ) с рецепторными центрами связывания. Следует сделать допущение, что отсутствующие в данном случае эффекты антиоксидантов могут быть обнаружены при комплексообразовании с м-холинорецепторами специфических лигандов другого, чем ХНБ, химического строения.

Рассматривая трансмембранный перенос сигнала в м-холинэргической системе, необходимо сказать о вторичном мессенджере данной рецепторной системы—сGMP и ферменте, регулирующим его уровень в клетке—

гуанилатциклазе. До недавнего времени существовало общепринятое представление о непосредственной активации гуанилатциклазы путем рецепторного комплексообразования специфических лигандов с м-холинорецептором. К настоящему моменту появились многочисленные данные о том, что влияние мускариновых агонистов на активность гуанилатциклазы носит весьма сложный, опосредованный характер. Вероятными механизмами активации гуанилатциклазы через м-холинорецепторы является вход в клетки Ca^{2+} и накопление перекисных продуктов, а также механизм, связанный с функционированием клеточных липоксигеназ [12, 13]. Еще более усложняет вопрос о путях регуляции гуанилатциклазы тот факт, что через м-холинергическую рецепторную систему осуществляется взаимодействие с другими клеточными рецепторами, связанными с активацией аденилатциклазы [14] и обменом фосфоинозитидов [15]. Такая сложная система регуляции активности гуанилатциклазы, связанной с активацией м-холинорецепторов, как правило, не дает возможности однозначно ответить на вопрос о том, на какое звено трансмембранной передачи информационного сигнала от рецептора к ферменту действует вещество-эффектор? Тем не менее, в литературе существуют данные, позволяющие предположить, что антиоксиданты, как ингибиторы ПОЛ, могут оказывать свое эффективное влияние на активность м-холинергической системы на уровне регуляции активности гуанилатциклазы [13]. На рис. 5 представлены данные о влиянии *in vitro* фенозана и K^+ -фенозана на активность синтеза cGMP в синапсоммах коры головного мозга крыс. Как видно из рисунка, антиоксиданты эффективно ингибируют синтез cGMP при их содержании в среде инкубации в концентрациях выше 10 мкМ.

Таким образом, влияние синтетических водорастворимых антиоксидантов из класса экранированных фенолов *in vitro* на передачу сигнала в м-холинергической системе головного мозга крыс менее чем в миллимолярных концентрациях реализуется не на уровне регуляции комплексообразования специфических лигандов с рецептором, а, скорее всего, на уровне трансмембранного переноса сигнала (например, на уровне регуляции синтеза вторичного мессенджера—cGMP). Такая регуляция опосредована, видимо, изменением структуры липидного бислоя мембран при неспецифическом взаимодействии антиоксидантов с клетками. При этом следует отметить, что эффективное действие антиоксидантов в наномолярных концентрациях на активность нейромедиаторных систем может быть объяснено возможным специфическим взаимодействием этих веществ с плазматическими мембранами нервных клеток.

THE EFFECT OF SYNTHETIC WATER-SOLUBLE PHENOL ANTIOXIDANTS ON THE m-CHOLINERGIC RECEPTOR SYSTEM OF THE RAT

KHOKHLOV A. P.

Institute of Urology, Moscow

We studied *in vivo* and *in vitro* effects of low doses of synthetic water-soluble antioxidant: gamma-(4-oxi-3,5-ditretbutylphenol) propionate

(phenozan) and its potassium salt on the activity of M-cholinergic system of rat CNS. These compounds in micromolar concentrations act at the level of signal transduction across the plasma membrane rather than at the level of ligand-receptor complex formation. The effect of the antioxidants, which inhibit free-radical reactions, is due to the alteration of physico-chemical properties of membrane lipids. *In vivo* the antioxidants in nanomolar concentrations effectively modified the activity of M-cholinergic system of the rat CNS (assayed with arecoline). The action mechanism of the phenol antioxidant drugs is associated with their specific binding to cell plasma membranes.

ЛИТЕРАТУРА

1. Burlakova E. B., Arkhipova G. V., Djalyabova M. I., Molotchkina E. M., Khokhlov A. P.—In: Biophysical and Biochemical Information Transfer in Recognition, p. 583—594, N. Y., Plenum Press, 1979.
2. Бурлакова Е. Б., Хохлов А. П. Биол. мембраны, т. 1, № 2, с. 117—122, 1984.
3. Hajos F. Brain Res., v. 93, № 3, p. 485—489, 1975.
4. Jones D., Matus A. Biochim. et biophys. acta v. 356, № 1, p. 276—287, 1974.
5. Howells R. D., Giannini T. L., Hiller J. M., Simon E. J. J. Pharm. and Exper. Therap., v. 222, № 3, p. 629—634, 1982.
6. Simon E. J., Hiller J. M., Edelman I. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci., v. 70, p. 1947—1949, 1973.
7. Кольцов В. К. Итоги науки и техн. ВИНТИ, Биофизика, № 11, с. 10—100, 1979.
8. Аничков С. В. Избирательное действие медиаторных средств. Л., Медицина, 1974.
9. Steiner A. L., Wehmann R. E., Parker C. W., Kipnis D. M.—In: Advances in cyclic nucleotide research (eds. P. Greengard, G. A. Robison), v. 2, p. 51—61, N. Y. Raven Press, 1972.
10. Abe K., Kogure K., Arai H., Nakano M. Biochem. Int., v. 11, № 3, p. 341—348, 1985.
11. Хохлов А. П., Ярыгин К. Н., Юрченко Н. Н. Биол. мембраны, т. 3, № 3, с. 261—265, 1986.
12. Lad P. M., Glowsky M. M., Richards J. H., Smiley P. A., Backstrom B. Mol. Immunol., v. 22, № 7, p. 731—739, 1985.
13. Snider R. M., Mc Kinney M., Forray C., Richelson E. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci., v. 81, № 12, p. 3905—3909, 1984.
14. Smith M., Harden T. K. J. Cycl. Nucleotide and Protein Phosphorylat. Res., v. 10, № 2, p. 197—210, 1985.
15. Brown E., Kendall D. A., Nahorski S. R. J. Neurochem., v. 42, № 5, p. 1379—1387, 1984.

Поступила 18. III 1988



УДК 616.89—008.441.13.—02.615.37:577.112.34—07.

ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ НЕЙРОТРАНСМИТТЕРНЫХ АМИНОКИСЛОТ В МОЗГУ КРЫС С РАЗЛИЧНО ВЫРАЖЕННОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ МОТИВАЦИЕЙ

ОСТРОВСКИЙ С. Ю., *КИИНМАН К.

Институт биохимии АН БССР, г. Гродно

*Исследовательские лаборатории фирмы «Алко», Хельсинки, Финляндия

Определено содержание и взаимоотношения нейротрансмиттерных аминокислот в полушариях, мозжечке и стволе мозга генетических линий крыс, предпочитающих (AA) или отвергающих (ANA) растворы этанола при добровольном выборе. Обе линии различаются, главным образом, не по содержанию в мозгу аминокислот, а в основном по особенностям их взаимоотношений и, возможно, собственного метаболизма.

В патогенезе алкоголизма ЦНС отводится решающая роль, в связи с чем весьма детально исследуются различные функциональные особенности мозга и его отделов. Интенсивно изучаются процессы, контролируемые катехоламинами, АХ, серотонином, ГАМК и различными нейротропными пептидами [1, 2]. Меньше внимания до настоящего времени уделялось самим аминокислотам. Последние выступают не только как предшественники большинства нейромедиаторов, но также, как их производные, являются активными участниками почти всех процессов контролирующих функции нервных клеток. Наряду с известными тормозными (Тау, Гли, ГАМК), возбуждающими (Асп, Глу) нейроны аминокислотами [3], аналогичные или модуляторные функции приписываются сейчас фосфоэтаноламину (ФЭА), этаноламину (ЭА) и серусодержащим аминокислотам [4, 6]. В настоящем сообщении мы уделили внимание, главным образом, двум первым группам аминокислот.

Материалы и методы

Анализировали содержание свободных аминокислот правого и левого полушарий, мозжечка и ствола мозга генетических линий крыс, предпочитающих растворы этанола воде (AA) или потребляющих только воду (ANA) в условиях свободного выбора [7]. Животных вывели и содержали в виварии исследовательских лабораторий фирмы «Алко» (Хельсинки, Финляндия) на стандартном рационе питания. После декапитации мозг немедленно извлекали, разделяли на отделы, которые сразу же замора-

живали в жидком азоте. Гомогенаты готовили на 3%-ной сульфосалициловой кислоте и анализировали [8] на автоматическом анализаторе аминокислот Т-339 (ЧССР). Полученные данные обсчитывали на ЭВМ «Мегасатак 125/S M4A» (ПНР) по программам для установления достоверности различий и определения коэффициентов корреляции [9].

Результаты и обсуждение

Отделы мозга сравниваемых линий крыс не различались существенно (табл. 1) по содержанию основных нейротрансмиттерных аминокислот, хотя некоторое (на уровне выраженных тенденций) повышение уровня Тау, Гли и Асп в полушариях мозга отвергающих этанол крыс выявлялось. У той же разновидности животных значительно заметнее разброс данных между отделами по содержанию ГАМК, Гли и Глу. В

Таблица 1

Содержание нейротрансмиттерных аминокислот в отделах мозга АА (n=8) и АНА крыс (n=8), нмоль/г.

Отделы мозга	Тау	ГАМК	Гли	Асп	Глу
АА крысы					
Правое полушарие	4341±731	654±92	343±51	1223±208	6515±1474
Левое полушарие	5855±742	903±79	434±35	1189±210	6027±932
Мозжечок	4877±796	597±46	1024±127	1310±127	5026±1315
Стол	6704±1816	704±112	1187±507	1372±334	4655±908
АНА крысы					
Правое полушарие	7610±1432*	868±125	417±49	1457±207	6628±1042
Левое полушарие	7731±1344	944±183	570±74*	1946±360*	6505±1095
Мозжечок	4417±1358	474±61	1466±250	1112±221	2587±515
Стол	5393±1519	655±106	533±111	1417±312	3828±826
		2,3—p<0,001	5,7—p<0,001		5,7—p<0,001
		5,7—p<0,01	6,7—p<0,001		6,7—p<0,05
		7,8—p<0,05	7,8—p<0,01		

Примечание. *0,05<p<0,1 при сравнении АА и АНА.

обоих случаях, рассмотренных выше, различия одновременно регистрировали для пары тормозных и одной из возбуждающих аминокислот. Представляло интерес оценить функциональное состояние отделов мозга по соотношению соответствующих суммарных показателей (табл. 2) и только в этом случае содержание тормозных аминокислот в правом полушарии и менее заметно возбуждающих аминокислот в мозжечке было неодинаковым у АА и АНА крыс. Основной интегральный критерий (соотношение двух групп нейротрансмиттеров) оказался повышенным только в мозжечке АНА животных. Полученные данные хорошо согласуются с уже известной вариабельностью аминокислотного состава отделов мозга [10] при различных воздействиях на ЦНС и в целом, по показателям для правого полушария и мозжечка, позволяют говорить о некотором преобладании тормозных процессов в мозгу АНА крыс по сравнению с АА. Эти результаты соответствуют также показанной неоднократно более высокой

чувствительности предпочитающих воду животных [11] к наркотическому действию этанола, регистрируемому по продолжительности сна.

Интересная информация о том, как формируются взаимоотношения между различными по функциям нейротрансмиттерными аминокислотами может быть получена при рассмотрении соответствующих корреляционных взаимоотношений (табл. 3). По-видимому, при таком подходе уместно говорить о некоторых общих закономерностях и об особенностях, отличающих одну линию животных от другой.

Обращает на себя внимание чёткая положительная взаимозависимость уровня Глу, Гли и ГАМК практически во всех отделах мозга обеих линий животных. Механизмы, обеспечивающие выявленную закономерность, по-видимому, имеют двойную природу. Так, уже показано, что пулы Глу и Гли тесно взаимосвязаны метаболически [12]. Уровень ГАМК, как известно [1], обеспечивается декарбоксилированием Глу и здесь логичнее было ожидать отрицательной корреляции показателей. По-видимому, в формирование выявленной положительной ($p < 0.05-0.001$) взаимосвязи уровней обеих аминокислот решающий вклад вносят антагонистические функции обоих соединений [3], приводящие к их синхронному (уравновешивающему) освобождению из связывающих нейротрансмиттеры депо. К достаточно общей закономерности можно отнести и резкое (6-кратное) преобладание во всех отделах мозга АА и АНА крыс положительных корреляционных коэффициентов над отрицательными. Простое объяснение этому можно видеть в допущении, что в мозгу балансируются уровни отдельных нейротрансмиттерных аминокислот не выведением или разрушением отдельных из них, а более просто—дополнительным выбросом из мест связывания. Самые яркие примеры такого функционального уравновешивания одного нейротрансмиттера другим видны, помимо уже упомянутых выше аминокислот, в парах Глу-Тау, Асп-Гли для всех отделов мозга или в паре Глу-Гли для полушарий и мозжечка.

Значительно более сложен анализ взаимоотношений друг с другом функционально однотипных аминокислот. Так, известно, что Тау, являющийся тормозным нейротрансмиттером, подавляет эффекты каннтовой кислоты не только в отношении выброса Глу и Асп, но также ГАМК и Гли [13]. Самановая и каннтовая кислоты в дозах, вызывающих судороги у животных [14], повышают уровень Тау в межклеточных пространствах в 2—4 раза. В отсутствие судорог выброса Тау не наблюдается, что авторы склонны приписывать только противодействию Тау эпилептогенным аминокислотам (Асп, Глу). Противоречие состоит в том, что тот же Тау тормозит выброс другого тормозного медиатора ГАМК [15], способного снимать судорожные эффекты самых различных агентов. Возможно, Тау с ФЭА выполняют в ЦНС какие-то модуляторные функции и этим можно объяснить очень неоднотипные взаимосвязи уровней Тау и Гли в правом и левом полушариях или в мозжечке АА и АНА крыс, когда корреляционные показатели меняются от сильно положительных (0,87) до ничтожно малых (0,03) или даже отрицательных (—0,68). Уже отмеченные другими исследователями сопряженные сдвиги в уровнях Тау и ФЭА в гиппокампе [4] выявлены нами (табл. 3) с некоторыми особен-

Таблица 2

Интегрированные показатели, характеризующие нейротрансмиттерные
аминокислоты в мозгу АА и АНА крыс

Показатели	Правое полушарие		Левое полушарие		Мозжечок		Стол	
	АА	АНА	АА	АНА	АА	АНА	АА	АНА
ГАМК+Гли+Тау (мМ)	5.4 ± 0.7	$8.9 \pm 1.5^*$	7.2 ± 0.8	9.2 ± 1.5	6.5 ± 0.7	6.4 ± 1.6	8.6 ± 2.3	6.6 ± 1.6
Асп+Глу	7.7 ± 1.4	8.1 ± 1.2	7.2 ± 1.1	8.4 ± 1.3	6.3 ± 1.3	$3.7 \pm 0.7^{**}$	6.0 ± 1.1	5.2 ± 0.7
$\frac{\text{ГАМК+Гли+Тау}}{\text{Асп+Глу}}$	0.81 ± 0.13	1.15 ± 0.17	1.05 ± 0.09	1.11 ± 0.09	1.16 ± 0.13	$1.69 \pm 0.18^*$	1.38 ± 0.19	1.31 ± 0.27

Примечание. * $p < 0.05$; ** $0.05 < p < 0.1$.

Таблица 3

Корреляционные взаимоотношения (r) уровней нейротрансмиттерных
аминокислот и их производных в мозгу AA и ANA крыс

Сравнива- емые пока- затели	Правое полушарие		Левое полушарие		Мозжечок		Ствол	
	AA	ANA	AA	ANA	AA	ANA	AA	ANA
ГАМК-Гли	0,74*	0,85*	0,34	0,76*	-0,35	0,94*	0,60	0,38
ГАМК-Тау	0,77*	0,53	0,72*	0,86*	0,83*	0,94*	0,90*	0,63
ГАМК-Асп	0,44	0,22	0,43	0,83*	0,26	0,95*	0,87*	0,97*
ГАМК-Глу	0,68	0,66	0,55	0,87*	0,94*	0,96*	0,92*	0,38
ГАМК-Гли	0,76*	0,93*	0,46	0,95*	0,97*	0,94*	0,90*	0,97*
ГАМК-ЭА	-0,65	0,48	0,03	-0,38	0,39	-0,42	0,25	0,07
ГАМК-ФЭА	0,98*	0,90*	0,51	0,99*	0,36	0,60	0,73*	0,09
Глу-Гли	0,88*	0,80*	0,97*	0,96*	0,90*	0,99*	0,99*	0,64
Глу-Асп	0,89*	0,83*	0,89*	0,73*	0,22	1,00*	0,65	0,65
Глу-Гли	0,84*	0,65	0,94*	0,67	0,41	0,99*	0,27	0,27
Глу-Тау	0,44	0,42	0,94*	0,85*	0,70*	0,87*	0,73*	0,37
Глу-ФЭА	0,62	0,40	0,97*	0,87*	0,12	0,67	0,47	0,27
Глу-ЭА	-0,36	0,24	0,12	-0,69	0,63	-0,56	0,42	0,50
Асп-Гли	0,97*	0,83*	0,82*	0,46	0,65	0,99*	0,90*	0,27
Асп-Тау	0,57	0,50	0,75*	0,56	-0,11	0,86*	0,84*	0,67
Асп-ЭА	0,36	0,35	0,25	-0,35	0,24	-0,54	0,04	0,31
Асп-ФЭА	0,77*	0,79*	0,80*	0,79*	0,03	0,71*	0,90*	0,02
Гли-Тау	0,71*	0,03	0,87*	0,62	-0,68	0,85*	0,68	0,34
Гли-ЭА	-0,41	0,80*	0,15	-0,38	0,05	-0,45	-0,23	-0,19
Гли-ФЭА	0,77*	0,80*	0,96*	0,74*	0,26	0,75*	0,85*	0,38
Тау-ФЭА	0,76*	0,32	0,92*	0,85*	0,21	0,47	0,90*	0,75*
Тау-ЭА	-0,72*	-0,36	0,22	-0,58	-0,09	-0,52	0,10	0,53
ФЭА-ЭА	-0,51	0,56	-0,05	-0,33	0,00	-0,01	-0,07	0,66
Тре-Гли	0,90*	0,75*	0,79*	0,83*	0,21	0,78*	0,59	0,36

Примечание..* $p < 0,05 - 0,01$.

ностями у сравниваемых линий животных и в других отделах мозга. По-видимому, ФЭА является активным участником процессов, контролирующих межнейрональные взаимоотношения, и поэтому мы обратили особое внимание на связи других аминокислот с ФЭА и его самого с собственным предшественником ЭА. Связи ГАМК-Тау, Глу-Тау оказываются при таком сравнении несколько более выраженными, чем ГАМК-ФЭА, Глу-ФЭА. Не все повторяется по характеру взаимосвязей Тау и ФЭА с Асп и Гли. Сам уровень ФЭА практически не зависит от содержания в мозгу ЭА, что указывает на два важных обстоятельства: 1) этаноламинкиназа, синтезирующая ФЭА, не причастна к его функциям или, что может быть более осторожным утверждением, этот фермент не является лимитирующим звеном в рассматриваемых процессах [16]; 2) нейромодуляторные свойства ЭА не зависят от ФЭА [6]. Под сомнение можно поставить и сами нейромодуляторные свойства ЭА, поскольку из 40 рассчитанных для него коэффициентов корреляции с нейротрансмиттерными аминокислотами лишь в двух случаях получены достоверные значения, при этом противоположные по знаку для Тау и Гли (табл. 3). Перспективной для дальнейшего изучения возможностей активно влиять на уровень тормозной аминокислоты Гли представляется обнаруженная нами его тесная связь с Тре, особенно в полушариях мозга. Ранее такая связь была выявлена в отношении спинного мозга [17]. Преимущества использования Тре, а не самого Гли для указанной выше цели можно обосновать тем, что последний весьма активно включается в различные метаболические превращения [18], в том числе реакции с образованием аммиака, очень токсичного для мозга [1]. Гли выступает не только как тормозной агент [3, 19], но, возможно, и как регулятор активности ГАМК-ергических нейронов [20].

Выявляются некоторые особенности взаимоотношений определяемых нами соединений как показателей разной организации нейротрансмиттерных пулов в мозгу АА и АНА крыс. Наибольшее число несовпадения показателей для сравниваемых линий животных (табл. 3) обнаруживается в мозжечке. Только у АА крыс не выявляется связь в парах ГАМК-Гли, ГАМК-Асп, Глу-Асп, Глу-Гли, Асп-Гли, Асп-Тау, Гли-Тау, при этом большая часть (5 из 7) показателей указывает на несопряженность сдвигов содержания тормозящих и возбуждающих нейронов соединений. Сделанный ранее на основании других подходов (табл. 2) вывод, что АНА крысы отличаются от АА преобладанием в их мозгу, особенно в мозжечке, тормозных процессов находит, таким образом, еще одно подтверждение. Выявленная особенность функциональных взаимоотношений нейротрансмиттерных аминокислот именно в мозжечке особенно интересна, поскольку этот отдел мозга отличается избирательной чувствительностью к алкоголю [21].

В стволе моза, в отличие от мозжечка, наоборот, преобладают более тесные корреляционные взаимосвязи у АА линии (табл. 3). В полушариях мозга взаимоотношения ГАМК с ее функциональными антиподами (Асп, Глу) положительно коррелируют с достаточной достоверностью только у

ANA крыс. Напротив, в парах Глу-Гли, Гли-Тау таким образом выделяются только AA животные.

В заключение следует обратить внимание и на различное по полушариям распределение ряда показателей. Алкоголизм и предрасположенность к нему характеризуются как функциональной, так и морфологической [22, 23] асимметрией полушарий. Животные избранных нами линий неидентичны по выраженности алкогольной мотивации и рассматриваются [7, 24] как адекватная модель соответствующей патологии у людей. Несовпадающих параметров для обоих полушарий одной и той же линии крыс (табл. 3) достаточно много. Чаще различия касаются лишь достоверности соответствующих коэффициентов корреляции, что свидетельствует не о принципиальных (качественных) расхождениях, а лишь об относительной стабильности рассматриваемых взаимосвязей. Последние, как показано, не могут считаться одинаковыми у AA и ANA крыс.

Давая общую оценку полученным результатам, можно считать, что AA и ANA крысы различаются, главным образом, не по содержанию в мозгу нейротрансмиттерных аминокислот, а в основном по особенностям их взаимоотношений и, возможно, собственного метаболизма.

RELATIONSHIPS BETWEEN NEUROTRANSMITTER AMINO ACIDS IN THE BRAIN OF RATS WITH DIFFERENT ALCOHOL PREFERENCE

OSTROVSKII S. Yu., KIINMAA K.

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Byelorussian SSR, Grodno, and „Alco“ Research Laboratories, Helsinki, Finland

We determined the levels of neurotransmitter amino acids and their proportions in the hemispheres, cerebellum and brain stem of two rat strains: one preferring alcohol (AA) and the other avoiding ethyl alcohol containing solution (ANA) under the conditions of free choice. The two strains differ mainly in proportions of the amino acids and, perhaps, their metabolism rather than in their levels in the brain.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сытинский И. А. Биологические основы действия этанола на центральную нервную систему, М., 1980.
2. Этанол и обмен веществ (под ред. Ю. М. Островского), Минск, Наука и техника, 1982.
3. Bloom F. E. Amer. J. Physiol. v. 246, p. 184—194, 1984.
4. Lehman A., Hamberger A. J. Neurochem. v. 42, p. 1286—1290, 1984.
5. Do K. Q., Mattenberger M., Streit P., Caénod M. J. Neurochem. v. 46, p. 779—786, 1986.
6. Wolfensberger M., Felix D., Cuénod M. Neurosci. Lett. v. 32, p. 53—58, 1982.
7. Eriksson K.—In: Animal Models in Alcohol Research., p. 3—20, Acad. Press, N. Y.—L., 1980.
8. Бенсон Дж.—В кн.: Новые методы анализа аминокислот, пептидов и белков, с. 9—76, М., Мир, 1974.
9. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика, Минск, 1973.

10. Wood J. D., Kurylo E. J. *Neurochem.* v. 42, p. 420—425, 1984.
11. Fuller J. L.—In: *Animal Models in Alcohol Research*, p. 57—62, Acad. Press, N. Y.-L., 1980.
12. Yong A. M., Bradford H. F. *J. Neurochem.*, v. 47, p. 1399—1404, 1986.
13. Morán J., Domínguez L., Pasantes-Morales H. *J. Neurochem.*, v. 48, suppl., p. S102C., 1987.
14. Wade J., Samson F., Nelson S., Pazdernik T. J. *Neurochem.*, v. 49, p. 645—650, 1987.
15. Namina M., Okomoto K., Sakai Y. *J. Neurochem.*, v. 40, p. 1—9, 1983.
16. Kunishita T. *J. Neurochem.*, v. 48, p. 1—7, 1987.
17. Maher T., Wurtman R. *Lif. Sci.*, v. 26, p. 1283—1286, 1970.
18. Montis G., Beaumont K., Javoy-Agid F., Perry F. *J. Neurochem.* v. 38, p. 718—724, 1982.
19. Staatz-Benson C., Potasher S. J. *J. Neurochem.* v. 49, p. 128—137, 1987.
20. Wenthold R., Altschuler R., Huie D. *J. Neurochem.*, suppl., p. S63A, 1987.
21. Круликов Р. И., Майвелис М. Я. *Алкоголизм и потомство*, М., Медицина, 1987.
22. Tarter R., Van Thiel D. *Alcohol and the Brain. Chronic Effects*. Plenum Press, N. Y.—L., 1985.
23. Ishibashi M., Nakazawa Y., Yokoyama T., Takanaba M., Okomoto K. *Drug Alcoh. Depend.*, v. 19, p. 325—332, 1987.
24. Островский Ю. М., Садовник М. Н., Сатановская В. И. *Биологический компонент в генезе алкоголизма*, Минск, Наука и техника, 1986.

Поступила 14. IV. 1988



УДК 577.612.015

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА КАТЕХОЛАМИНОВ В МОЗГУ ЦЫПЛЯТ В ПРОЦЕССЕ ИМПРИНТИНГА

СОЛОМОНИЯ Р. О., МАЧАИДЗЕ Г. Г., СОБЧИНСКАЯ Н. М.,
МИКЕЛАДЗЕ Д. Г.

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

Методом хроматографии высокого давления с последующей электрохимической детекцией было изучено изменение уровней норадреналина (НА) и дофамина (ДА) в интермедиальной части медиального вентрального гиперстриатума (ИМВГ) цыплят в процессе импринтинга и освещения диффузным светом в течение первых 3,5 ч после начала эксперимента. Показано, что в обоих полушариях после первоначального уменьшения уровня ДА происходит его повышение, отличающееся у обученных и контрольных цыплят лишь определенным сдвигом во времени. Наблюдаемая функциональная асимметрия является эффектом первичного светового раздражения.

В отличие от ДА количество НА уменьшается во времени в течение всего эксперимента. Исключением является ИМВГ левого полушария обученных цыплят, где через 1 ч после импринтинга наблюдается повышение уровня НА. В остальных случаях изменение количества НА в экспериментальных и контрольных группах отличается по определенным сдвигам во времени. Предполагается, что отличающаяся динамика изменения количества НА в ИМВГ левого полушария экспериментальных цыплят является специфической для характеристики импринтинга.

Экспериментальный зрительный импринтинг у цыплят сопряжен с резким изменением целого ряда биохимических процессов, которые опосредованы, с одной стороны, записью энграммы памяти, а с другой — первичным световым раздражением [1, 2]. Консолидация следов памяти — импринтинга происходит в ИМВГ цыплят [3—5], в котором фиксируются биохимические изменения, индуцируемые первичным световым раздражением [1, 2].

Kety [6] и Crow, Arbutnot [7] первыми предположили о важном значении НА в процессах памяти и обучения. Особая роль принадлежит также НА в поддержании нормальной синаптической пластичности визуального кортекса цыплят [8]. Из четырех биогенных аминов с нейротрансмиттерными свойствами — НА, ДА, 5-гидрокситриптамин и гистамин, первые три присутствуют в ИМВГ цыплят [9]. Используя катехол-О-метилтрансферазный радиохимический метод [10, 11], Davies и соавт. [12] не обнаружили изменений в содержании НА и ДА в процессе импринтинга, хотя теми же авторами впоследствии с помощью нейротокси-а

DSP-4 была показана исключительная специфическая и важная роль НА для импринтинга [13]. В настоящей работе этот вопрос был пересмотрен с помощью метода ВЭЖХ с электрохимической детекцией катехоламинов.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на цыплятах породы белый леггорн. За день до вылупления яйца изолировали в отдельные коробки для устранения в сенситивном периоде через 20 ч после вылупления в аппарате Hess [4]. Импринт-объектом служил красный полиэтиленовый цилиндр, диаметром 9,6 см, высотой 14 см. Световой прибор вращался на манеже по кругу радиусом 60 см. Экспозиция импринт-объекта продолжалась 20—25 мин (за это время цыпленок пробегал ~20 м). Критерием импринтирования служила реакция следования за световым импринт-объектом. Контролем служили цыплята, которых за тот же период времени освещали диффузным светом. До и после импринтирования цыплят содержали в отдельных коробках, в темноте, изолированных от внешних раздражителей. После декапитации головной мозг цыплят помещали на алюминиевую пластину, охлажденную до температуры жидкого азота. Быструю экстирпацию медиальной части переднего мозга, состоящего в основном из ИМВГ, проводили согласно Davies и соавт. [12]. Фракции хранили в жидком азоте.

Объединенные образцы ИМВГ одной временной точки (14 образцов ~200 мг) гомогенизировали в 5 объемах буфера, содержащего 0,2 М HClO_4 , 0,15%-ный $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ и 0,05%-ный Na_2 -ЭДТА. В каждую пробу предварительно добавляли 20 мкл 10^{-6} М дигидроксibenзиламина (ДГБА) в качестве внутреннего стандарта. После центрифугирования pH супернатанта доводили до 8,8 с помощью 2 М трис и добавляли 10 мг активированного Al_2O_3 («Waters», США). Смесь встряхивали при 37° в течение 15 мин и центрифугировали. Осадок промывали 3 раза 0,2%-ным трис/ЭДТА, pH 8,1. Связанные соединения экстрагировались 100 мкл буфера: 0,4 М HClO_4 , 0,02% ЭДТА, 0,05% NaHSO_3 . Разделение катехоламинов и ДГБА проводили на жидкостном хроматографе высокого давления («Waters», США) на колонке с обращенной фазой Zorbax ODS с размерами частиц 5 мкм согласно методике Wagner и соавт [15]. Идентификацию соединений осуществляли с помощью электрохимического детектора ESA, Coulchem 5100 A (США), с углеродно-стеклянного электрода. Потенциал электрода составлял +0,7 В против Ag-AgCl электрода сравнения. Колонку уравнивали и элюцию проводили в буфере: 0,2М NaH_2PO_4 /метанол (соотношение 89:11 объем/объем), $2,5 \times 10^{-3}$ М н-гептансульфониловой кислоты и 10^{-4} М ЭДТА, pH 2,70 (pH доводили ортофосфорной кислотой). Скорость элюции равнялась 1 мл/мин. Объем введенного образца составлял 20 мкл. Было проведено 5 параллельных измерений для каждой пробы. Типичная картина разделения катехоламинов и ДГБА представлена на рис. 1.

Использование данной системы при дальнейшем хроматографировании осуществляет также четкое разделение кислых метаболитов ДА: 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты, 3-метокситирамина и гомованилиновой кислоты. Исходя из поставленной задачи хроматографию проводили только до 8-й мин (рис. 1). Автоматическую обработку хроматографических данных производили на интеграторе Chromatorac CR-2AX («Shimadzu», Япония). Количественную оценку катехоламинов прово-

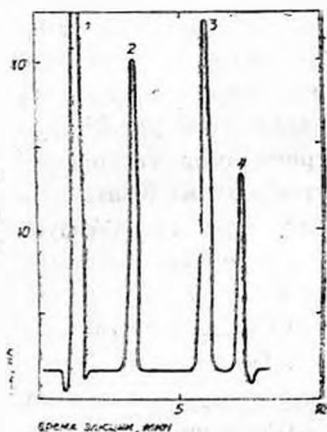


Рис. 1. Картина разделения катехоламинов и ДГБА с помощью хроматографии высокого давления с последующей электрохимической детекцией: 1—фронт растворителя, 2—2,05 мкг НА, 3—2,20 мкг ДГБА, 4—1,89 мкг ДА

дили согласно Ларскому и соавт. [16] следующим образом: рассчитывали отношение высоты пиков (альтернативно также площади пиков) катехоламинов мозга (относительно к внутреннему стандарту ДГБА) к высоте пиков или к площади пиков (также относительно к внутреннему стандарту) катехоламинов с известной концентрацией.

Пример расчета для НА:

$$\text{концентрация НА ИМВГ} = \frac{\text{НА/ДГБА ИМВГ}}{\text{НА/ДГБА стандартного раствора}} \times \text{НА}$$

Введение в формулу как высоты пиков, так и его площади давали практически одинаковые величины. Для статистической обработки использовали результаты, полученные обоими методами вычисления.

При исследовании временной зависимости уровня катехоламинов от импринтирования и освещения началом отсчета был момент предъявления цыплятам импринт-объекта (эксперимент) или начало освещения диффузным светом (контроль). Концом данного интервала времени считался момент декапитации. На каждой временной точке испытывали группу цыплят, состоявшую из 14 экспериментальных и 14 контрольных животных. Результаты обрабатывали статистически, достоверность различия и уровень значимости определяли по критерию распределения Стьюдента для малых выборок. Во всех специально не отмеченных случаях $p < 0,001$.

Результаты и обсуждение

Данные об изменении уровня НА в процессе импринтинга и освещения диффузным светом представлены на рис. 2, а—г. Обучение сопро-

воздавалось одновременным уменьшением количества НА, которое сильнее выражено в правом ИМВГ (рис. 2, б, в: $\sim 33\%$), чем в левом ИМВГ (рис. 2, а, в; 16% , $p < 0,02$). У контрольных цыплят вышеописанные изменения не наблюдались (рис. 2, г). Через 30 мин у импринтированных цыплят уровень НА не менялся, но в контрольной группе происходило его снижение (рис. 2, г), причем в правом ИМВГ этот процесс был выра-

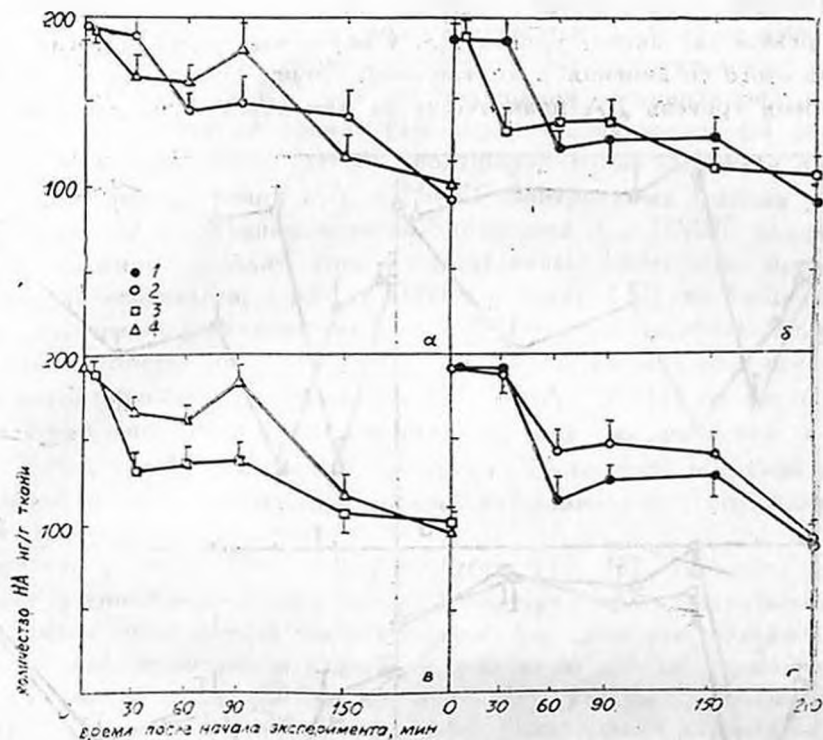


Рис. 2, а-г. Изменения количества НА и ИМВГ цыплят в зависимости от времени после начала эксперимента. Здесь и на рис. 3: 1—правое полушарие, контроль, 2—левое полушарие, контроль, 3—левое полушарие, эксперимент, 4—правое полушарие, эксперимент

жен сильнее (соответственно 45 и 27%). Интересным, на наш взгляд, являются изменения, происходящие через 90 мин после начала эксперимента. Уровни содержания НА в контрольных образцах и в образцах ИМВГ правого полушария обученных цыплят не отличались от своих предыдущих значений, а также друг от друга, но в то же время происходило некоторое повышение концентрации НА в ИМВГ левого полушария (по сравнению с предыдущим уровнем на 12,5%, $p < 0,01$), которое статистически достоверно превосходило этот показатель ($p < 0,001$) в остальных полушариях (рис. 2, а—г). Спустя 150 мин после начала эксперимента наблюдалось дальнейшее уменьшение уровня НА только у импринтированных цыплят. Через 3 ч после окончания обучения и освещения диффуз-

ным светом количество НА во всех четырех образцах было практически одинаково и составляло приблизительно половину от первоначального уровня.

Результаты изменений уровня ДА представлены на рис. 3. а—г. В отличие от НА они носят менее выраженный характер. Сразу же после окончания импринтинга количество ДА уменьшалось у экспериментальных животных, и в правом ИМВГ этот процесс был выражен более наглядно ($\sim 42\%$), чем в левом ($\sim 28\%$), рис. 3, а—в. Через 30 мин происходило резкое увеличение уровня ДА у обученных цыплят, тогда как количество этого соединения в контрольной группе снижалось. За последующее время уровень ДА практически не изменялся в экспериментальной

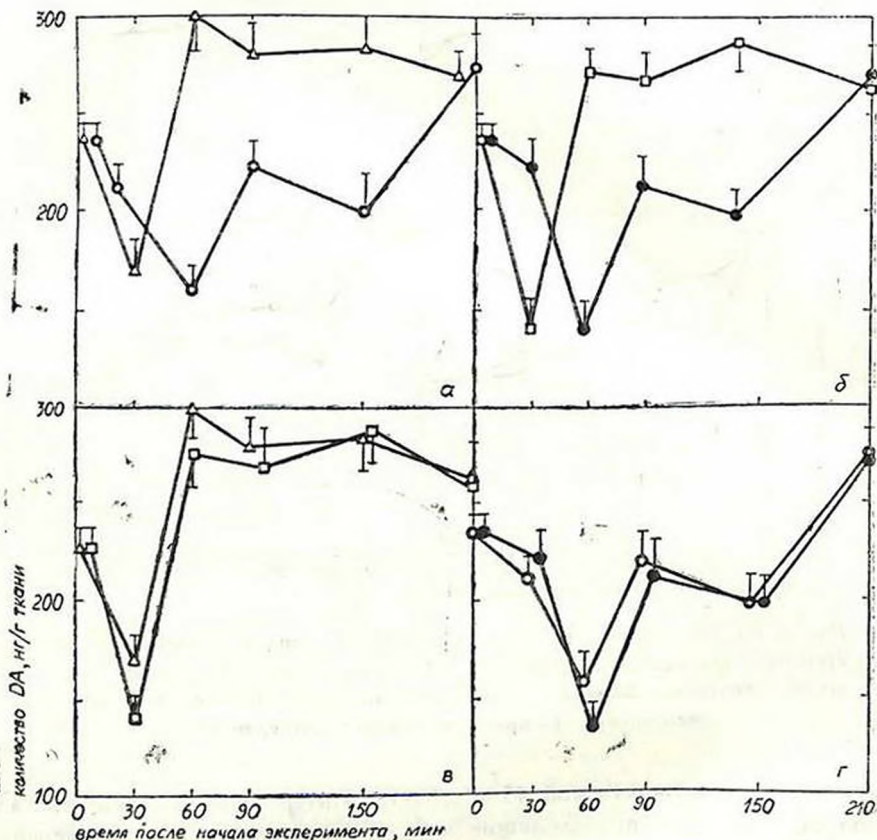


Рис. 3. а—г. Изменения количества ДА и ИМВГ цыплят в зависимости от времени после начала эксперимента. Обозначения те же, что и на рис. 2

группе, а у животных, освещенных диффузным светом, происходило постепенное его увеличение, так что через 210 мин после начала эксперимента уровень ДА в импринтированных и контрольных группах был практически одинаков и превосходил первоначальный на 20% (рис. 3, а—г).

Как видно из представленных данных, содержание катехоламинов претерпевало значительные изменения как в экспериментальных, так и в

контрольных группах цыплят. При этом характер изменений для НА и ДА различен. Общей тенденцией в случае НА является уменьшение его количества, тогда как для ДА после его первоначального уменьшения наблюдается увеличение содержания. В течение часа (временной интервал 60—120 мин после начала эксперимента) уровень НА в ИМВГ правого полушария экспериментальных цыплят остается постоянным. В отличие от него в ИМВГ левого полушария этот показатель остается постоянным только в течение 30 мин, а далее возрастает до первоначального уровня. За последующий период наблюдается постоянное уменьшение количества НА в ИМВГ обоих полушарий экспериментальных цыплят. Таким образом, для ИМВГ правого полушария импринтированных животных кривая изменений уровня НА имеет односторонний характер, в то время как для ИМВГ левого полушария четко выражена двухфазность. Флуктуация уровня НА в ИМВГ контрольных цыплят имеет в общем такую же тенденцию, которая характерна для ИМВГ правого полушария обученных цыплят, хотя с определенным сдвигом во времени.

Как уже отмечалось, в работе Davies и соавт. [12] не было найдено никаких изменений в количествах НА и ДА при импринтинге. Этот факт, по-видимому, можно объяснить тем, что используемый этими исследователями метод определения количества НА и ДА [10, 11] обладает малой разрешающей способностью и чувствительностью по сравнению с методом ВЭЖХ с электрохимической детекцией. Кроме того, в данной работе исследовали динамику изменений уровней катехоламинов с большими временными интервалами (5—6 ч).

Согласно работам Kasamatsu, Petigrew [17, 18], снижение уровня НА ведет к уничтожению нейрональной пластичности в визуальном кортексе. Однако впоследствии было показано, что даже при резком снижении уровня НА включаются защитные механизмы для поддержания пластичности нейронов, компенсирующие до 90% утраты количества НА [19, 20]. Было показано также, что деструкция только адренергической системы не является достаточной для снижения пластичности в визуальном кортексе [9]. Таким образом, можно предположить, что уменьшение уровня НА в импринтированных и в освещенных диффузным светом цыплятах не означает уменьшения пластичности в ИМВГ цыплят.

Потери некоторых нейрональных элементов являются характерным феноменом во время постнатального онтогенеза мозга, и этот процесс особенно сильно выражен в визуальном кортексе [21—23]. Согласно гипотезе Bateson [24], процесс импринтинга можно воспринимать как конкретизацию запечатлеваний на определенный импринтинг-объект среди потенциально возможных, многочисленных объектов, что также связывают с потерей некоторых нейрональных структур и усилением других. Исходя из этого, общую тенденцию уменьшения уровня НА в экспериментальных и контрольных группах цыплят можно объяснить потерей определенных норадренергических структур, сопряженных с непрерывным выделением этого трансммиттера в оставшихся адренергических образованиях. Известно, что в ИМВГ левого полушария экспериментальных цыплят происходит

консолидация следов памяти—импринтинга. В то время как ИМВГ правого полушария играет роль «временного буфера» хранения информации [9]. Именно картина изменения уровня НА ИМВГ левого полушария обученных цыплят отличается от ИМВГ правого полушария и от ИМВГ контрольных животных. Отличительная черта динамики изменений количества НА в ИМВГ левого полушария экспериментальных цыплят, по-видимому, является характерной для записи следов памяти—импринтинга.

В отличие от НА изменения уровня ДА в импринтированных и в освещенных диффузным светом цыплятах отличаются друг от друга определенным сдвигом во времени. В обеих группах цыплят наблюдается общее увеличение уровня ДА, указывающее на повышение функциональной активности дофаминергических образований. Этот факт находится в согласии с нашими данными об общем усилении синтеза синапсомных гликопротеинов в процессе импринтинга и освещения диффузным светом [1].

Как для НА, так и для ДА в обеих группах цыплят наблюдается более сильное реагирование ИМВГ правого полушария. Этот феномен наблюдается также для холинорецептора мускаринового типа и обусловлен, по-видимому, генетически детерминированным ответом на первичное световое раздражение [2].

Для дальнейшего изучения роли катехоламинергической системы в процессе импринтинга необходимо исследование чувствительности нейро-рецепторов НА и ДА.

CHANGED LEVELS OF CATECHOLAMINES IN THE LEFT AND RIGHT CEREBRAL HEMISPHERE OF CHICKEN DURING IMPRINTING

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

Beritashvili Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Georgian SSR, Tbilisi

We used HPLC with subsequent electrochemical detection to study levels of noradrenaline (NA) and dopamine (DA) in the intermediate part of medial ventral hyperstriatum (IMHV) of chicken during either imprinting or exposure to diffuse lighting lasting for the first 3.5 hours after the beginning of the experiment. The initial fall in DA level in both hemispheres was followed by an increase, which differed in imprinted vs. control chickens only by a certain shift in time. The observed functional asymmetry is due to primary light stimulation.

In contrast to DA, the amount of NA decreases with time throughout the experiment. The exception was found for the IMHV of the left hemisphere of the imprinted chickens where the level of NA increased 1 hour after the imprinting. In other cases changes of the NA level in experimental and control groups differed only in temporal cha-

racteristics. It is proposed that the characteristic time response of the NA level in IMHV of the left hemisphere of experimental chicken is specifically associated with imprinting.

ЛИТЕРАТУРА

1. Соломония Р. О., Микеладзе Д. Г. Нейрохимия, т. 5, № 2, с. 293—297, 1986.
2. Соломония Р. О., Собчинская Н. М., Микеладзе Д. Г. Нейрохимия, т. 6, № 2, с. 180—185, 1987.
3. Horn G., McCabe B. J. J. Physiol. (Gr. Brit.), v. 275, № 1, p. 2—3, 1978.
4. Kohsaka S., Takamatsu K., Aoki E., Tsukada Y. Brain Res., v. 172, № 3, p. 539—544, 1979.
5. McCabe B. J., Cipolla-Neto J., Horn G., Bateson P. P. G. Exp. Brain Res., v. 48, № 1, p. 13—21, 1982.
6. Kety S. S. „The biogenic amines in the central nervous system; Their possible roles in arousal, emotion and learning“ The Neuroscience; Second Study Program (ed. Schmidt F. O.), New-York. Rockefeller University Press, 1970.
7. Crow T. J., Arbuthnott G. W. Nature (New Biology), v. 238, p. 245—246, 1972.
8. Bear M. F., Singer W. Nature, v. 320, p. 172—176, 1986.
9. Horn G. Memory, imprinting and the brain, Oxford Psychology Series, № 10 (eds. D. E. Broadbent., J. L. McGaugh, J. N. Mackintosh, M. J. Posner, E. Tulving, L. Weiskrantz), Clarendon Press, Oxford 1985.
10. Coyle J. T., Henry D. J. Neurochem., v. 21, № 1, p. 61—67, 1973.
11. Cuello A. C., Hiley R., Iversen L. L. J. Neurochem., v. 21, № 5, p. 1337—1341, 1973.
12. Davies D. C., Horn G., McCabe B. J. Developm. Brain Res., v. 10, № 1, p. 251—255, 1983.
13. Davies D. C., Horn G., McCabe B. J. Behavioral Neuroscience, v. 99, № 4, p. 652—660, 1985.
14. Hess E. H. Science, v. 130, p. 133—141, 1959.
15. Wagner J., Vitali P., Palfreyman M. G., Zratka M., Hunt S. J. Neurochem., v. 38, № 6, p. 1241—1254, 1982.
16. Ларский Э. Г., Бархатова В. П., Демина Е. Г. Лаб. дело, т. 9, с. 519—522, 1985.
17. Kasamatsu T., Pettigrew J. D. Science, v. 194, p. 206—209, 1979.
18. Kasamatsu T., Pettigrew J. D. J. Comp. Neurol., v. 185, № 1, p. 139—162, 1979.
19. Bear F. M., Paradiso A. M., Schwartz M., Nelson S. B., Carnes K. M., Danniels J. D. Nature v. 302, p. 245—247, 1983.
20. Daw N. W., Videen T. O., Parkinson D., Rader R. K. J. Neurosci., v. 5, p. 1925—1933, 1985.
21. Boothe R. G., Greenough W. T., Lund J. S., Wrege K. J. Comp. Neurol., v. 186, p. 473—490, 1979.
22. Dardennes R., Jarreau P. H., Meininger V. Dev. Brain Res., v. 16, № 1, p. 159—164, 1984.
23. Cragg B. G. Exp. Neurol., v. 46, p. 445—451, 1975.
24. Bateson P. P. G. Animal. Behav., v. 27, p. 470—485, 1979.

Поступила 14. VI 1988



УДК 612.8.015:577.150.8:591.543.42

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ТРИПТОФАНГИДРОКСИЛАЗЫ В ГОЛОВНОМ МОЗГУ ПРИ ВПАДЕНИИ В ЗИМНЮЮ СПЯЧКУ И ПРИ ПРОБУЖДЕНИИ

ВОРОНОВА И. П., ПОПОВА Н. К.

Институт цитологии и генетики СО АН СССР, Новосибирск

Определена активность ключевого фермента синтеза серотонина—триптофангидроксилазы в гипоталамусе, гиппокампе, полосатом теле и среднем мозгу краснощеких сусликов *Citellus erythrogenus* в различные фазы цикла бодрствование-спячка. Обнаружено, что в различных отделах мозга активность фермента меняется не синхронно. В большинстве отделов она повышается при впадении в спячку и понижается при выходе из нее, причем повышение активности фермента предшествует впадению животных в зимнюю спячку. В среднем мозгу и гиппокампе более высокая, чем у бодрствующих, активность фермента у животных в состоянии спячки отмечена и при температуре инкубации 7°, близкой к реальной температуре тела находящегося в спячке животного. Это повышение, по-видимому, связано с увеличением количества фермента, поскольку величина V во время спячки повышалась, а K_m оставалась постоянной. Полученные данные свидетельствуют о функциональной активности серотониновой системы мозга при погружении в зимнюю спячку и подтверждают представление о существенной роли этой системы в механизмах последней.

Изучение нейрохимических механизмов зимней спячки важно не только для понимания этого уникального адаптивного состояния, но и для выявления регуляторных механизмов, функционирующих и у незимоспящих животных. Ранее в наших исследованиях было установлено, что при впадении в спячку происходит существенное увеличение в мозгу числа мест специфического рецепторного связывания серотонина 1 и 2 типов [1], а также количества серотонина, сочетающееся с понижением уровня его основного метаболита 5-гидроксининдолуксусной кислоты и активности МАО [2, 3]. Было предположено, что серотонин мозга участвует в изменении поведения и в развитии сноподобного состояния и что наступление зимней спячки связано с усилением серотонинергических влияний [2, 4]. Однако вопрос о функциональном состоянии серотониновой системы мозга при впадении в спячку и в спячке оставался открытым, так как повышение количества серотонина в мозгу могло быть пассивным следствием понижения активности МАО.

Показателем функционального состояния серотониновой системы мозга может служить активность триптофангидроксилазы (ТПГазы)—триптофан-5-монооксигеназа: 1-триптофан, тетрагидроптеридин: кислород-оксиредуктаза (5-гидроксилирующая) (КФ 1.14.16.4) [5], фермента, ограничивающего скорость синтеза серотонина [6]. Имеются данные о повышении активности ТПГазы в стволе мозга у находящихся в спячке хомяков [7] и сурков [8]. Наиболее информативным нам представляется изучение переходных состояний от бодрствования к спячке и от спячки к бодрствованию, когда происходят наиболее значительные изменения в регуляторных механизмах.

Целью настоящего исследования было изучение активности ТПГазы в различных отделах мозга при впадении в зимнюю спячку и при пробуждении от нее типичных зимоспящих—краснощеких сусликов.

Материалы и методы

Исследование проводили на самцах и самках краснощеких сусликов (*Citellus erythrogenys*, Brandt) массой 200—350 г. Животных отлавливали в Новосибирской области и содержали в индивидуальных клетках на открытом воздухе. С наступлением холодов и впадением животных в состояние зимней спячки клетки переносили в специальное помещение, где поддерживали постоянную температуру 3—4°. Пробуждение животных вызывали, перенося их в помещение с температурой 22—25°.

Опыты проводили на бодрствующих животных в июне-июле, на готовых к залеганию в спячку (сентябрь), но еще активных нормотермных (температура тела не ниже 36°) животных, на впадающих в зимнюю спячку (сентябрь) при температуре тела 34—35° и 12°, на животных в состоянии зимней спячки (температура тела 2—4°) и на пробуждающихся животных при температуре тела 22 и 35°. Температуру тела измеряли в ободочной кишке с помощью электротермометра с чувствительностью 0.2°.

Животных декапитировали, быстро на холоде извлекали мозг и выделяли: гипоталамус, гиппокамп, полосатое тело и средний мозг. Отделы мозга помещали в жидкий азот, в котором хранили до момента определения. Активность ТПГазы в отделах мозга определяли флуорометрическим методом [9], основанным на определении количества серотонина, образующегося в результате гидроксилирования триптофана ТПГазой и последующего декарбоксилирования полученного 5-окситриптофана декарбоксилазой из почки свиньи. В качестве кофактора для ТПГазы использовали диметилтетрагидроптеридин («Calbiochem», Швейцария). При определении кинетических характеристик фермента (V и K_m) 1-триптофан добавляли в пробу в диапазоне концентраций $0,1 \cdot 10^{-3}$ — $1,6 \cdot 10^{-3}$ М. Для остальных опытов использовали 1-триптофан в концентрации, близкой к насыщающей ($0,8 \cdot 10^{-3}$ М). Инкубацию проводили при 37° в отдельной серии экспериментов реакция гидроксилирования была поставлена при 7°—температуре, близкой к реальной температуре тела сусликов в состоянии зимней спячки. Активность фермента выражали в пмоль 5-окситриптофана/минн · мг белка.

Расчет кинетических характеристик фермента проводили по методу Иогансена-Ламри [10], а статистическую обработку результатов—с применением t-критерия Стьюдента [11].

Результаты исследований

Активность ТПГазы в большинстве исследуемых отделов мозга сусликов значительно изменялась в зависимости от фазы цикла бодрствование—спячка. Эти изменения были выражены по-разному в различных структурах мозга (рис. 1). Процесс впадения в спячку сопровождался

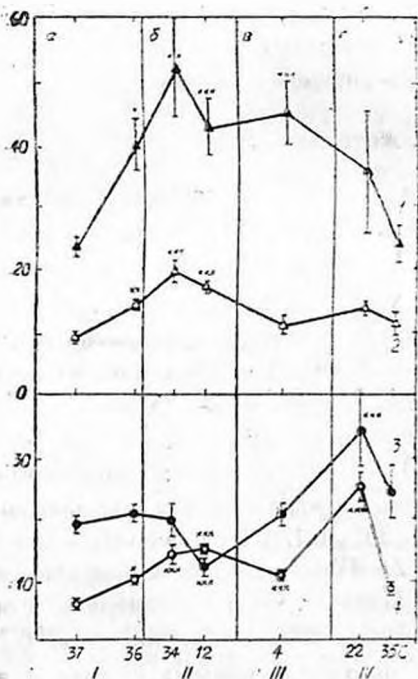


Рис. 1. Активность триптофангидроксилазы в разных отделах головного мозга сусликов в различные периоды цикла бодрствование—спячка. 1—средний мозг; 2—гиппокамп; 3—гипоталамус; 4—полосатое тело, а—активное бодрствование, б—впадение в спячку, в—спячка, г—пробуждение. По оси абсцисс—температура тела животных, по оси ординат—активность триптофангидроксилазы (нмоль/мин·мг), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ по сравнению с бодрствованием. В каждом опыте от 4 до 12 особей

повышением активности фермента в среднем мозгу, полосатом теле и гиппокампе. Важно подчеркнуть, что повышение активности ТПГазы в этих структурах наблюдали уже у сусликов, готовых к впадению в спячку, но находившихся еще в состоянии нормотермии; при дальнейшем впадении в спячку повышение усиливалось. В то же время впадение в спячку сопровождалось кратковременным (при понижении температуры тела до 12°) снижением активности ТПГазы в гипоталамусе. Во время зимней спячки в среднем мозгу и полосатом теле активность ТПГазы оставалась повышенной ($p < 0.001$), а в гиппокампе и гипоталамусе сохранялась на уровне бодрствующих животных.

Процесс пробуждения сопровождался постепенным снижением активности фермента в среднем мозгу до ее величины у бодрствующих животных. В полосатом теле наблюдали двукратное повышение активности фермента при достижении животными температуры тела 22° ($p < 0.001$) и последующее быстрое ее падение. Сходную, хотя и менее выраженную

картину наблюдали в гипоталамусе. В гиппокампе во время пробуждения существенных изменений обнаружено не было.

Определение активности фермента при температуре инкубации 7° (рис. 2) показало, что в среднем мозгу и в гиппокампе, в пробах, взятых у находящихся в спячке сусликов, она оказалась выше, чем в пробах, взятых у активных животных. В полосатом теле и гипоталамусе различий в активности ТПГазы у находившихся в спячке и у бодрствовавших животных не обнаружено.

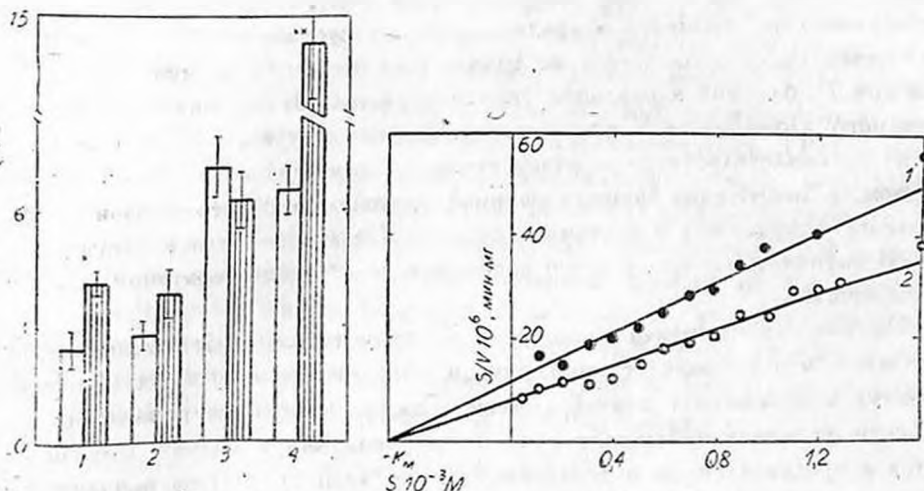


Рис. 2. Активность триптофангидроксилазы в отделах мозга бодрствовавших (светлые столбики) и находившихся в зимней спячке (заштрихованные столбики) сусликов при температуре инкубации 7° . 1—средний мозг, 2—полосатое тело, 3—гипоталамус, 4—гиппокамп. По оси ординат — активность триптофангидроксилазы (пмоль/мин·мг). * $p < 0,05$.

** $p < 0,001$. В каждом опыте по 6 особей

Рис. 3. Линейная анаморфаза графика Михаэлиса-Ментен для активности триптофангидроксилазы в среднем мозгу у бодрствовавших (1) и находившихся в зимней спячке (2) сусликов. $V_1 = 42,7 \pm 3,10$ пмоль/мин·мг; $V_2 = 60,8 \pm 2,78$ пмоль/мин·мг ($p < 0,001$); $K_{m1} = 0,52 \pm 0,07 \cdot 10^{-3}$ М; $K_{m2} = 0,49 \pm 0,04 \cdot 10^{-3}$ М ($p > 0,05$). По оси абсцисс — $S \cdot 10^{-3}$ М, по оси ординат — $S/V \cdot 10^6$ мг·мин

При определении кинетических характеристик фермента достоверных отличий в кажущейся K_m обнаружено не было, а величина V у животных, находившихся в спячке, значительно превышала таковую у бодрствовавших ($p < 0,001$) (рис. 3).

Обсуждение результатов

Обнаруженные изменения активности ТПГазы существенно дополняют ранее высказанное предположение о повышении функциональной активности серотонинергической системы головного мозга при впадении животных в зимнюю спячку [2, 3].

Повышение активности ТПГазы в среднем мозгу, где локализовано основное скопление перикарионов серотониновых нейронов, в гиппокампе

ALTERED ACTIVITY OF BRAIN TRYPTOPHAN HYDROXYLASE IN HIBERNATION AND AROUSAL

VORONOVA I. P., POPOVA N. K.

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

We measured the activity of tryptophan hydroxylase (TPH), a key enzyme of serotonin biosynthesis, in hypothalamus, hippocampus, striatum and midbrain of red-cheeked *ground squirrels* at different phases of the wakefulness—hibernation cycle. TPH activity in different brain regions changed in uncoordinated manner. In most regions TPH activity increased soon after the onset of hibernation and decreased in arousal. The rise in TPH activity preceded the onset of hibernation. TPH activity in the midbrain and hippocampus of hibernating animals was higher even we used the assay temperature of 7 °C, which is close to the body temperature of the hibernating animal. The higher TPH activity appears to be associated with the increased amount of the enzyme, since V_{max} increases during hibernation, whereas K_m remains unchanged. These data provide evidence for the persistence of the functional activity of brain serotonin system during the onset of hibernation and support concept about its important role in hibernation.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пак Д. Ф., Куликов А. В., Попова Н. К. Нейрохимия, т. 6, № 2, с. 186—192, 1987.
2. Попова Н. К., Науменко Е. В., Колпаков В. Г. Серотонин и поведение, с. 302, Новосибирск, Наука, 1978.
3. Popova N. K., Votenko N. N. Pharm. Biochem. and Behav., v. 14, p. 773—777, 1981.
4. Popova N. K., Kudryavtseva N. N. Biogenic Amines, v. 2, № 3, p. 203—210, 1985.
5. Boadle-Biber M. C., Johannessen G. N., Narasimhachari N., Tam-Huo Phan. Biochem. Pharmacol., v. 32, № 1, p. 185—188, 1983.
6. Lovenberg W., Jequier E., Sjoerdsma A. Science, v. 155, p. 217—219, 1967.
7. Duncan R. J. S., Tricklebank M. D. J. Neurochem., v. 31, p. 553—556, 1978.
8. Young R. A., Robinson D. S., Vagenakis A. G., Saavedra J. M., Lovenberg W., Krupp P. P., Danforth E. Comp. Biochem. and Physiol., v. 63 C, p. 319—323, 1979.
9. Куликов А. В. Вopr. мед. химии, т. 29, с. 135, 1982.
10. Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики, М., Мир, 1979.
11. Закс А. Статистическое оценивание, М., Статистика, 1976.
12. Штарк М. Б. Мозг зимнеявщих, Новосибирск, Наука, 1970.
13. South F., Heath J., Luecke R., Mihailovic L., Myers R., Panuska J., Williams R.—In: Hibernation and hypothermia, perspectives and challenges, p. 629—633, Amsterdam, 1972.
14. Кудрявцева Н. Н., Попова Н. К. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 78, № 4, с. 44—47, 1973.
15. Кудрявцева Н. Н. Об участии серотонина в механизмах зимней спячки. Канд. дис., Новосибирск, 1976.
16. Popova N. K., Lobacheva I. I., Karmanova I. G., Shilling N. V. Pharm. Biochem. and Behav., v. 20, p. 653—657, 1984.
17. Колпаков В. Г., Куликов А. В., Барыкина Н. Н., Алеkhina Т. А., Попова Н. К. Biogenic Amines, v. 2, № 2, p. 131—136, 1985.

Поступила 7. IV 1988

ALTERED ACTIVITY OF BRAIN TRYPTOPHAN HYDROXYLASE IN HIBERNATION AND AROUSAL

VORONOVA I. P., POPOVA N. K.

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

We measured the activity of tryptophan hydroxylase (TPH), a key enzyme of serotonin biosynthesis, in hypothalamus, hippocampus, striatum and midbrain of red-cheeked *ground squirrels* at different phases of the wakefulness—hibernation cycle. TPH activity in different brain regions changed in uncoordinated manner. In most regions TPH activity increased soon after the onset of hibernation and decreased in arousal. The rise in TPH activity preceded the onset of hibernation. TPH activity in the midbrain and hippocampus of hibernating animals was higher even we used the assay temperature of 7 °C, which is close to the body temperature of the hibernating animal. The higher TPH activity appears to be associated with the increased amount of the enzyme, since V_{max} increases during hibernation, whereas K_m remains unchanged. These data provide evidence for the persistence of the functional activity of brain serotonin system during the onset of hibernation and support concept about its important role in hibernation.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пак Д. Ф., Куликов А. В., Попова Н. К. Нейрохимия, т. 6, № 2, с. 186—192, 1987.
2. Попова Н. К., Науменко Е. В., Колпаков В. Г. Серотонин и поведение, с. 302. Новосибирск, Наука, 1978.
3. Popova N. K., Vottenko N. N. Pharm. Biochem. and Behav., v. 14, p. 773—777, 1981.
4. Popova N. K., Kudryavtseva N. N. Biogenic Amines, v. 2, № 3, p. 203—210, 1985.
5. Boadle-Biber M. C., Johannessen G. N., Narasimhachari N., Tam-Hao Phan. Biochem. Pharmacol., v. 32, № 1, p. 185—188, 1983.
6. Lovenberg W., Jequier E., Sjoerdsma A. Science, v. 155, p. 217—219, 1967.
7. Duncan R. J. S., Tricklebank M. D. J. Neurochem., v. 31, p. 553—556, 1978.
8. Young R. A., Robinson D. S., Vagenakis A. G., Saavedra J. M., Lovenberg W., Krupp P. P., Danforth E. Comp. Biochem. and Physiol., v. 63 C, p. 319—323, 1979.
9. Куликов А. В. Вopr. мед. химии, т. 29, с. 135, 1982.
10. Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики, М., Мир, 1979.
11. Закс Л. Статистическое оценивание, М., Статистика, 1976.
12. Штарк М. Б. Мозг зимнеявляющихся, Новосибирск, Наука, 1970.
13. South F., Heath J., Luecke R., Mihailovic L., Myers R., Panuska J., Williams R.—In: Hibernation and hypothermia, perspectives and challenges, p. 629—633, Amsterdam, 1972.
14. Кудрявцева Н. Н., Попова Н. К. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 78, № 4, с. 44—47, 1973.
15. Кудрявцева Н. Н. Об участии серотонина в механизмах зимней спячки, Канд. дис., Новосибирск, 1976.
16. Popova N. K., Lobacheva I. I., Karmanova I. G., Shilling N. V. Pharm. Biochem. and Behav., v. 20, p. 653—657, 1984.
17. Kolpakov V. G., Kulikov A. V., Barykina N. N., Alekhina T. A., Popova N. K. Biogenic Amines, v. 2, № 2, p. 131—136, 1985.

Поступила 7. IV 1988



УДК 577.352.5.612.822

СПЕЦИФИЧЕСКАЯ РЕЦЕПЦИЯ ДВУХСПИРАЛЬНОЙ РНК НА ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЕ КЛЕТОК КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫ

ЗАХАРЯН Р. А., БАКУНЦ К. А., СКОБЕЛЕВА Н. А.
Институт экспериментальной биологии АН АрмССР, Ереван

Показано, что двухспиральная РНК (дс-РНК) существенно повышает степень фосфорилирования белков плазматической мембраны клеток коры головного мозга. Полученный набор величин M_r фосфорилированных белков в целом близок к M_r белков мембранной фракции мозга по сАМР-зависимому фосфорилированию. Фактор связывания дс-РНК на поверхности нервных клеток, по-видимому, имеет белковую природу. Взаимодействие дс-РНК с плазматической мембраной нервной клетки высокоспецифично и по своим характеристикам аналогично взаимодействию лиганд-рецептор.

Известно, что дс-РНК являются индукторами интерферона, стимуляторами первичного и вторичного иммунного ответа [1, 2], модуляторами ряда биохимических реакций [3, 4].

Вместе с тем, возможные мембранные эффекты дс-РНК оставались вне поля зрения исследователей. Ранее на модели пейсмекерного нейрона RPa1 [5], на тромбоцитах кошек и человека [6] показано, что РНК, ДНК и в особенности дс-РНК являются активаторами мембранных функций клетки. В основе их действия лежат процессы, связанные с повышением в клетке уровня сАМР, активацией трансмембранных токов экстрацеллюлярного Ca^{2+} , активацией фосфолипазы A_2 , более выраженных при использовании ДНК, РНК и дс-РНК в форме Ca^{2+} -преципитата [7].

Одновременно нами было показано, что дс-РНК, сорбируясь на плазматической мембране нервной клетки, клеток печени, костного мозга, активно пересекает мембранный барьер и переходит внутрь клетки.

Имеющиеся результаты послужили основанием для изучения специфичности процесса взаимодействия дс-РНК с поверхностной мембраной и изолированной плазматической мембраной нервных клеток.

Материалы и методы

Для изучения взаимодействия дс-РНК с поверхностной мембраной целостной нервной клетки была использована реагированная в течение 4 суток суспензия клеток, полученная при диссоциации коры больших

полушарий мозга крыс трипсином [8]. Число клеток в суспензии подсчитывали гемоцитометром. В качестве дс-РНК использовали дрожжевую киллерную РНК с M_r $1,2-0,8 \times 10^6$ Д, любезно предоставленную проф. Ершовым Ф. И. (Институт вирусологии им. Д. Н. Ивановского АМН СССР). [3 H]дс-РНК с активностью $6,5 \times 10^3$ имп/мкг была получена в тритиевой воде с У. А. 5 Ки/мл. Фракции плазматических мембран из больших полушарий мозга крыс получали по методу Непп [9]. Взаимодействие [3 H]дс-РНК с клетками мозга в суспензии проводили при 4°.

В экспериментах использовали по 10^7 клеток, сорбцию дс-РНК на клетках проводили в сбалансированном солевом растворе Хенкса в присутствии 5 мМ Ca^{2+} . Энзиматическую обработку клеток в суспензии проводили при 37° 60 мин.

Фосфорилирование белков плазматической мембраны мозга и их электрофоретическое разделение в ПААГ проводили следующим образом: инкубационную смесь, содержащую 50 мМ трис-НСl, рН 7,5, 20 мМ MgCl_2 , 10 мМ [γP^{32}]АМР (0,1 мКи/имоль), 100 мкг белка инкубировали с дс-РНК и без нее в течение 30 и 60 мин соответственно, реакцию фосфорилирования останавливали добавлением (1:1) раствора: 0,05 М трис-НСl, рН 6,8; 10%-ный ДДС-Na; 0,1 М ЭДТА, 15%-ный глицерин, 5%-ный меркаптоэтанол и бромфеноловый синий, образцы (40 мкл) кипятили в течение 1 мин и использовали для электрофореза в 10%-ном ПААГ.

Дс-РНК-связывающие белки из плазматической мембраны клеток коры больших полушарий получали методом аффинной хроматографии на колонке дс-РНК, иммобилизованной на целлюлозе [10]. Солюбилизацию мембранных белков проводили в присутствии Тритона X-100, сорбцию белков на РНК-целлюлозе проводили в 0,01 М трис-НСl буфере, рН 7, 2, 50 мМ NaCl, сорбированные белки элюировали с колонок при 0,25 М, 0,5 и 1 М NaCl . Полученные образцы изучены в электрофорезе в 10%-ном ПААГ, в блочной модификации.

Взаимодействие [3 H]дс-РНК с плазматическими мембранами клеток мозга анализировали методом зональной седиментации комплекса в 10—45%-ном градиенте сахарозы при 100000 g, 2,5 ч, 4°. Полученные фракции отмывали в сбалансированном солевом растворе Хенкса, фильтры просчитывали в радиосчетчике «SL-30» (Intertechnique, Франция). Трипсин использовали в концентрации 500 мкг/мл, время инкубации 45 мин, 37°; ДОХ-Na—1%, время инкубации 1 ч, 37°.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлена автордиография электрофореграммы фосфорилированных белков плазматической мембраны клеток мозга в условиях *in vitro* в присутствии дс-РНК. Полученный набор величин M_r фосфорилированных белков в целом близок полученному ранее для белков мембранной фракции мозга по сАМР-зависимому фосфорилированию. Это белки с M_r : 86×10^3 , 80×10^3 , 68×10^3 , 48×10^3 , 45×10^3 , $35-40 \times 10^3$, $25-30 \times 10^3$, и 13×10^3 Д. Вместе с тем, дс-РНК существенно по-

вышает степень фосфорилирования указанных белков. При 30-минутной обработке дс-РНК в зоне величин $Mg\ 280-300 \times 10^3$ появляется новый фосфорилированный белок. Ранее нами было показано, что дс-РНК повышает уровень сАМР в нервных клетках [5].

Это дает основание утверждать, что взаимодействие дс-РНК с поверхностной мембраной клеток мозга индуцирует повышение уровня сАМР, соответственно активируются сАМР-зависимые протеинкиназы, тем самым обеспечивая регуляцию уровня фосфорилирования белков плазматической мембраны нервной клетки.

Чтобы определить, насколько специфично взаимодействие дс-РНК с плазматической мембраной нервных клеток, изучали процесс сорбции [3H]дс-РНК на нервных клетках в суспензии. Максимум специфического связывания дс-РНК наблюдается в течение 6—10 мин. На рис. 2 приведена кривая насыщения поверхности клеток головного мозга дс-РНК. Присутствие 20-кратного избытка рибонуклеотидов разрушенной ультразвуком до $Mg\ 1-5 \times 10^6 D$ «холодной» ДНК тимуса телят не оказывало влияния на связывание дс-РНК с мембраной нервных клеток.

Энзиматическая обработка клеток в диссоциированной суспензии головного мозга по-разному влияла на сорбцию дс-РНК клетками.

Таблица

Влияние энзиматической обработки на связывание дс-РНК клетками головного мозга

Обработка	Связывание дс-РНК мкг/ 10^7 клеток
Контроль: суспензия клеток, полученная сразу после диссоциации ткани трипсином	0,002
Контроль: реагированная суспензия через 4 суток культивирования	0,62
Реагированная суспензия после обработки трипсином (250 мкг/мл)	0,0015
Реагированная суспензия после обработки ДНКазой (100 мкг/мл)	0,6
Реагированная суспензия после обработки РНКазой (50 мкг/мл)	0,72

Данные таблицы показывают, что поверхность клеток в суспензии, полученной сразу после диссоциации нервной ткани трипсином, не способна акцептировать молекулы дс-РНК. Эта способность восстанавливалась у реагированных клеток через 4 суток культивирования. Повторная обработка трипсином полностью снимала дс-РНК связывающую способность нервных клеток. Обработка клеток ДНКазой, РНКазой не влияла на сорбцию дс-РНК на клетках.

Очевидно, что фактор связывания на поверхности клетки представлен белками, восстанавливаемыми в мембране в период культивирова-

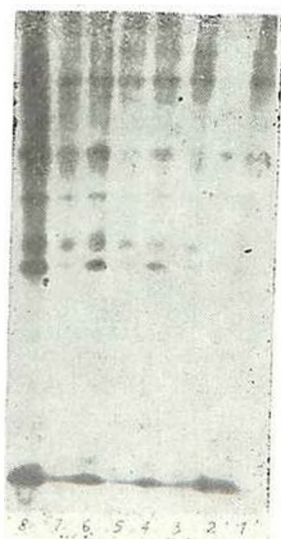


Рис. 1. Авторадиография электрофореграммы мембранных белков, фосфорилированных $[^{32}\text{P}]\text{АТР}$ в присутствии дс-РНК: справа налево 1, 3, 5, 7—фосфорилирование в отсутствие дс-РНК (контроль); 2, 4, 6, 8—фосфорилирование в присутствии дс-РНК за 5, 10, 20, 30 мин соответственно



Рис. 4. Электрофорез в 10%-ном ПААГ дс-РНК-связывающих мембранных белков, выделенных методом аффинной хроматографии на дс-РНК-АЭ-целлюлозе: 1—элюат 0,25 М NaCl, 2—элюат 0,5 М NaCl

ния, по-видимому, за счет синтеза *de novo*. Рибонуклеотиды, ДНК практически не влияли на сорбцию дс-РНК на нервных клетках, что указывает на специфический характер взаимодействия дс-РНК с белками плазматической мембраны. Некоторое повышение уровня сорбции дс-РНК на нервных клетках было получено после предварительной обработки клеток РНКазой. Можно допустить, что РНКаза, удаляя из поверхностной мембраны связанную РНК, освобождает участки для связывания $[^3\text{H}]$ дс-РНК: в частности, наличие в поверхностной мембране нервной клетки молекул РНК, влияющих на функцию рецепторов АХ, было продемонстрировано Турпаевым и соавт. [11].

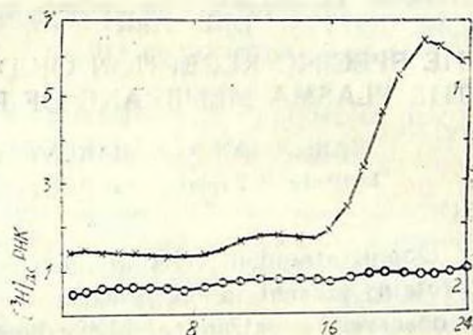
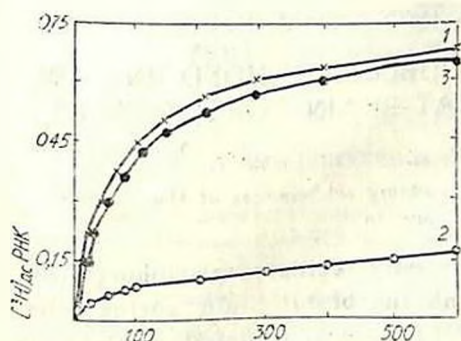


Рис. 2. Связывание $[^3\text{H}]$ дс-РНК клетками головного мозга (в мкг/10⁷ клеток). 1—специфическое связывание (с вычетом неспецифического связывания дс-РНК); 2—неспецифическое связывание $[^3\text{H}]$ дс-РНК в присутствии избытка холодной дс-РНК; 3—связывание $[^3\text{H}]$ дс-РНК в присутствии ДНК или АМР, ГМР, МР, СМР.

Рис. 3. Седimentация комплекса дс-РНК с очищенной мембранной фракцией нервных клеток. Зональное центрифугирование в 10—45%-ной сахарозе, 100 000 г, 2,5 ч, 4°. 1—профиль седиментации комплекса дс-РНК с мембраной; 2—профиль седиментации комплекса дс-РНК с обработанной трипсином или дезоксиголатом

На рис. 3 приведен профиль седиментации комплекса дс-РНК с очищенной мембранной фракцией нервных клеток при зональной седиментации в 10—45%-ной сахарозе. Полученный результат подтверждает белковую природу фактора в интактной мембране, обеспечивающего связывание дс-РНК на поверхности нервных клеток.

Солюбилизированная в присутствии Тритона X-100 очищенная фракция плазматических мембран клеток мозга была сорбирована на колонке дс-РНК, иммобилизованной на целлюлозе. Гель-электрофорез сорбированных белков, элюированных в ступенчатом градиенте NaCl (рис. 4), свидетельствует о том, что, во-первых, с дс-РНК связывается определенный набор белков; во-вторых, эти белки по величине Мг повторяются в элюате с разными молярностями NaCl. Первое обстоятельство, по-видимому, связано с тем, что источником дс-РНК-связывающихся белков являются плазматические мембраны достаточно разнородной популяции клеток мозга, второе можно объяснить тем, что идентичный набор белков, свя-

зывающихся с дс-РНК, занимает на молекуле дс-РНК близкие по своей первичной структуре последовательности, однако достаточно различающиеся (на одно, два основания), чтобы проявить различное сродство лиганда (дс-РНК) к белку-рецептору. Белок с величиной M_r элюируется с колонки дс-РНК целлюлозы и при ионной силе 1,0 M NaCl; по-видимому, в молекуле дс-РНК имеются блоки последовательностей, к которым данный белок проявляет особенно высокое сродство, и элюция данного белка с указанных последовательностей наступает при повышении ионной силы элюата до 1 M NaCl.

Таким образом, взаимодействие дс-РНК с белками плазматической мембраны клеток мозга высокоспецифично и по своим характеристикам аналогично взаимодействию лиганд-рецептор.

THE SPECIFIC RECEPTION OF DOUBLE-STRANDED RNA ON THE PLASMA MEMBRANE OF RAT BRAIN CORTEX CELLS

ZAKHARIAN R. A., BAKUNTZ K. A., SKOBELEVA N. A.

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

Double-stranded RNA *in vitro* markedly increases phosphorylation of proteins present in the plasma membrane of rat brain cortex cells. The observed spectrum of M_r values for phosphorylated proteins is generally close to the M_r of those proteins from brain membrane fraction which undergo cAMP-dependent phosphorylation. The factor responsible for the binding of the double-stranded RNA to the nerve cell surface appears to be a protein. The interaction of double stranded RNA with plasma membrane of the nerve cell is similar in its properties to ligand-receptor interaction.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mathe G., Florentin I., Olsson L., Brully M., Schultz J. Cancer Treat Rep., v. 62, p. 1613—1621, 1978.
2. Han I. H., Johnson A. G. J. Immunol., v. 117, p. 423—427, 1976.
3. Ratner L., Wiegand R. C., Farrel P. G., Sen G. C., Cabrer B., Lenguel P. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 81, p. 947—952, 1978.
4. Farrel P. G., Sen G. C., Dubots M. F., Ratner L., Lenguel P. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci., v. 75, p. 893—897, 1978.
5. Захарян Р. А., Рычков Г. Е., Дадалян С. С., Бакунц К. А., Агабальян А. С., Айрапетян С. Н. Нейрохимия, т. 5, № 3, с. 239—247, 1986.
6. Канцян М. Г., Амроян Э. А., Захарян Р. А., Агабальян А. С., Акопян Ж. И., Габриелян Э. С. Докл. АН АрмССР, LXXIX, № 3, с. 140—144, 1984.
7. Карагезян К. Г., Захарян Р. А., Овакимян С. С. Биол. журн. Армении, т. 40, № 12, с. 979—985, 1987.
8. Викторов И. В.—В кн.: Руководство по культивированию нервной ткани, с. 30—38, М., Наука, 1987.
9. Henn F. A. Adv. in Cell Neurobiol., v. 1, p. 379—403, 1981.
10. Романов В. В., Старостина В. К. Биотехнология, т. 3, № 5, с. 618—623, 1987.
11. Турпаяв Т. М., Соломонова Б. Г. Докл. АН СССР, т. 279, № 1, с. 250—252, 1984.

Поступила 23. III 1988



УДК 577.150.7—158.4:611.81

РЕГУЛЯЦИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ МОЗГА
ПРИ НАРУШЕНИИ СВЯЗИ С МЕМБРАНАМИ

ХВАТОВА Е. М., ГАРСИЯ А., ЗИМИН Ю. В., СЕМЕНОВА Т. С.

Горьковский медицинский институт им. С. М. Кирова

Изучены каталитические свойства гексокиназы (ГК), креатинкиназы (КК) и малатдегидрогеназы (мМДГ) в митохондриях и субмитохондриальных фракциях мозга крыс. Для изученных ферментов показаны различия в каталитических свойствах растворимых и мембраносвязанных форм. Солюбилизация ГК и КК существенно меняет величину V при сохранении типа кинетики реакции. мМДГ митохондрий и интактных мембран характеризуется S-образной кинетикой реакции окисления NADH. Обработка мембран фосфатным буфером ведет к солюбилизации части фермента. При этом фермент, оставшийся на мембране, как и солюбилизованный буфером, проявляет классическую кинетику реакции. При изменении свойств липидов мембраны, развивающихся при гипоксии, нарушаются связи ассоциированных с мембранами ферментов. Снижается доля митохондриальной ГК, одновременно отмечено изменение кинетических характеристик солюбилизованной фосфатным буфером мМДГ. Стабилизация митохондриальных мембран, возникающая при адаптации к гипоксии, ведет к усилению связи КК и ГК с мембранами. Снижается доля солюбилизуемых ферментов, изменяются кинетические характеристики мМДГ, остающейся на мембране после обработки фосфатным буфером. Результаты, полученные на субмитохондриальных фракциях мозга при различном состоянии липидов мембран, позволяли предположить наличие в митохондриях по меньшей мере трех форм мМДГ. К ним мы относим матричную форму фермента, а также связанную с мембраной за счет белок-белковых взаимодействий и ассоциированную на мембране за счет белок-липидных связей.

В общей проблеме регуляции каталитических свойств ферментов особое место занимает вопрос о влиянии структурных компонентов клетки на этот процесс. Митохондрии содержат несколько сот различных ферментов и являются примером внутриклеточных структурных образований, у которых обе мембраны содержат все категории мембранных белков-ферментов, а в матриксе и межмембранном пространстве присутствуют растворенные ферменты. Известно, что ряд солюбилизованных ферментов обладает свойством обратимой ассоциации с митохондриальными мембранами. Примерами таких энзимов могут служить ГК—поверхностный фермент наружной мембраны; КК—фермент межмембранного пространства, способный к ассоциации с наружной стороной внутренней мембраны, и NAD-зависимая мМДГ—фермент матрикса и внутренней мемб-

раны. Для этих ферментов показаны различия в каталитических и регуляторных свойствах в зависимости от их связи с мембраной или переходе в растворимое состояние [1—3].

В предыдущих исследованиях показана зависимость каталитических и регуляторных свойств КК, ГК и мМДГ мозга от их взаимодействия с мембранами митохондрий [4, 5]. Значение этого пути регуляции активности ферментов еще более возрастает при изменении физиологического состояния органа. Так, кислородное голодание мозга опасно нарушениями в митохондриях энергетических процессов, для которых очень высока степень риска незавершенности. Вместе с тем, механизм этого типа регуляции активности ферментов остается до конца не изученным.

Целью настоящего исследования явилось изучение мембранной регуляции каталитических свойств ферментов мозга, способных к ассоциации с митохондриальными мембранами. Для этого изучали каталитические характеристики ГК, КК и мМДГ в субмитохондриальных фракциях ткани мозга и их изменение при гипоксии и адаптации к кислородному голоданию.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на крысах-самцах массой 120—180 г.

Фракцию митохондрий клеток мозга получали дифференциальным центрифугированием [6].

Способность ГК к солюбилизации с митохондриальными мембран определяли при ступенчатой обработке митохондрий 0,1 М KCl. Активность ГК определяли спектрофотометрически, как описано ранее [7].

Экстракцию КК из разрушенных гипотоническим шоком митохондрий проводили 0,2 М фосфатным буфером, pH 7,5, с последующим отделением мембран центрифугированием при 100000 g в течение 15 мин. Активность фермента определяли в митохондриях, митохондриальных мембранах после их обработки фосфатным буфером и фосфатном солюбилизате по методу Лызловой и соавт. [8].

Препараты субмитохондриальных фракций для изучения свойств мМДГ получали по следующей схеме. Митохондрии мозга разрушали гипотонической обработкой и мембраны отделяли от содержимого межмембранного пространства и матрикса центрифугированием при 150000 g в течение 1 ч. Полученные мембраны (в дальнейшем первая мембранная фракция) суспендировали в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,4. Последующим центрифугированием при 50000 g в течение 2-х ч разделяли супернатант (фосфатный солюбилизат) и осадок (вторая мембранная фракция).

Кинетические характеристики мМДГ (реакция окисления NADH) изучали в митохондриях, первой и второй мембранных фракциях и фосфатном солюбилизате при постоянной концентрации оксалоацетата и переменной концентрации NADH [9]. Белок определяли по Лоури.

Острое кислородное голодание мозга вызывали помещением животных в барокамеру проточного типа при атмосферном давлении 143 мм рт. ст. на 30 мин. Для развития адаптации к гипоксии животных еже-

дневно в течение 4 дней помещали в барокамеру при разрежении атмосферы 310 мм рт. ст. на 1 ч.

Результаты и обсуждение

Изучены каталитические свойства ГК, КК и мМДГ в растворимой форме и при их ассоциации с мембранами митохондрий. Во всех случаях взаимодействие с мембранами изменяло свойства ферментов.

Так, адсорбция ГК на внешней мембране митохондрий увеличивает величину V более чем в 2 раза (с 40 до 8 нмоль $\text{NADPH}/\text{мг}$ белка $\cdot$ мин). При этом гиперболическая зависимость скорости реакции от концентрации Mg^{2+} -АТФ не меняется. По данным Wilson [10, 11], увеличение скорости реакции может возрасти на порядок, что связано с увеличением K_1 по глюкозо-6-фосфату в 10 раз [11, 12].

Для креатинкиназы показано, что после гипотонической обработки митохондрий активность фермента распределена поровну между ассоциированной с мембранами и свободной формами. Обработка 0,2 М фосфатным буфером позволила установить, что мембраносвязанная форма КК составляет 24%, а способная к солюбилизации КК достигает 76% общей митохондриальной активности фермента. Потеря связи с мембраной увеличивает величину V с 0,4 до 2,5 нмоль креатина/мг белка за минуту.

Для мМДГ установлено, что в митохондриальной фракции кинетика реакции характеризуется S-образной кривой насыщения фермента NADH (рис. 1). мМДГ в первой мембранной фракции сохраняла неклассическую форму кривой насыщения, а в растворимой части митохондрий приобрела гиперболическую зависимость. Эти результаты предполагают наличие, по крайней мере, двух форм фермента с разной кинетикой реакции. Ранее сообщалось, что очищенный фермент из митохондрий мозга обладал классической кинетикой [9]. Изменение формы кривой насыщения в первой мембранной фракции указывает на приобретение нового свойства ферментов в результате взаимодействия с мембраной.

Изучение кинетических характеристик мМДГ второй мембранной фракции и фосфатного солюбилизата показало, что в обоих случаях фермент проявляет классическую кинетику по NADH (рис. 1). Эти данные свидетельствуют о том, что с мембраной связаны, по меньшей мере, две формы фермента. Одна форма снимается фосфатным буфером и с ней легко связать проявление S-образной кинетики реакции, вторая буфером не снимается и, также как фермент матрикса, характеризуется классической кинетикой.

По современным представлениям, характер связей мМДГ с митохондриальной мембраной имеет двойную природу. На митохондриях сердца установлена возможность значительного (до 80%) освобождения мембран от мМДГ при обработке фосфолипазой A_2 [13]. Таким же эффектом обладают растворы с высокой ионной силой [13, 14]. Вместе с тем, приводятся данные, полученные также на митохондриях сердца, которые указывают на возможность белок-белковых взаимодействий мМДГ с мембраной [15—18]. Можно полагать, что 20% фермента, которые не

чувствительны к действию фосфолипазы A_2 , ассоциируются с мембраной за счет белок-белковых связей.

В состоянии острого кислородного голодания установлено общее снижение начальных скоростей малатдегидрогеназной реакции практически для всех субмитохондриальных фракций. Кинетика реакции не изменяется в митохондриальной фракции, а также в первой и второй фракциях мембран, хотя K_m и V претерпевают некоторые изменения в сторону снижения. Существенно изменяется в этом состоянии кинетика мМДГ во фракции фосфатного солюбилизата. У солюбилизованного фермента отчетливо проявляется отклонение от классической кинетики реакции, хорошо выполнимой в норме (рис. 2). Эти изменения можно связать с модификацией липидов и увеличением их лабильности в мембране за счет активации ПОЛ—типичной мембранной реакции на гипоксию [19]. Об этом свидетельствуют данные об изменении физико-химических и каталитических свойств мМДГ после обработки фермента фосфолипазой D [20], что связывают с модификацией найденного у мМДГ фосфолипидного компонента (около 2 мкг/мг белка фосфатидилохолина, фосфатидилэтаноламина и кардиолипина). Кроме того, показана модификация свойств фермента при взаимодействии с фосфолипидами [21] и фосфолипидными пузырьками [22]. Изменение свойств фермента фосфатного солюбилизата в представленных данных можно связать с возможным обогащением фермента мембранными липидами и их модификацией.

В пользу изменения процесса ассоциации ферментов с мембранами митохондрий в условиях острого кислородного голодания можно привести также результаты исследований ГК. Установлено, что при снижении суммарной тканевой активности ГК с 12,4 до 2,3 мкмоль NADPH/мг белка за 1 мин имеет место перераспределение активности фермента между мембранной и солюбилизованной формами. Активность солюбилизованного фермента увеличивается с 0,58 до 1,32, в то время как активность ассоциированного с мембраной фермента снижается с 11,2 до 0,84 мкмоль NADPH/мг белка за 1 мин.

Кинетика малатдегидрогеназной реакции приобретает новые характеристики в ходе адаптивной перестройки метаболизма к гипоксии (рис. 3). Кинетика реакции для митохондриальной фракции и фосфатного солюбилизата у подопытных и контрольных животных существенно не отличается. Вместе с тем, мМДГ второй фракции мембран приобретает отчетливую неклассическую зависимость скорости реакции от концентрации NADH. Это новое качество фермента, ранее не проявлявшееся у мМДГ второй фракции мембран интактных животных. Возникновение нового типа кинетики, свойственного первой мембранной фракции и митохондриям в целом, можно отнести к вероятному усилению белок-липидных взаимодействий в ходе адаптивной перестройки мембранных систем клетки. Известно, что адаптация животных к гипоксии вызывает достоверное повышение активности антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы), а также снижает перекисное окисление фосфолипидов мембран [23].

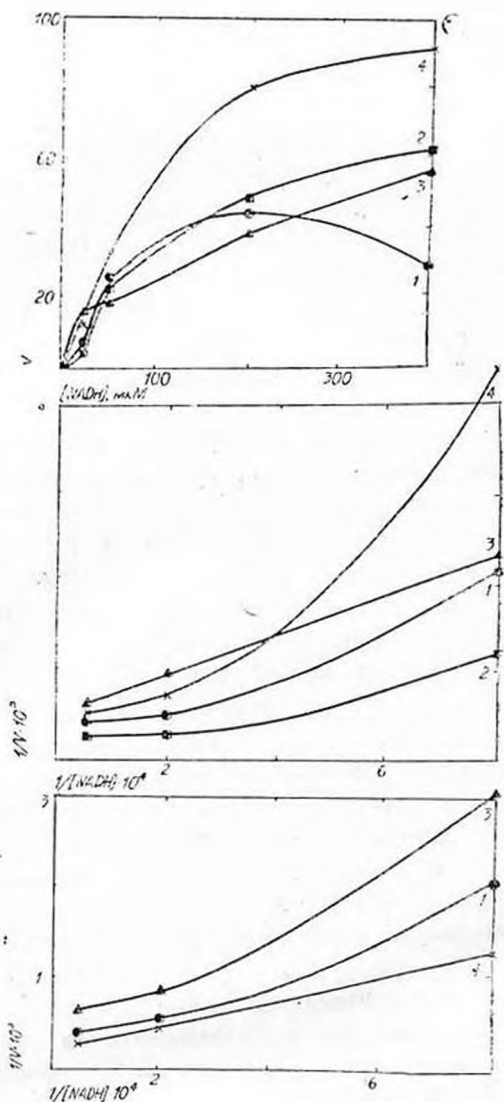


Рис. 1. Зависимость скорости реакции (нмоль NADH/с) от концентрации NADH для мМДГ субклеточных фракций мозга intactных животных. Здесь и на рис. 2, 3: 1—митохондриальная фракция, 2—первая фракция мембран, 3—вторая фракция мембран, 4—фосфатный солюбилизат). Количество белка в пробе—0,01 мг для фосфатного солюбилизата и 0,1 мг для остальных фракций

Рис. 2. Графики зависимости скорости реакции от концентрации NADH в координатах Лайнуивера-Берка для мМДГ субмитохондриальных фракций мозга крыс при гипоксии

Рис. 3. Графики в координатах Лайнуивера-Берка для мМДГ мозга животных, адаптированных к гипоксии

О стабилизации митохондриальных мембран в ходе гипоксической адаптации можно судить также по способности к солюбилизации КК и ГК. Так, для ГК солюбилизация с наружной мембраны митохондрий под действием 0,1 М KCl уменьшается в 4 раза (с 49 до 13% от общей активности митохондриального фермента). Одновременно отмечено увеличение начальных скоростей реакции на малых концентрациях Mg^{2+} -АТР, от сутствие эффекта насыщения фермента субстратом для изученных концентраций. Для КК также показано, что доля фермента, сохраняющего связь с мембраной после обработки 0,2 М фосфатным буфером, увеличивается (с 24 до 69%). Суммарная активность фермента снижена с 0,85 до 0,66 мкмоль креатина/мг белка 1 мин.

Полученные экспериментальные данные, а также результаты, опубликованные другими исследователями, позволяют высказать предположение о том, что митохондрии мозга содержат не менее трех форм мМДГ. Первая матричная форма, мМДГ, локализована в матриксе, где она может быть в виде индивидуального белка и в комплексе с другими ферментами матрикса. Эта форма обладает классической кинетикой реакции окисления NADH, как и очищенный фермент. Вторая форма—фермент, ассоциированный с мембраной за счет белок-белковых взаимодействий, реализация которых, по-видимому, не меняет конформационного состояния мМДГ—она обладает классической кинетикой. Третья форма—фермент, ассоциированный с мембраной за счет белок-липидных взаимодействий. Каталитические свойства мМДГ модифицированы, фермент характеризуется выраженными отклонениями от классической кинетики.

Ассоциация фермента с фосфолипидами мембраны изменяет, по-видимому, конформацию субъединиц димера, что придает мМДГ аллостерические свойства. Эти качества могут трансформироваться в зависимости от состояния фосфолипидов мембраны, что наглядно показано на свойствах малатдегидрогеназы фосфатного солюбилизата в экстремальных условиях гипоксии, а также во второй фракции мембран при адаптивной перестройке метаболизма.

На примере изученных ферментов можно проследить за универсальным механизмом регуляции активности ферментов за счет их взаимодействия с мембранами митохондрий. Изменение свойств фосфолипидов мембран митохондрий при гипоксии ведет к нарушению взаимодействий между ферментами и мембранами. При этом происходит не только перераспределение ассоциированных с мембранами ферментов в пользу увеличения доли свободных форм, но и изменение свойств оставшихся на мембране энзимов. Стабилизация мембран при адаптации к гипоксии, напротив, усиливает взаимодействия ферментов с мембранами, что ведет не только к восстановлению исходных свойств ферментов, но и к возникновению у них новых качеств.

CONTROL OF BRAIN MITOCHONDRIAL ENZYMES BY ALTERED ASSOCIATION WITH MEMBRANES

KHVATOVA E. M., GARCIA A., ZIMIN Yu. V., SEMENOVA T. S.

Kirov Medical School, Gor'ky

The catalytic properties of hexokinase (HK), creatine kinase (CK) and malate dehydrogenase (mMDH) in rat brain mitochondrial and sub-mitochondrial fractions have been investigated. The difference in catalytic properties of soluble and membrane-associated forms has been shown. The solubilization of HK and CK leads to a significant V change but the type of reaction kinetic remains unchanged. mMDH of mitochondria and intact membranes has a characteristically S-shaped kinetics. Treatment of membranes by the phosphate buffer leads to solubilization of a part of mMDH. The enzyme remaining on the membrane, as well as the solubilized mMDH, possess a classical reaction kinetic. Changes in properties of membrane lipids induced by hypoxia disturb the enzyme-membrane interactions. The mitochondrial fraction of HK decreases, and kinetic characteristics of mMDH solubilized by the phosphate buffer are modified. Stabilization of the mitochondrial membrane resulting from adaptation to hypoxia, leads to an increased interaction of CK and HK with the membrane. The amount of the solubilized enzymes decreases, and kinetic characteristics of mMDH remaining on the membrane after phosphate treatment changed. These results lead to a view, that mMDH is present in mitochondrial in three forms: (1) the matrix-associated enzyme; (2) the enzyme associated with the membrane by protein-protein interactions; and (3) the enzyme associated with the membrane by protein-lipid interactions.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kircova M., Russanov E. *Acta physiol et pharmacol. Bulg.*, v. 5, № 4, p. 57—62, 1979.
2. Липская Т. Ю., Молокова Е. В.—В кн.: Биохимия и биофизика мышц, с. 118—129, М., Наука, 1983.
3. Курганов Б. И.—В кн.: Физико-химические проблемы ферментативного катализа (под ред. Ю. М. Торчинского), с. 97—103, М., Наука, 1984.
4. Khvatova E. M., Garcia A., Zimin Y. V.—In: Abstracts of the Sixth ESN General Meeting in Prague, p. 431, 1986.
5. Хватова Е. М.—В кн.: Всесоюзный симпозиум по медицинской энзимологии, тезисы докладов (под ред. С. С. Дёбова), с. 34—35, М., 1986.
6. Fonyo A., Somogyi J. *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.*, v. 18, № 3, p. 191—198, 1960.
7. Хватова Е. М., Доведова Е. Л., Михалева И. И. *Нейрохимия*, т. 6, № 1, с. 57—63, 1987.
8. Аызлова С. Н., Тааме Н., Стефанов В. Е., Южнива Т. А.—В кн.: Структурные основы и регуляция биологической подвижности, с. 108—111, М., Медицина, 1980.

9. Хаслова Е. М., Гарсия А. Нейрохимия, т. 5, № 3, с. 270—277, 1986.
10. Wilson I. E. Curr. Top. Cell. Regul., v. 16, № 4, p. 2—54, 1980.
11. Wilson I. E. Handbook of Neurochemistry, v. 4, p. 151—172, 1983.
12. Sprengers E. D., Koenderman A. H. L., Staal G. E. I. Biochim et biophys. acta, v. 755, № 1, p. 112—118, 1983.
13. Comte J., Gautheron D. Biochemie, v. 60, p. 1299—1305, 1973.
14. Elduque A., Casado F., Cortes A., Bozal J. Int. J. Biochem., v. 14, № 3, p. 221—229, 1982.
15. Consiglio E., Varrone S., Covelli I. Eur. J. Biochem., v. 17, p. 403—414, 1970.
16. Passarella S., Marra E., Doonan S., Quagliariello E. Biochem. J., v. 210, № 1, p. 207—214, 1983.
17. Passarella S., Marra E., Atlante A., Quagliariello E.—In: Achiev. Perspect. Mitoch. Res. Proc. Int. Symp. (ed. by E. Quagliariello), v. 1, p. 357—364, Elsevier, Amsterdam, 1985.
18. Moore G. E., Gadol S. M., Robinson J. B. Jr., Srere P. A. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 121, p. 612—618, 1984.
19. Джафаров А. И., Магомедов Н. М., Кулиева Э. М., Нейман-заде Н. К., Керимов Р. Ф., Мамедханлы Т. А., Хасасва Э. Г., Чогошвили А. Г. Бюл. эксперим. биол. и мед., № 10, с. 433—435, 1985.
20. Suleiman S. A. Indian J. Biochem. Biophys., v. 20, № 5, p. 276—279, 1983.
21. Dodd G. H. Eur. J. Biochem., v. 33, № 3, p. 418—427, 1973.
22. Webster K. A., Freeman K. B., Ohki S. Biochem. J., v. 186, № 1, p. 227—233, 1980.
23. Меерсон Ф. З. Адаптация, стресс и профилактика, 274 с., М., Наука, 1981.

Поступила 13. IV 1986



УДК 577.355

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ СИНАПТИЧЕСКИХ МЕМБРАН МОЗГА ЖИВОТНЫХ РАЗНОГО ВОЗРАСТА

АДАМЧИК Е. И., МИЛЮТИН А. А.

Институт радиобиологии АН БССР, Минск

Установлено, что в синаптических мембранах головного мозга при старении понижается микровязкость поверхностных и глубинных зон липидного бислоя, оцениваемая по подвижности спин-меченых жирных кислот. Уменьшается общее количество SH-групп мембранных белков без достоверного изменения соотношения между числом поверхностных и скрытых тиолов. С помощью спиновой метки на SH-группы показано, что у старых животных в синаптических мембранах увеличивается доля сильно-мобилизованных тиолов, изменяется их подвижность, а также наблюдается значительное усиление влияния β -агониста изопротеренола на внутримолекулярную подвижность белков. При неизменной базальной активности аденилатциклазы степень активации фермента изопротеренолом выше у старых крыс по сравнению со зрелыми. Эти данные интерпретируются как изменение конформации или взаимориентации белков в мембранах. На основании анализа фосфолипидного и жирнокислотного состава сделано предположение, что накопление лизоформ фосфолипидов является одной из основных причин возрастной структурной реорганизации синаптических мембран.

В настоящее время не вызывает сомнений, что ЦНС играет ключевую роль в процессах старения организма. Анатомо-морфологические исследования свидетельствуют о возрастном нарушении нейронов [1], изменении фосфолипидного и жирнокислотного состава целого мозга [2], модификации активности ряда ферментов [3]. Хорошо изучены и электрофизиологические характеристики нервной ткани [4]. Оставалось неясным, изменяется ли с возрастом молекулярная организация и функциональная активность синапсов и изолированных синаптических мембран, играющих ведущую роль в межнейронных коммуникациях в ЦНС. Исходя из вышесказанного, а также из представлений о роли биологических мембран как кооперативных систем, способных к локальным и генерализованным структурным перестройкам в регуляции физиологической активности клеток, для понимания молекулярных механизмов возрастных изменений функций мозга представлялось перспективным сопоставить структурную организацию синаптических мембран у животных разного возраста, а именно: изучить физические свойства (микровязкость) липидного бислоя, физико-химические характеристики основного пула мембранных белков,

фосфолипидный и жирнокислотный состав синаптических мембран зрелых и старых животных.

Материалы и методы

Опыты проводили на крысах-самцах линии *Wistar* стадного разведения двух возрастных групп (6—12 месяцев—зрелые и 24—26 месяцев—старые животные), содержащихся на общем рационе вивария.

Синаптические мембраны выделяли по методу Jones, Malus [5], липиды экстрагировали по методу Folch и соавт. [6]. В работе использовали следующие химико-аналитические методы: ТСХ липидов [7], гель-электрофорез мембранных белков в ДДС-Na [8], газохроматографическое определение жирнокислотного состава липидов с помощью газового хроматографа «Varian-Aerograph» (США) на колонках, заполненных хроматоном N-AWDMCS с 10%-ным полиэтиленгликольсукцинатом [9], спектрофотометрическое измерение содержания гидроперекисей липидов [10] и ТБК-активных продуктов [11].

Активность мембраносвязанной аденилатциклазы определяли при 30° в среде конечного объема 50 мкл [13], выход сАМР контролировали с помощью известного количества [^3H] сАМР [14].

Титрование сульфгидрильных групп проводили спектрофотометрически с помощью проникающего SH-реagenta 5,5-дитиобис (2-нитробензойной) кислоты (ДТНБ) [15]. Для выявления SH-групп, недоступных для ДТНБ (скрытые тиолы), мембраны солибилизировались 1%-ным ДДС-Na. Концентрацию белка определяли по методу Lowry и соавт. [12].

Микровязкость липидного компонента мембран оценивали по значениям параметра упорядоченности S [16] и по отношению высокополюсового пика к центральному [17] спектров ЭПР жирнокислотных спиновых зондов—доксилпроизводных кетостеариновой и пальмитиновой кислот. Микровязкость поверхностных зон липидного бислоя исследовали с помощью 5-доксилстеарита (5-ДС) и 6-доксилпальмитата (6-ДП). Глубинную зону бислоя «зондировали» 16-доксилстеаратом (16-ДС).

В качестве спиновой метки, ковалентно связывающейся с SH-группами мембранных белков, использовали нитроксильный радикал 4-бром-меркур-3-(4-нитрозопиперазинометил)-2,2,6,6-тетраметил- Δ^4 -дегидропиперидин-1-оксид (метка R_2), синтезированный в ИХФ АН СССР [18]. Метку R_2 растворяли в диметилсульфоксиде до концентрации 10^{-3} М и добавляли к мембранной суспензии при мягком непрерывном перемешивании при комнатной температуре. Конечная концентрация метки в пробе ($2 \cdot 10^{-5}$ М) на порядок превышала концентрацию SH-групп, а диметилсульфоксида—не превышала 2% (объем). Мембраны инкубировали с меткой 6 ч при 0° и отмывали от несвязанной метки двукратным центрифугированием по 10 мин при 6000 g. Для характеристики физического состояния мембранных белков при использовании спиновой метки R_2 рассматривали отношение W/S спектральных амплитуд низкочастотной части спектра (рис. 1), где S —линия спектра, возникающая от сигнала относи-

тельно заторможенных спинных меток, W—линия спектра, обусловленная метками с относительно более высокой степенью подвижности [19].

В качестве эмпирической меры подвижности радикала использовался параметр $\mu = (1 - A_{\max}/A^{\circ}_{\max})$ [18],

где $A_{\max}$ —расстояние между внешними экстремумами спектра, $A^{\circ}_{\max}$ —значение $A_{\max}$ в предельном случае отсутствия вращения метки (при 77° К). Спектры ЭПР регистрировали на спектрометре E-104 фирмы «Varian» (США), контролируя температуру с точностью $\pm 0,2^{\circ}$ при помощи термодары, помещенной в образец.

Результаты и обсуждение

Для сравнительной характеристики микровязкости липидного бислоя синаптических мембран мы использовали спин-меченые жирные кислоты. Спектры регистрировали при 25°.

Анализ отношения амплитуд высокополевого пика к центральному показал, что его величины для 16-ДС значительно выше, чем для 5-ДС и составляют соответственно для зрелых животных— $0,4 \pm 0,02$ и $0,023 \pm 0,005$, а для старых— $0,57 \pm 0,03$ и $0,0345 \pm 0,003$. Вместе с тем, подвижность обоих зондов выше в мембранах старых крыс, что указывает на значительную лабильзацию липид-липидных и липид-белковых взаимодействий по всей глубине бислоя и уменьшение микровязкости.

При сопоставлении физических свойств липидного бислоя в широком диапазоне температур от 10 до 39° с помощью зонда 6-ДП, оказалось, что при всех температурах, ниже физиологической, для мембран старых животных вращательная подвижность жирнокислотных остатков, оцениваемая по параметру упорядоченности больше, чем для молодых [20]. Эти данные, как и результаты, полученные при включении в мембраны 5-ДС и 16-ДС, могут свидетельствовать о разжижении и дестабилизации липидного бислоя синаптических мембран с возрастом.

При анализе состояния основного белкового фонда синаптических мембран в качестве конформационно-чувствительных тестов вначале использовали доступность SH-групп мембранных белков к непроницающему SH-реагенту ДТНБ. Известно, что при конформационных переходах белка часто наблюдается изменение соотношения между числом поверхностных и скрытых тиолов [15].

В наших опытах для выявления SH-групп, недоступных для ДТНБ (скрытые тиолы), мембраны солиubilizировались 1%-ным ДДС-Na. Сравнительный анализ соотношения между поверхностными и скрытыми SH-группами показал, что величина этого соотношения мало изменяется при старении, в то время как общее количество тиолов значительно снижается (с $6,30 \pm 0,01$ до $4,30 \pm 0,04$ моль на 10^5 г белка). Это согласуется с более ранними сообщениями об уменьшении содержания тиолов и увеличении количества дисульфидных связей в гомогенатах различных тканей при старении [21].

Подобного рода эффект может быть следствием повышенной доступ-

ности SH-групп к кислороду в структурно-дестабилизированных мембранах вследствие накопления в мембранах агентов, окисляющих SH-группы или снижением активности ферментов типа тиолредуктаз, поддерживающих тиоловые группы в восстановленном состоянии.

Как будет показано дальше, при старении не происходит активации процессов перекисного окисления липидов, что делает маловероятным накопление окислителей SH-групп с возрастом. В то же время установлено, что в разных областях головного мозга крыс при старении происходит уменьшение содержания NADPH-зависимой дисульфидредуктазы и сродства фермента к субстрату на фоне падения количества белковых SH-групп, экстрагируемых Тритоном X-100, ДДС-Na и водой [22]. Снижение активности ферментов, восстанавливающих тиолы наряду с фактором структурной дестабилизации и определяет, вероятно, наблюдаемое уменьшение числа сульфгидрильных групп.

Тот факт, что соотношение между числом поверхностных и скрытых SH-групп мембранных белков остается при старении неизменным, не позволяет сделать однозначный вывод о какой-либо модификации основного фонда белков в позднем онтогенезе. В этом отношении гораздо более информативны методы, характеризующие подвижность отдельных функциональных групп, например тиолов, в мембранных белках.

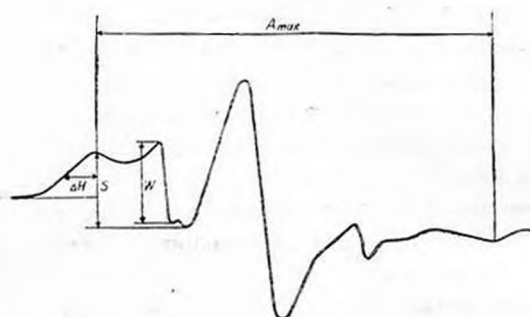


Рис. 1. Спектр ЭПР нитроксильной спиновой метки R_2 в синаптических мембранах. Концентрация зонда $2 \cdot 10^{-5}$ М. Измерения проводили при 25°

Для более строгой оценки конформационного состояния белков синаптических мембран мы использовали нитроксильную спиновую метку R_2 на SH-группы. Благодаря большой гидрофобности, метка R_2 может присоединяться к SH-группам, расположенным как на поверхности мембран, так и в глубине бислоя. Присоединением метки к двум классам SH-групп объясняется усложненная форма ее спектра, который представляет собой суперпозицию по крайней мере двух сигналов (рис. 1): сильно заторможенной метки (с широкими линиями S) и слабо заторможенной (с узкими линиями W). При использовании спиновых меток типа R_2 о физическом состоянии мембранных белков обычно судят по отношению спектральных амплитуд W/S [19]. Как видно из табл. 1, этот показатель выше у зрелых животных, что свидетельствует об относительном росте вклада белков с пониженной подвижностью SH-групп в суммарный спектр ЭПР при старении.

Для количественного определения подвижности этой популяции метки использовалась полуширина пика $S(\Delta H)$. Оказалось, что величина ΔH

меньше у старых животных, чем у зрелых. Иными словами, подвижность сильноиммобилизованной метки в белках нейрональных мембран старых крыс выше, чем в белках мембран зрелых животных (табл. 1). Учитывая результаты тилометрии и данные электрофореза, которые свидетельствуют об отсутствии каардинальных сдвигов в распределении и амплитуде

Таблица 1

Параметры спектров ЭПР метки R_2 , ковалентно связанной с сульфгидрильными группами мембранных белков синаптических мембран мозга крыс ($n=4$)

Возраст	$t, ^\circ\text{C}$	$A_{\text{max}} \text{ (Гс)}$ $\bar{x} \pm S\bar{x}$	$\Delta H \text{ (Гс)}$ $\bar{x} \pm S\bar{x}$	W/S $\bar{x} \pm S\bar{x}$	μ $\bar{x} \pm S\bar{x}$
6—7 месяцев	—196	$71,3 \pm 0,1$	$6,8 \pm 0,05$		
	22	$66,4 \pm 0,05$	$4,0 \pm 0,05$	$1,39 \pm 0,015$	$2,68 \pm 0,03$
	38	$65,4 \pm 0,05$	$4,4 \pm 0,05$	$3,30 \pm 0,025$	$2,49 \pm 0,025$
24—26 месяцев	—196	$70,8 \pm 0,05$	$6,5 \pm 0,05$		
	22	$66,8 \pm 0,1$	$3,7 \pm 0,05$	$1,18 \pm 0,02$	$2,87 \pm 0,06$
	38	$65,7 \pm 0,1$	$4,1 \pm 0,05$	$2,1 \pm 0,05$	$2,63 \pm 0,045$

пиков отдельных мембранных полипептидов, результаты ЭПР-спектроскопии можно интерпретировать как возрастное изменение конформации и/или взаимоориентации белков в синаптических мембранах при старении. Об этом также свидетельствуют и результаты исследования влияния β -агониста изопротеренола, вызывающего активацию аденилатциклазной системы синаптических мембран, на внутримолекулярную подвижность мембранных белков. В пределах концентраций 10^{-6} — 10^{-4} М изопротеренол вызывает уменьшение отношения W/S у старых животных и практически не изменяет его у зрелых (рис. 2). Полученные результаты свидетельствуют об увеличении доли сильноиммобилизованных SH-групп мембранных белков у старых животных при действии β -адренэагониста.

Таблица 2

Содержание основных классов фосфолипидов синаптических мембран мозга крыс разного возраста

Фосфолипиды	Содержание, $\mu\text{моль}/P_i/\text{мг}$ общих липидов	
	6—7 месяцев	24 месяца
Лизофосфатидилхолин	$12,9 \pm 0,5$ (11)	$25,8 \pm 1,0^*$ (14)
Сфингомиелин	$44,8 \pm 1,3$ (12)	$46,1 \pm 1,1$ (13)
Фосфатидилхолин	$364 \pm 12,0$ (13)	$325 \pm 15,0^{**}$ (14)
Фосфатидилэтаполамин	$196 \pm 8,0$ (13)	$222 \pm 11,0$ (15)
Общие фосфолипиды	$770 \pm 14,0$ (14)	$802 \pm 20,0$ (12)

Примечание. $*p < 0,01$; $**p < 0,05$. В скобках указано количество опытов.

Такие возрастные изменения в реакции различных пулов белковых SH-групп на взаимодействие изопротеренола с β -адренорецепторами могут в определенной мере объяснить различную степень активации аденилатциклазы синаптических мембран через β -адренорецепторы данным агонистом (на 143% у зрелых крыс, а у старых—на 178%).

Обнаруженные возрастные различия в физических свойствах липидного бислоя и состояния белков мембран могли быть обусловлены изменением их фосфолипидного состава.

Анализ фосфолипидного состава синаптических мембран показал, что при старении достоверно не изменяется содержание сфингомиелина, фосфатидилэтаноламина и общих фосфолипидов. Аналогичная картина отмечалась в отношении фосфатидилинозитола и фосфатидилсерина (данные не приведены). В то же время, как видно из табл. 2, в которой представлены данные по содержанию основных классов фосфолипидов, составляющих 80% от всех фосфолипидов, и вносящих определяющий вклад в

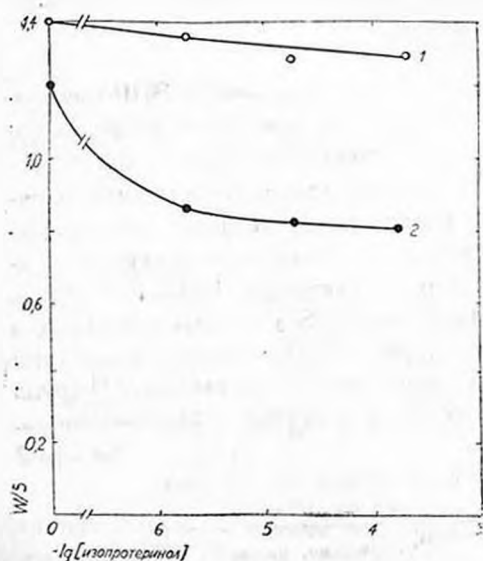


Рис. 2. Соотношение сигналов слабо и сильно заторможенной метки R_2 в синаптических мембранах зрелых (1) и старых (2) крыс в контроле и после инкубации (20 мин при комнатной температуре с изопротеренолом. По оси ординат—отношение спектральных амплитуд

поддержание оптимального физического состояния липидного компонента мембран [23], концентрация фосфатидилхолина снижается примерно на 10%, а содержание лизофосфатидилхолина увеличивается в 2 раза. Аналогичные результаты на синаптических мембранах были получены и другими исследователями [2].

Изменяется и жирнокислотный состав мембранных липидов. С возрастом уменьшается доля ненасыщенных жирных кислот, а отношение ненасыщенных жирных кислот к насыщенным снижается с 1.1 до 0.087.

В качестве причины модификации мембран рассматривали также ПОЛ. С этой целью изучали накопление диеновых конъюгатов как показатель ацилгидропероксидов [10, 11] и индуцируемую экзогенной перекисью водорода и озоком стационарную интенсивность хемилюминесценции [24] как меру интенсивности свободнорадикальных окислительных процессов.

Как показал анализ производной зависимости скорости нарастания хемилюминесценции синаптических мембран от времени озонирования при постоянной скорости подачи озона (10 мкМ в мин), интенсивность хемилюминесценции мембран старых животных значительно ниже, чем у зрелых. Содержание начальных продуктов перекисного окисления—ацилгидроперексидов также ниже у старых крыс по сравнению со зрелыми (табл. 3). Удаление антиоксидантов при обработке мембран спиртом приводит к усилению хемилюминесценции, причем эффект сильнее выражен у зрелых, чем у старых животных (табл. 3). Эти результаты говорят о снижении интенсивности свободнорадикальных реакций и уменьшении содержания биоантиоксидантов в позднем онтогенезе. Таким образом, маловероятно, что в нашем случае структурная реорганизация мембран у старых животных вызвана усилением ПОЛ. Кроме того, активация перекисных процессов на модельных и природных мембранах сопровождается повышением, а не понижением микровязкости [25].

Таблица 3

Содержание ацилгидроперексидов и интенсивность хемилюминесценции синаптических мембран мозга крыс разных возрастных групп

Возраст (месяцы)	Ацилгидро- перексиды, А ₂₃₂ /мг белка	Интенсивность хемилюминесценции в имп. за 15 мин при индукции		
		H ₂ O ₂ (0,1%)	O ₂ интакт- ные	O ₂ после спирто- вой обработки
6—7	0.39	4680	6710	19120 (185%)
24—26	0.08	3500	5350	7310 (37%)

Представленные данные свидетельствуют о том, что при старении в синаптических мембранах крыс наблюдается изменение физических свойств липидного бислоя, а также изменение конформации и/или ориентации мембранных белков. Анализ возможного вклада возрастных изменений липидного состава в наблюдаемую возрастную реорганизацию синаптических мембран позволил предположить, что наиболее вероятным причинным фактором является накопление лизофосфатидилхолина, разжижающий эффект которого продемонстрирован на липосомах из фосфатидилхолина [26].

THE STRUCTURAL ORGANIZATION OF SYNAPTIC MEMBRANES IN THE BRAIN OF RATS OF DIFFERENT AGE

ADAMCHIK E. I., MILYUTIN A. A.

Institute of Radiobiology, Academy of Sciences of the Byelorussian USSR,
Minsk

Aging leads to a decreased microviscosity of the surface or deeper zones of the lipid bilayer in brain synaptic membranes. This was recorded by measuring mobility of the spin-labeled fatty acids. The

total level of SH-groups in membrane proteins decreases with age without any significant change in the proportion between the surface and masked thiols. Experiments with spin labeling of SH-groups have demonstrated that synaptic membranes of old animals contain greater levels of strongly immobilized thiols, their mobility is changed and there is a marked increase in the effect of isoproterenol, a beta-agonist, on the intramolecular mobility of proteins. The basal activity of adenylate cyclase remains unchanged but the extent of its activation by isoproterenol is higher in old rats as compared with mature ones. These data are interpreted in terms of altered conformation or modified mutual orientation of proteins in the membranes. Analysis of the phospholipid and fatty acid composition leads to a hypothesis that the accumulation of lysophospholipids in the membranes is a major factor responsible for their age-related structural modification.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вербицкая Л. Б., Боголспов Н. Н. Журн. невропатол. и психиатрии, т. 84, № 7, с. 987—993, 1984.
2. Sun A., Sun J. Interdiscipl. Topics Geront., v. 15, № 1, p. 34—53, 1979.
3. Канунго М. Биохимия старения. М., Мир, 1982.
4. Фроликис В. В. Старение. Нейрогуморальные механизмы. Киев, Наукова думка, 1981.
5. Jones D. H., Matus A. J. Biochim. et biophys. acta, v. 356, № 3, p. 276—287, 1974.
6. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. H. J. Biol. Chem., v. 177, № 6, p. 751—766, 1957.
7. Кейтс М. Техника липидологии. М., Мир, с. 24—25, 1975.
8. Rutteri M. Comp. Bioch. Physiol., v. 42, № 4, p. 543—546, 1972.
9. Берчфилд Э., Старс Г. Газовая хроматография в биохимии. М., Мир, 1964.
10. Гаврилов В. Б., Мишкорудная М. И. Лаб. дело, № 3, с. 33—35, 1983.
11. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., Наука, 1972.
12. Lowry O. H., Rosebrough N., Farr A., Randall R. J. Biol. Chem., v. 193, № 1, p. 255—275, 1951.
13. Salomon Y., Londos C., Rodbell M. Anal. Biochem., v. 58, № 5, p. 541—548, 1974.
14. Ткачук В. А., Балденкес Г. Н. Биохимия, т. 43, № 6, с. 1097—1110, 1978.
15. Ando G., Steiner M. Biochim. et Biophys. acta, v. 311, № 1, p. 26—37, 1973.
16. Caffney B. J. Spin labelling: theory and application. New York, p. 567—571, 1976.
17. Кольтовер В. К. Спинные метки изонды в исследованиях модельных и биологических мембран. Итоги науки и техники. сер. Биофизика, т. 11, с. 10—100, 1979.
18. Гольдфельд М. Г., Кольтовер В. К., Майор П. С., Микоян В. Д., Дмитриев П. И., Шапиро А. Б. Мол. биол., т. 20, № 1, с. 120—127, 1986.
19. Butterfield D. A., Roses A. D., Appel S. H., Chesnut D. B. Arch. Biochem. and Biophys., v. 177, № 6, p. 226—234, 1976.

20. Милютин А. А., Беляева Е. И., Буланова К. Я., Кирилук А. П., Лысакова Т. И., Окунь И. М., Аксенцев С. Л., Конев С. В. Бисфизика, т. 29, № 4, с. 640—642, 1984.
21. Оэриу С. Труды Международной конф. геронтол., Киев, т. 3, с. 41, 1972.
22. Кошоридзе А. И., Алексидзе Н. Г. Тезисы докл. IX Всесоюзн. конф. по биохимии нервной системы, Ереван, с. 63, 1983.
23. Quinn P. J. Prog. Biophys. Molec. Biol., v. 38, p. 1—104, 1981.
24. Конев С. В., Аксенцев С. Л., Окунь И. М., Беляева Е. И., Милютин А. А. Биохемилюминесценция, Ивано-Франковск, с. 143, 1981.
25. Curtis M. T., Gilfor D., Farber J. L. Arch. Biochem. and Biophys., v. 235, № 2, p. 644—649, 1984.
26. Morris D., McNeil R., Castellino F., Thomas J. Biochim et biophys. acta, v. 599, № 2, p. 380—390, 1980.

Поступила 8. IX 1988

Ганглиозиды и модуляция функции нейрона, 647 с., 1987.

Gangliosides and modulation of Neuronal Functions. H. Rohmann, Springer-Verlag, West. Berlin, 647 p. 1987.

После открытия Эрнстом Клекком ганглиозидов в 1936 г. появились тысячи статей, иллюстрирующих уникальные особенности этих гликолипидов и их вероятное участие в различных биологических феноменах. Однако и по настоящее время существуют значительные различия и противоречия между накопленными данными в этой области, требующие незамедлительного разрешения, поскольку ганглиозиды находят широкое применение в качестве терапевтических препаратов для лечения различных нейропатий. В рассматриваемой книге анализируется существующая информация об исследованиях в области ганглиозидов и перспективах их применения в медицине.

Содержание отдельных глав: Основные направления исследований в области функции ганглиозидов; Метаболизм ганглиозидов мозга; Специфическое распределение в клетках и связанная с дифференцировкой экспрессия ганглиозидов мозга; Ганглиозиды и пластичность мозга; Ганглиозиды и пластичность нейронов.



УДК 612.822+612.8.015+577.352

ДИНАМИКА ВКЛЮЧЕНИЯ [^3H]ЛЕЙЦИНА В БЕЛКИ ЦНС
ВИНОГРАДНОЙ УЛИТКИ ПРИ ОБУЧЕНИИ

ГРИНКЕВИЧ Л. Н.

Институт автоматизации и электрометрии СО АН СССР, Новосибирск

Изучали включение [^3H]лейцина в водорастворимые белки ЦНС виноградной улитки на ранних стадиях формирования условного оборонительного рефлекса. Методом диск-электрофореза в ПААГ показано, что при этом многократно повышается содержание кислого нейроспецифического белка с подвижностью (R_f) 0,58 без усиления включения меченого предшественника. Высказывается предположение о посттрансляционных модификациях белка-предшественника, либо выходе его в цитоплазму из клеточных структур в процессе обучения.

Предполагается наличие причинно-следственной связи увеличения количества этого белка в цитоплазме с ростом возбудимости нейрона и ориентировочным поведением, необходимым компонентом формирования условной связи. Кроме того, зарегистрировано увеличение включения метки в две особо кислые белковые фракции на всех изученных стадиях обучения и небольшое угнетение включения метки в белки с $R_f < 0,5$ спустя 7–24 ч после обучения.

Высшие беспозвоночные (в нашем случае *Helix pomatia*) являются наиболее распространенным объектом электрофизиологических и поведенческих исследований в связи с относительно «простым» устройством ЦНС и наличием гигантских нейронов. У этих животных идентифицированы клеточные элементы, принимающие участие в формировании нескольких оборонительных и пищевых условных рефлексов [1–3], интенсивно изучаются клеточные аналоги обучения, позволяющие сопоставить нейрональные и поведенческие изменения [2–4], получены интересные результаты, касающиеся ионных механизмов обучения, опосредованных активацией вторичных посредников, протеникиназ и фосфорилированием синаптических белков [5–8]. Однако обнаруженные мембранные изменения удовлетворительно описывают только картину кратковременной памяти и не объясняют происхождения следовых реакций, сохраняющихся длительное время, поэтому изучение метаболизма информационных макромолекул и их роли в формировании и сохранении следа памяти продолжает оставаться актуальным.

В предыдущих работах нами было показано, что формирование условного оборонительного рефлекса у виноградной улитки сопровождалось ко-

личественными изменениями кислых нейроспецифических белков как в суммарном гомогенате ЦНС [9], так и в некоторых клеточных элементах условнорефлекторной сети [10, 11]. Ранние стадии обучения характеризовались резким увеличением количества белка с R_f 0,58 при исследовании в 7,5%-ном ПААГ. Закрепление рефлекса приводило к возвращению к контрольному уровню, при достижении 100% критерия обученности повышенное количество кислых мозгоспецифических белков оставалось только в командных нейронах этого оборонительного рефлекса [10, 11].

В настоящей работе для выяснения причин наблюдаемых изменений в содержании исследуемых мозгоспецифических белков была проведена серия экспериментов по включению изотопной метки в белки ЦНС виноградной улитки на различных этапах обучения.

Материалы и методы

Эксперименты проведены на половозрелых улитках *Helix pomatia*, у которых вырабатывали условный оборонительный рефлекс закрытия дыхательного отверстия [1, 9], условным стимулом служило легкое постукивание по раковине, безусловным—струя воздуха, направленная в дыхательное отверстие. Улитки получали по 15 сочетанных либо несочетанных стимулов в день с интервалом 3—5 мин. Для достижения 100%-ного уровня обучения обычно необходимо 180—240 сочетаний.

После получения 15, 30, 60 и 120 сочетанных стимулов извлекали подглоточный комплекс ганглиев, который затем инкубировали в 2 мл физиологического раствора, содержащего [3H] лейцин, (L-4,5 [3H] лейцин 130 Ки/ммоль), либо [3H] гидролизат белка в концентрации 0,1 мКи/мл. После 2-часовой инкубации ганглий отмывали, экстрагировали водорастворимые белки, которые подвергали диск-электрофорезу в 7,5%-ном ПААГ в системе Орнштейна-Дэвиса [11]. Электрофорез проводили в вертикальных пластинах, одновременно анализируя 5 опытных и 4 контрольных образцов. В карман для анализа наносили по 200 мкг белка. После окончания электрофореза гели фиксировали и окрашивали амидочерным 10Б («Reanal», Венгрия). Сканирование проводили на денситометре Scan-40 («Mithras», Англия). После сканирования гели разрезали на фрагменты, которые растворяли в 0,5 мл 30%-ной H_2O_2 при t 50° в течение ночи, затем во все флаконы добавляли по 10 мл сцинтиллятора Брея (РРО—4 г, РРОР—0,2 г, нафталин 60 г, метанол 100 мл, диоксан 800 мл).

Результаты и обсуждение

При исследовании методом диск-электрофореза водорастворимых белков ЦНС виноградной улитки у животных, подвергнутых как ассоциативному (сочетанное), так и неассоциативному (несочетанное нанесение стимулов) обучению обнаружили резкое увеличение количества кислого белка R_f 0,58 на ранних стадиях обучения. При этом ассоциативное обучение в среднем сопровождалось более высоким ростом количества этого белка, по сравнению с неассоциативным, в то время как неассоциативное харак-

теризовалось большей дисперсией (то есть большим разбросом абсолютных значений) (рис. 1). К 90—120 сочетаниям количество белка с R_f 0,58 возвращалось к контрольному уровню. В остальных белковых фракциях достоверных изменений обнаружено не было. Таким образом, полученное различие между ассоциативным и неассоциативным обучением на ранних стадиях формирования оборонительного рефлекса носило только количественный характер в зоне белков с R_f 0,58.

Для изучения механизмов столь значительного увеличения количества кислого мозгоспецифического белка с R_f 0,58 (фракция 10) нами была проведена серия экспериментов с включением радиоактивного предшест-

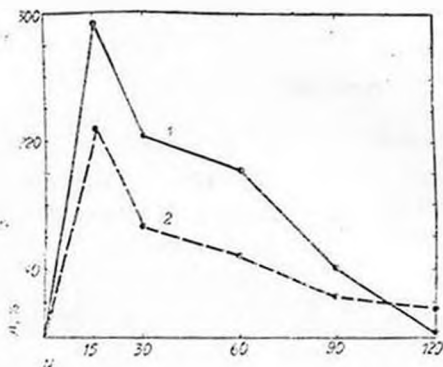


Рис. 1. Диаграмма процентного содержания кислого нейроспецифического белка с R_f 0,58 виноградной улитки на ранних стадиях обучения. 1—ассоциативное обучение, 2—неассоциативное обучение. По оси абсцисс—число сочетанных стимулов, по оси ординат—содержание белка в процентах по отношению к контролю, принятому за 100%; $p < 0,05$

венника на разных стадиях обучения, сразу после обучения и спустя 7 и 24 ч после обучения. При сопоставлении оптического и радиоактивного профилей водорастворимых белков ЦНС виноградной улитки, получивших 15 сочетанных воздействий, обнаружено, что белок фракции 10, количество которого резко возрастало при обучении, является относительно медленно обменивающимся, его количественный и интенсивный рост (на 200—400%) не сопровождался интенсификацией включения метки в расчете на 1 мг белка (рис. 2).

При дальнейшем увеличении количества сочетаний (30—60) наблюдалась тенденция к снижению включения метки и падению уровня включения ниже контрольного (рис. 3). Анализ оптических и радиоактивных профилей спустя 7 и 24 ч после обучения (30 и 120 сочетаний) также не показал увеличения включения метки в эту фракцию (рис. 4).

На всех этапах обучения отмечался рост включения метки в белковые фракции кислых низкомолекулярных белков: во фракцию 12—на 50%, а 13—на 200% относительно контрольного уровня. Особенно ярко этот эффект был выражен при инкубации ганглия сразу после обучения: через 7 и 24 ч уровень включения меченого предшественника остается достаточно высоким (рис. 3, 4).

В других фракциях изменения были не так сильно выражены: в зонах высокомолекулярных белков, где не происходит четкого разделения и суммируются эффекты, имеющие разнонаправленный характер, уровень включения оставался близким к контрольному. Спустя 7 и 24 ч после обу-

чения наблюдалось увеличение числа фракций (№ 4, 7—10), в которые включение метки оказывалось ниже контрольного.

Таким образом, можно заключить, что динамика белкового обмена у виноградной улитки на разных этапах обучения характеризуется достаточно сложной картиной. Интенсивность включения метки широко изменяется от фракции к фракции и претерпевает существенные изменения при активной функциональной нагрузке. На ранних стадиях обучения наблюдается интенсивное увеличение включения метки во фракциях 12 и

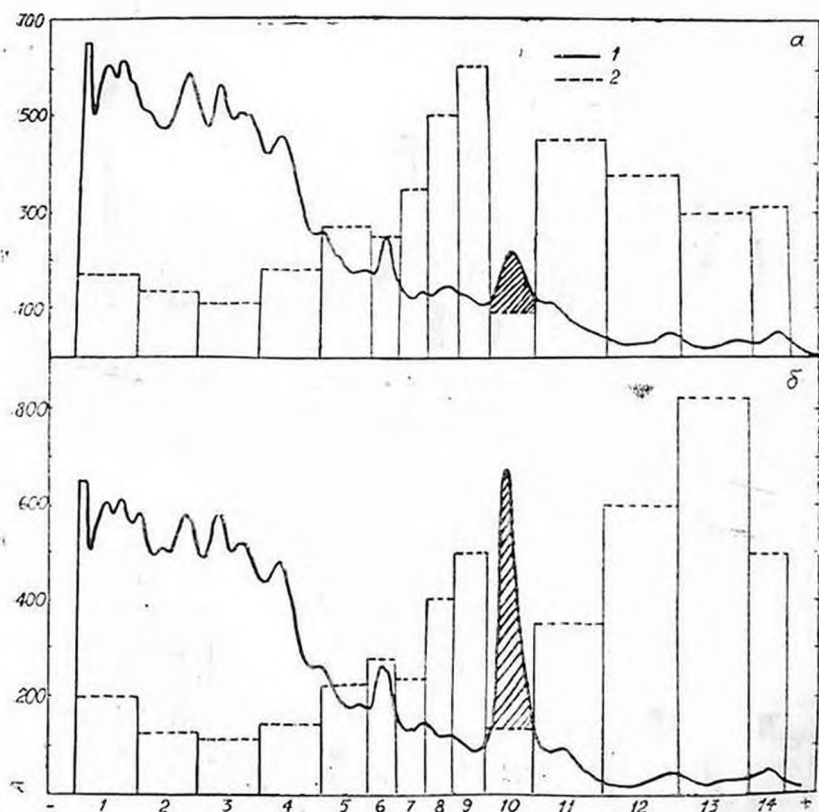


Рис. 2. Диск-электрофорез водорастворимых белков ЦНС виноградной улитки в 7,5%-ном ПААГ, в контроле (а) и после обучения (30 сочетаний) (б). 1—оптический профиль, 2—профиль радиоактивности. По оси абсцисс—номера фракций. По оси ординат—радиоактивность (А) в имп/мин/мкг белка

13, не сопровождающееся достоверным ростом их количества. В используемой нами системе электрофореза в этих фракциях наибольшей подвижностью отличаются кислые низкомолекулярные белки, преимущественно мозгоспецифические. Таким образом, вероятнее всего, эти белки, подвергаясь дальнейшему гидролизу, выполняют модуляторную роль в функционировании ЦНС и, являясь низкомолекулярными, в дальнейшем не реги-

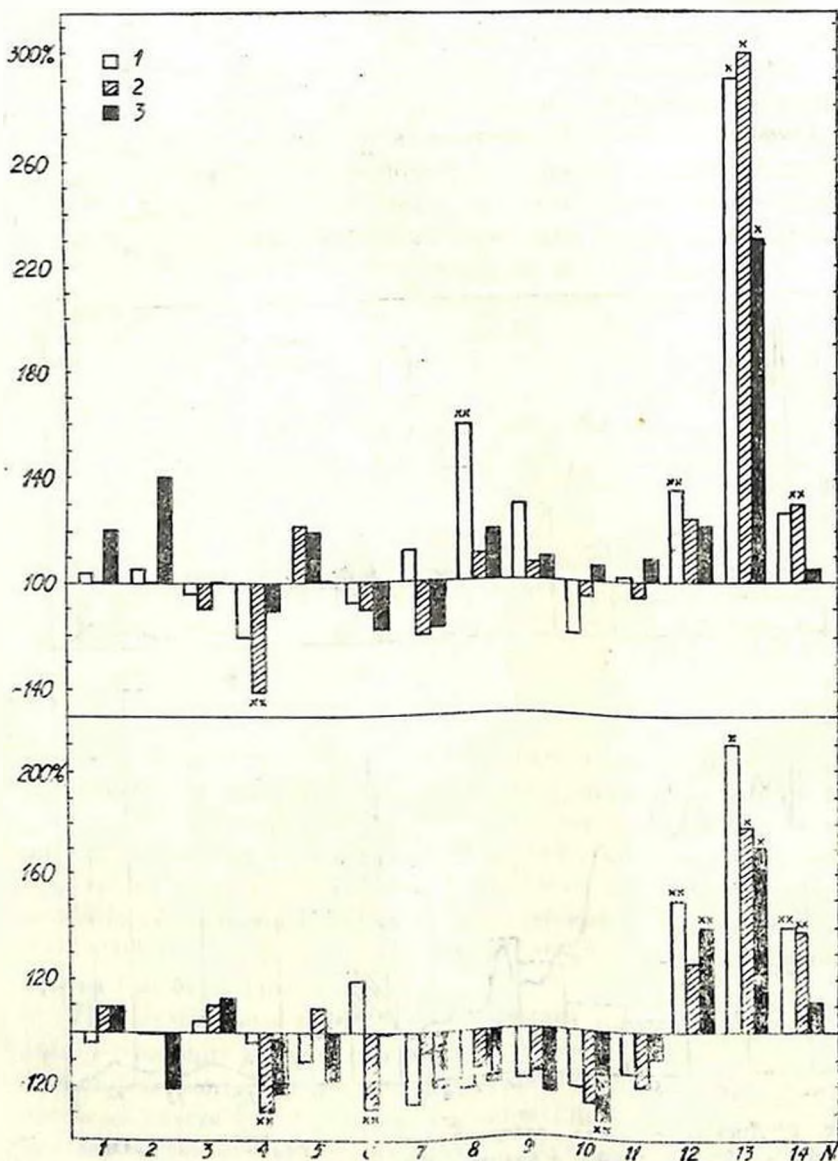


Рис. 3. Диаграммы включения радиоактивного предшественника ($[^3\text{H}]$ лейцина) в белковые фракции обученных улиток относительно контрольных через 30 мин после обучения: 1—обучение, 15 сочетаний, $p=5$; 2—30 сочетаний, $p=9$; 3—60 сочетаний, $p=7$. Здесь и на рис. 4, по оси абсцисс №№ фракций, по оси ординат—изменение включения метки в % по отношению к контролю. Контроль принят за 100%. * $p<0,01$; ** $p<0,05$ (по отношению к контролю)

Рис. 4. Диаграмма включения радиоактивного предшественника ($[^3\text{H}]$ гидролизат белка) в белковые фракции обученных улиток относительно контрольных: 1—30 сочетаний через 7 ч после обучения, $p=9$; 2—120 сочетаний через 7 ч после обучения, $p=8$; 3—120 сочетаний через 24 ч после обучения, $p=8$

стрируются используемой системой детекции. Незначительное угнетение включения метки во фракции менее подвижных белков свидетельствует о сложных перестройках ЦНС, подвергнутой активной функциональной нагрузке [10].

Резкое увеличение количества мозгоспецифического белка с R_f 0,58 (10-я фракция) не сопровождается изменением интенсивности включения метки. Таким образом, увеличение его содержания в цитоплазме не может быть объяснено увеличением скорости синтеза. Среди возможных причин этого феномена можно предположить выход белка из мембранных или иных клеточных структур, процессинг медленно обновляющегося предшественника, распад на активные субъединицы крупного структурного белка и некоторые другие посттрансляционные изменения.

Принимая во внимание тот факт, что ранние стадии обучения характеризуются ростом возбудимости нейронов, нельзя исключить возможность аналогии описываемого белка каталитической субъединице протеникиназы, выходящей из мембраны в цитоплазму после взаимодействия с сАМР ее регуляторной субъединицы [12]. По современным представлениям, фосфорилирование белков K^+ -каналов посредством протеникиназ может обеспечивать пластичность рефлексов.

Методом микроколоночной гель-фильтрации на сефадексе G-75 было установлено, что нативный белок с R_f 0,58 имеет M_r 44 кД, что близко величине M_r актина (43 кД), который при обучении может деконденсироваться из комплекса с тубулином.

В настоящее время показано, что при долговременном обучении модифицируются те же синапсы и K^+ -каналы, что и при краткосрочном [12]. Однако для длительного поддержания их в этом состоянии необходим синтез макромолекул [13, 14]. В связи с этим Kandel и Shwartz предположили возможность синтеза новых регуляторных субъединиц протеникиназы с высокой константой связывания сАМР [12]. Однако Greenberg и соавт., проверяя эту гипотезу на LE сенсорных нейронах аплзии при долговременном обучении, не обнаружили синтеза новых регуляторных субъединиц протеникиназы, а показали уменьшение количества R-субъединиц по отношению к каталитическим. При этом не исключена вероятность усиления синтеза специфических протеаз либо инициации синтеза репрессора генов регуляторных субъединиц [15].

Таким образом, можно полагать, что наиболее кислые нейроспецифические белки (фракции 13 и 14), синтез которых увеличивается при обучении и сохраняется на высоком уровне длительное время, а затем остается повышенным в отдельных командных нейронах оборонительного рефлекса могут претендовать на роль посредников «обучения» с генетическим аппаратом нервных клеток.

Ранние стадии обучения у моллюсков характеризуются генерализованной реакцией всей НС, увеличивается возбудимость основной массы нейронов. Ассоциативное обучение отличается от неассоциативного только количественной величиной эффекта как на мембранном [5] (пластичность K^+ -каналов), так и на изученном нами цитоплазматическом уровне.

Количество белка с R_f 0,58, резко повышенное в цитоплазме на ранних стадиях формирования рефлекса, при его закреплении возвращается к контрольному уровню. Исходя из этого, нами было высказано предположение о причинно-следственной связи увеличения количества этого белка в цитоплазме с ростом возбудимости нейрона и ориентировочным поведением. В пользу предположения о количественном перераспределении белка с R_f 0,58 между мембраной и водорастворимой фракцией свидетельствуют предварительные данные о наличии этого белка в мембранной фракции (метод иммуноферментного анализа), низкая скорость обмена, отсутствие увеличения интенсивности включения меченого предшественника при значительном росте количества. Таким образом, ранние стадии формирования как ассоциативного, так и неассоциативного поведения имеют общий компонент, который, вероятно, является необходимым условием формирования условной связи. Наиболее кислые нейроспецифические белки (фракции 12 и 13), уровень синтеза которых остается повышенным при долговременном обучении и сохраняется в отдельных командных нейронах оборонительного рефлекса при закреплении связи [9], являются более вероятными кандидатами на роль факторов, «кодирующих» память.

Для выяснения роли генома в формировании оборонительного рефлекса и поиска генов, экспрессия которых увеличивается в процессе обучения, у виноградной улитки *Helix pomatia* нами выделена высокомолекулярная ДНК и на основе вектора ЕМБЛ-3А создана библиотека генов.

Дальнейшее изучение физико-химических характеристик, внутриклеточной локализации и генной экспрессии этих белков будет способствовать выяснению их роли в функционировании метаболического аппарата нервной клетки и пластических перестройках при обучении.

THE INCORPORATION OF LABELED PRECURSORS INTO PROTEINS OF THE SNAIL CENTRAL NERVOUS SYSTEM DURING LEARNING

GRINKEVICH L. N.

Institute of Automation and Electrometry, Siberian Division USSR
Academy of Sciences, Novosibirsk

We studied the incorporation of [3 H]-leucine into water-soluble proteins of the CNS of *Helix pomatia* at early stages of the formation of the conditioned defense reflex. Disc electrophoresis in polyacrylamide gel demonstrated an intensive increase in the amount of the acidic neurospecific proteins having mobility of 0.58 (by 200—400%) as compared with the control. The total incorporation of the labeled precursor expressed as counts/min per mg protein was not increased. The observed effect can either be due to posttranslational modifications of the precursor protein, or to its release into the cytoplasm from cell organelles during learning. It is proposed that the increased level of this

protein in the cytoplasm is associated with the increased excitability of the soma and orientation behavior, which is a necessary prerequisite for the formation of the conditioned reflex. In addition, we observed an increased label incorporation into two extremely acidic protein fractions at all studied learning stages. The label incorporation into proteins with the mobility below 0.5 was somewhat inhibited 7—24 hours after learning.

ЛИТЕРАТУРА

1. Литвинов Е. Г., Максимова О. А., Балабан П. М., Масиновский В. П. Журн. высш. нервн. деят-сти, т. 27, вып. 1, с. 203—206, 1976.
2. Литвинов Е. Г., Логунов Д. Б. Журн. высш. нервн. деят-сти, т. 29, вып. 2, с. 284—293, 1979.
3. Максимова О. А., Балабан П. М. Нейронные механизмы пластичности поведения. М., Наука, 1983.
4. Пирюзян А. А., Максимова О. А., Балабан П. М. Докл. АН СССР, т. 270, № 3, с. 751—754, 1983.
5. Kandel E. R., Abrams T., Bernier L., Carew T. J., Hawkins R. D. Molecular neurobiology, v. 48, p. 821—830, 1983.
6. Зубова Т. Г., Крылова А. А., Соколов Е. Н. Журн. высш. нервн. деят-сти, т. 31, вып. 6, с. 1263—1269, 1981.
7. Элкон Д. А. В мире науки, № 9, с. 34—45, 1983.
8. Farley J., Auerbach S. Nature, v. 319, p. 220—224, 1986.
9. Гринкевич Л. Н., Сафронова О. Г., Штарк М. Б. Бюл. эксперим. биол. и мед., № 10, с. 429—431, 1984.
10. Гринкевич Л. Н. Докл. АН СССР, т. 252, с. 248—250, 1980.
11. Shtark M. B., Grinkevich L. N., Deriy B. N., Zapara T. A., Tretyakov V. P. Neuronal plasticity and memory formation, N.-Y., Raven Press, 1982.
12. Kandel E. R., Schwartz J. M. Science, v. 218, p. 433—443, 1982.
13. Montarolo P. G., Golet P., Castellucci V. F., Morgan J., Kandel E. R., Schacher S. Science, v. 23, p. 1249—1254, 1986.
14. Golet P., Castellucci V. F., Schacher S. S., Kandel E. R. Nature, v. 322, p. 419—422, 1986.
15. Greenberg S. M., Castellucci V. F., Baurley H., Shwartz J. H. Nature, v. 329, p. 62—65, 1987.

Поступила 1. VII 1988.



УДК 612.825.1:577.175.822:577.122

ВЛИЯНИЕ АЦЕТИЛХОЛИНА НА ВКЛЮЧЕНИЕ $[^3\text{H}]$ ЛЕЙЦИНА
В БЕЛКИ СРЕЗОВ КОРЫ МОЗГА КРЫСЫ

АРУТЮНЯН Д. А., МАНУКЯН К. Г.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Изучено влияние разных доз АХ— 10^{-2} — 10^{-7} М на включение L-[4, 5- ^3H]лейцина в суммарные белки и белки протеолипидов (ПЛ) срезов коры мозга крысы. Показано, что АХ в концентрации 10^{-2} М подавляет включение лейцина в белки ПЛ на 45% и в суммарные белки—на 40%. С уменьшением концентрации АХ до 10^{-5} М его ингибирующее влияние на включение лейцина в суммарные белки почти не менялось (44%), а в белки ПЛ заметно снижалось—до 18%. АХ в концентрации 10^{-6} — 10^{-7} М не оказывал статистически достоверного эффекта. Блокирование рецепторов АХ специфическими мускариновыми (атропин— 10^{-6} М) и никотиновыми (синаменсин— $5 \cdot 10^{-7}$ и тубокурарин— 10^{-4} М) антагонистами снимало ингибирующее действие АХ ($5 \cdot 10^{-5}$ М). Сами антагонисты не влияли на включение лейцина в белки. Высказывается предположение, что эффект АХ опосредован через холинорецептор.

В настоящее время показано, что нейромедиаторы, наряду со своей основной функцией в НС—участием в процессах синаптической передачи, могут также влиять на метаболическую активность нервной ткани, в частности на скорость синтеза белка на уровне экспрессии генов [1]. Изучение влияния различных нейрoактивных веществ на процессы синтеза белка в нервной ткани *in vivo* и *in vitro* выявило разнонаправленность оказываемых эффектов. Кислые аминокислоты—глутамат, аспартат, dl-гомоцистеат, имеющие *in vivo* возбуждающий эффект на НС, ингибировали синтез белка в срезах коры мозга пропорционально их возбуждающему эффекту [2]. Нейромедиаторы—норадреналин, дофамин, серотонин, оказывающие в основном тормозное действие, также ингибировали синтез белка в опытах как *in vivo*, так и *in vitro* [3—5]. Исключением составлял ГАМК, которая стимулировала рибосомный синтез [6, 7].

В ряде работ исследовалось влияние АХ и холинергических соединений на интенсивность синтеза РНК и белков в нервной ткани [4, 5, 8, 9]. Полученные факты свидетельствуют об определенном влиянии АХ на эти процессы, но имеется некоторое несоответствие как в отношении эффектов *in vivo* и *in vitro*, так и воздействия в сходных экспериментальных условиях, так что вопрос нуждается в дальнейшем изучении. Целью настоя-

шей работы было исследование на срезах коры мозга влияния разных доз АХ и блокаторов ацетилхолиновых рецепторов на включение [^3H]лейцина в суммарные белки и белки ПЛ, являющихся представителями типично мембранных белков и интегральными компонентами клеточных мембран нервной ткани.

Материалы и методы

Опыты проводили на белых беспородных крысах массой 130—150 г. Большие полушария мозга очищали от оболочек и готовили срезы толщиной 0,3—0,5 мм. Для воспроизводимости результатов срезы одного полушария каждого мозга брали в контрольную пробу, другого в опытную. В инкубационный сосуд помещали до 200 мг срезов. Инкубацию проводили в 4 мл Кребс-бикарбонатного буфера [10], рН которого был доведен до 7,4 пропусканием газовой смеси: 95% O_2 + 5% CO_2 . Пробы инкубировали при 37° в токе той же газовой смеси на качалке в течение 2 ч. После 10 мин преинкубации добавляли L-[4, 5- ^3H]лейцин (У. А. 250 мКи/ммоль, «Amersham», Англия) в конечной концентрации 1 мКи/мл, а к опытным пробам также 10^{-3} М эсерин сульфата («Sigma», США) и ацетилхолин хлорид («Sigma», США) в требуемой концентрации. В опытах с блокированием холинорецепторов добавляли атропин сульфат— 10^{-5} М («Merck», Швейцария), сияменсин— $5 \cdot 10^{-7}$ М (нейротоксин, выделенный из яда тайландской кобры *Naja naja siamensis* [11]), тубокурарин— 10^{-4} М («Serva», ФРГ) отдельно или вместе с АХ— $5 \cdot 10^{-5}$ М. Инкубацию останавливали добавлением 10 мл холодного буфера. Срезы промывали буфером и 1 мМ раствором лейцина, гомогенизировали в 20-кратном объеме смеси хлороформ-метанол 2:1 по методу Folch и соавт. [12], оставляли 60 мин при комнатной температуре, затем фильтровали через стеклянный фильтр № 2. Осадок на фильтре промывали той же смесью и высушивали на воздухе, для определения суммарных белков часть осадка гомогенизировали в 0,6 н. NaOH и инкубировали при 37° 18 ч. Брали равные объемы раствора на определение белка и счет радиоактивности. Белок определяли по методу Hess, Lewin [13].

Липидные экстракты, содержащие ПЛ, отмывали на ледяной бане 0,2 объемами дистиллированной воды, затем смесью хлороформ-метанол-вода (3:48:47). Промытую хлороформную фазу выпаривали под вакуумом после добавления половины от имеющегося объема хлороформа. Осадок растворяли в смеси хлороформ-метанол-вода (86:14:1) и осаждали ПЛ 8-кратным объемом смеси спирт-эфир (3:2). Осаждение проводили при —30° в течение 4 ч. Осадок после центрифугирования промывали таким же объемом смеси спирт-эфир (1:1) при 23° для удаления липидов.

Полученные очищенные ПЛ (ОПЛ) растворяли в смеси хлороформ-метанол-вода (86:14:1) и брали пробы на определение белка и счет радиоактивности. ПЛ солиubilизировали 0,5 М протозолом («New England Nuclear», США), добавляли сцинтилляционную жидкость Брея [14] и измеряли распады в минуту на жидкостном сцинтилляционном счетчике

SL-30 «Intertechnique» (Франция) с внешним стандартом. Белок ПЛ определяли по методу. Lees, Rahman [15]. Рассчитывали величину У. А. в расп/мин/мг белка.

Результаты исследования

АХ почти во всем исследованном диапазоне концентраций подавляла включение $[^3\text{H}]$ лейцина в белки коры мозга (табл. 1). Высокие концентрации АХ— 10^{-2} М вызывали значительное угнетение включения $[^3\text{H}]$ лейцина в суммарные белки (на 40%), и в белки ПЛ (на 45%). При снижении концентрации АХ до 10^{-5} М его ингибирующее влияние на

Таблица 1

Влияние разных концентраций АХ на включение $[^3\text{H}]$ лейцина в суммарные белки и белки протеолизидов (ПЛ) срезов коры мозга (У. А. белков в % от уровня в контроле)

Белки	Концентрация АХ (М)					
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
Суммарные белки	60 ± 5 (10)	63 ± 5 (3)	59 ± 6 (3)	56 ± 12 (4)	120 (2)	89 (2)
Белки ПЛ	55 ± 5 (11)	77 ± 6 (3)	74 ± 3 (3)	82 ± 8 (4)	116 (2)	80 (2)

включение лейцина в белки ПЛ заметно снижалось (до 18%), а в суммарные белки почти не менялось, оставаясь на том же уровне (44%). Добавление к срезам 10^{-6} , 10^{-7} М АХ не оказывало статистически достоверного эффекта.

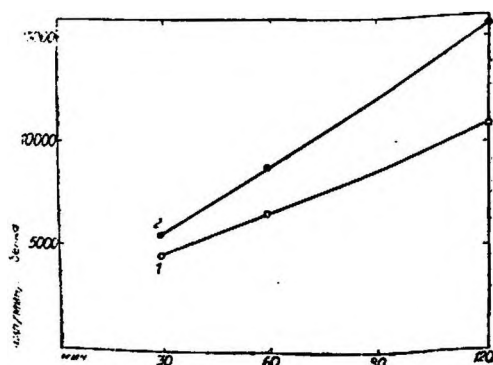


Рис. Влияние АХ на включение $[^3\text{H}]$ лейцина в суммарные белки срезов коры мозга крыс в зависимости от времени. 1 — пробы, содержащие 10^{-5} М АХ, 10^{-3} М эзерин сульфата и 1 мкКи/мл $[^3\text{H}]$ лейцина. 2 — контрольные пробы; инкубационной среде отсутствуют АХ и эзерин сульфат

В дальнейшем использовали 10^{-5} М концентрацию АХ, которая наиболее близка к физиологическим концентрациям этого медиатора в ткани мозга. Ингибитор АХЭ — эзеринсульфат в примененной концентрации (10^{-3} М) не влиял на включение лейцина в белки.

Изучали временную зависимость эффекта АХ на включение $[^3\text{H}]$ лейцина в суммарные белки коры мозга. Установили, что ингибирующее влия-

ние АХ линейно возрастает в исследованном промежутке времени (рисунок). Так, после 30 мин инкубации с АХ он подавлял включение лейцина в суммарные белки на 19% по сравнению с контролем, после 60 мин на 35%, а через 120 мин уровень ингибиции достигал 51%.

Для исследования механизмов ингибирующего влияния АХ на включение аминокислот в белки, изучали его эффект на фоне блокирования мускариновых и никотиновых холинорецепторов.

Таблица 2

Влияние антагонистов АХ на включение [^3H]лейцина в суммарные белки и белки протеолипидов (ПЛ) срезов коры мозга
и на эффект АХ

Антагонист	Концентрация, М	У. А. в % от контроля	
		Суммарные белки	Белки ПЛ
Атропин	10^{-6}	110 ± 11 (4)	110 ± 17 (3)
Атропин + $5 \cdot 10^{-5}$ М АХ	10^{-6}	102 ± 9 (5)	94 ± 11 (6)
Сианенсин	$5 \cdot 10^{-7}$	115 ± 3 (3)	106 ± 9 (3)
Сианенсин + $5 \cdot 10^{-5}$ М АХ	$5 \cdot 10^{-7}$	97 ± 7 (2)	106 ± 10 (3)
Тубокурарин	10^{-4}	92 ± 2 (3)	105 ± 3 (3)
Тубокурарин + $5 \cdot 10^{-5}$ М АХ	10^{-4}	—	119 ± 2 (3)

Антагонист мускариновых рецепторов—атропин в концентрации 10^{-6} М не влиял на включение [^3H]лейцина в суммарные белки и белки ПЛ, а при одновременном добавлении с АХ ($5 \cdot 10^{-5}$ М) полностью снимал его ингибирующий эффект (табл. 2). Хотя в коре мозга преобладают холинорецепторы мускаринового типа, специфические никотиновые антагонисты: сианенсин ($5 \cdot 10^{-7}$ М [16]) и d-тубокурарин (10^{-4} М) оказывали сходный с атропином эффект. Сами по себе они не влияли на включение лейцина в белки, а при одновременном добавлении с АХ снимали его подавляющее действие (табл. 2).

Обсуждение результатов

Представленные экспериментальные данные свидетельствуют об ингибирующем влиянии АХ на синтез белка в нервной ткани при концентрациях 10^{-2} — 10^{-5} М в условиях *in vitro*. Подобный эффект, но выраженный слабее, наблюдали на срезах мозга Тихонов и соавт. [5] при концентрациях АХ порядка 10^{-3} М. Демин, Рубинская [8] в опытах *in vivo* при повышении уровня эндогенного АХ под влиянием ингибитора АХЭ армина обнаружили кратковременное преходящее снижение РНК в мотонейронах спинного мозга и стойкое уменьшение концентрации РНК в глияльных клетках сателлитов. Другие авторы, наоборот, отмечают опре-

деленное усиление синтеза белка в мозговой ткани *in vivo* при введении ингибиторов АХЭ или холиномиметика ареколина [4]. Такие же противоположные эффекты в отношении влияния АХ в опытах *in vivo* и *in vitro* были получены и при исследовании активности Na^+ , K^+ -АТФазы [9, 17, 18]. По-видимому, эффект АХ на синтез белка зависит от многих неизвестных пока факторов.

Примененная в наших опытах концентрация АХ— 10^{-5} М равна приблизительно вычисленной концентрации медиатора в цитоплазме нервных клеток мозга крысы [19]. При этой физиологической концентрации АХ тормозил в большей степени включение аминокислот в суммарные белки коры мозга, тогда как эффект на включение в белки ПЛ был значительно слабее. В связи с тем, что белки ПЛ характеризуются сравнительно низкой скоростью обновления, не исключено, что эффект АХ сильнее выражен в отношении какой-то метаболически более активной фракции суммарных белков. С другой стороны, поскольку срезы коры мозга не подвергались дальнейшему субфракционированию, определенную долю исследованных ПЛ составляли более инертные в метаболическом отношении ПЛ миелина. Возможно, что при раздельном изучении субклеточных фракций выявятся различия в эффекте АХ на синтез белка ПЛ в разных субклеточных образованиях.

Можно предположить, что эффект АХ на включение лейцина в белки коры мозга является медиаторным по своей природе и проявляется на уровне рецепторов как мускаринового, так и никотинового типа. Вероятно, он реализуется через взаимодействие АХ с рецепторами на клеточной мембране, что, по-видимому, приводит к изменению синтеза циклических нуклеотидов или ионного состава клетки. Этим, вероятно, и объясняется неспецифичность выявленного эффекта к одному типу холинорецепторов. Об опосредованном через рецепторы влиянии нейромедиаторов на процессы синтеза белка в нервной ткани свидетельствуют и данные других авторов [3, 4].

Приносим свою благодарность доктору Э. Карлссону (Институт биохимии Уппсальского университета) за любезное предоставление препарата синаменсина.

THE EFFECT OF ACETYLCHOLINE ON THE INCORPORATION OF ^3H -LEUCINE INTO PROTEINS OF RAT CEREBRAL CORTEX SLICES

ARUTYUNYAN D. L., MANUKYAN K. H.

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Armenian SSR, Yerevan

We studied the effect of various doses of acetylcholine (ACh) (10^{-2} — 10^{-7} M) on the incorporation of L-[4,5- ^3H]-leucine in total protein and proteolipids of rat brain cortex slices. ACh in concentration of 10^{-2} M inhibits the incorporation of leucine into proteins of proteolipids by 45% and into total proteins by 40%. As ACh concentration

was decreased down to 10^{-5} its inhibitory effect on the incorporation of leucine into total proteins showed almost no changes, whereas the effect of incorporation into proteins of proteolipids markedly decreased down to 18%. ACh in concentrations of 10^{-6} — 10^{-7} M showed no statistically significant effect. The inhibition of the ACh receptor using specific antagonists of muscarinic (atropine 10^{-6} M) and nicotinic (siamensin $5 \cdot 10^{-7}$ M and d-tubocurarine 10^{-4} M) antagonists abolished the inhibitory effect of ACh (5×10^{-5} M). The antagonists alone showed no effect on leucine incorporation into proteins. It is proposed that the observed effect of ACh is mediated through the cholinergic receptor.

ЛИТЕРАТУРА

1. Schmitt F. O., Dev P., Smith B. H. Science, v. 193, p. 114—120, 1976.
2. Orrego F., Lipman F. J. Biol. Chem., v. 242, p. 665—671, 1967.
3. Weiss B. F., Liebschutz J. L., Wurtman R. J., Munro H. N. J. Neurochem., v. 24, p. 1191—1195, 1975.
4. Еласв Н. Р. Докл. АН СССР, т. 216, с. 452—454, 1974.
5. Тихонов В. Х., Валсв Р. М., Мяснцев А. Н. Укр. біохім журн., т. 45, с. 271—275, 1973.
6. Goertz B. Exp. Brain Res., v. 34, p. 365—372, 1979.
7. Lipton P., Heimbach C. J. J. Neurochem., v. 31, p. 1299—1307, 1978.
8. Демин Н. Н., Рубинская Н. Л. Изв. АН СССР, Сер. биол., 3, с. 426—434, 1972.
9. Еласв Н. Р. Биохимия, т. 45, с. 1749—1754, 1980.
10. Умбрейт В. В., Буррис Р. Х., Штауффер Дж. Ф.—В кн.: Манометрические методы изучения тканевого обмена, с. 49, М., ИЛ, 1951.
11. Karlson E., Arnberg H., Eaker D. Eur. J. Biochem., v. 21, p. 1—17, 1971.
12. Folch J., Lees M. B., Sloane-Stanley G. H. J. Biol. Chem., v. 226, p. 497—509, 1957.
13. Hess H. H., Lewin E. J. J. Neurochem., v. 12, p. 205—211, 1965.
14. Bray G. A. Anal. Chem., v. 1, p. 279—285, 1960.
15. Lees M. B., Paxman S. Anal. Biochem., v. 47, p. 184—192, 1972.
16. Eaker D., Harris J. B., Thesleff S. Eur. J. of Pharmacology, v. 15, p. 254—256 1971.
17. Еласв Н. Р., Семснв Е. В. Биохимия, т. 39, с. 639—640, 1974.
18. Болдырев А. А., Твсрдислав В. А. Итоги науки и техники, Биофизика, т. 10, ВИНТИ, М., 1978.
19. Hanin J., Massarelli R., Costa E.—In: Drugs and cholinergic mechanisms in the CNS, p. 145—264, Stokholm, 1970.

Поступила 4. VI 1988



УДК 612.571.1

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ БЕЛКОВ, СИНТЕЗИРОВАННЫХ *IN VITRO* ЯДРАМИ НЕЙРОНОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА. С АНАЛОГИЧНЫМИ БЕЛКАМИ ДРУГИХ ТКАНЕЙ

САИТМУРАТОВА О. Х.

Институт биоорганической химии им. А. А. Садыкова, АН УзССР, Ташкент

Проведено сравнительное изучение гликопротеинов, синтезированных *in vitro* ядрами нейронов головного мозга, с белками печени и тимуса кроликов. Показано, что, несмотря на близость величин M_r , синтезированные в ядрах нейронов мозга *in vitro* белки отличаются от белков печени и тимуса по содержанию нейтральных сахаров, величиной У. А. синтеза, воздействием на двигательную активность животных и по динамике антителообразования у животных, иммунизированных этими гликопротеинами.

Включение [^{14}C] аминокислот в изолированные клеточные ядра головного мозга и различных тканей животных [1—9] свидетельствует об автономном синтезе белка и всех необходимых для него компонентов в ядрах [8, 10, 11]. Ядра клеток Hela, ядрышки печени крыс и изолированный хроматин синтезируют белок *in vitro* [1, 6, 8]. Laval, Moule [6] выделяли белки, синтезированные фракцией «ядра-ядрышки» *in vitro* из [^{14}C]аминокислот. При этом радиоактивность распределялась вдоль всей полипептидной цепи. Матинян, Уманский [8], используя в качестве матрицы изолированный хроматин печени крыс, доказали возможность синтеза *in vitro* белков с M_r 6 кД. Однако экспериментальные доказательства белкового синтеза в ядрах различного происхождения не дают представления о природе, органоспецифичности и функции этих белков.

Цель настоящей работы—сравнительное исследование белков, синтезируемых ядрами нейронов головного мозга, с белками, синтезируемыми ядрами клеток печени и тимуса.

Материалы и методы

В опытах использовали кроликов от одного помета по 3—4 животных на опыт (всего 33 животных).

После декапитации животных ткани мозга, тимуса и печени сразу отделяли и ополаскивали холодным раствором 0,9% NaCl.

Выделение ядер из нейронов проводили по Lovtrup-Rein [4] с тем

лишь отличием, что сначала микродиссекцией отделяли серое вещество, нейрональные клетки головного мозга от глияльных клеток и вручную гомогенизировали в холодном растворе 0,32 М сахарозы (1 г/3 мл раствора), содержащей 3 мМ $MgCl_2$ и 1 мМ K_2HPO_4 , pH 7,4, затем гомогенат фильтровали и центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин. Остальные процедуры выполняли согласно Lovtrup-Rein [4]. Ядра выделяли в градиенте плотности сахарозы, используя ультрацентрифугу «Beckman» (США), ротор SW-27, 60 мин при 78000 g.

Выделение клеточных ядер из печени. Печень споласкивали 0,32 М сахарозой, содержащей 3 мМ $MgCl_2$, удаляли соединительную ткань и остаточную массу измельчали ножницами до кашицеобразного состояния. Добавляли 0,32 М сахарозу из расчета 4 мл на 1 г ткани, затем 2—3 мин измельчали на микроизмельчителе. Измельченный материал гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера, а гомогенат фильтровали через два слоя марли и центрифугировали 10 мин при 700 g. Осадок суспендировали в 2,2 М сахарозе и опять гомогенизировали. Гомогенат насливали на 5 мл 2,2 М сахарозы и центрифугировали 1 ч при 78000 g.

Выделение ядер из тимуса. В расчете на 1 г ткани тимуса добавляли 10 мл 0,25 М сахарозы, содержащей 3 мМ $MgCl_2$, 1 мМ K_2HPO_4 и 2—3 мин ткань измельчали на микроизмельчителе. Затем гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера, гомогенат фильтровали через двухслойную марлю и центрифугировали 10 мин при 2500 об/мин. Осадок суспендировали в 20 мл 2,2 М сахарозе и центрифугировали при 5000 об/мин 10—15 мин.

При центрифугировании ядра нейронов головного мозга, печени и тимуса осаждаются на дно пробирки, а обломки клеток и эритроциты собираются в верхнем слое. Полученные ядра еще раз промывали 0,32 М сахарозой и использовали для исследования синтеза белков.

Синтез белка в изолированных ядрах нейронов головного мозга, печени и тимуса изучали в стандартных условиях (по включению [^{14}C]лизина) [12]. Меченые ядерные белки осаждали из инкубационной среды 5%-ным раствором ТХУ. Осадок отделяли центрифугированием (15 мин при 3000 об/мин) и экстрагировали смесью 0,025 М триса и 0,192 М глицинового буфера, pH 8,3. Для обессоливания белков проводили диализ против воды и лиофилизировали.

Гель-фильтрация белков. Величины M_r меченых белков из ядер нейронов головного мозга, печени и тимуса определяли с помощью гель-фильтрации в 0,05 М аммоний-ацетатном буфере, pH 6,06 на колонках (1,1 × 102 см) с сефадексом G-50 (тонкий, «Pharmacia», Швеция), предварительно калиброванных БСА, соевым ингибитором трипсина и цитохромом С («Reanal», Венгрия). Собирали фракции по 4 мл. Образцы по 0,1—0,2 мл просчитывали в жидкостном сцинтилляционном счетчике LS-230 («Beckman», США) в смеси, содержащей 10 мл сцинтилляционной жидкости и 3 мл абсолютного спирта.

Определение нейтральных сахаров. 100 мкг ядерного гликопротеида гидролизovali в 0,5 мл 0,1 н. раствора H_2SO_4 при 80° в течение часа и

после охлаждения добавляли к нему 3 мл 0.1%-ного раствора антрона («Calbiochem», США) в концентрированной серной кислоте. Смесь помещали на 15 мин в кипящую водяную баню. После охлаждения определяли поглощение при 620 нм (калибровочную кривую строили по глюкозе). Содержание белков во фракциях определяли по Lowry и соавт. [13]. Полученные результаты обрабатывали методом вариационной статистики [14].

Действие выделенных электрофоретически гомогенных фракций белков на поведенческие реакции животных определяли по изменению поведенческой активности на приборе «Opto-Wagumax» («Technilab», США), регистрирующем двигательную активность при помощи фотодиодов, расположенных на двух уровнях, что позволяет рассматривать отдельно горизонтальную и вертикальную компоненты двигательной активности.

Для определения физиологической активности исследуемые ядерные белковые фракции вводили внутривентриально в смеси 0,025 М триса и 0,192 М глицинового буфера, pH 8,3, в дозе 200 мкг/кг за 30 мин до начала измерения двигательной активности, которую измеряли в течение 30 мин, то есть с 30 до 60 мин после введения. Контрольным животным вводили воду, буфер или эквивалентное количество БСА. Для получения сыворотки, содержащей антитела к исследуемым гликопротеинам, синтезируемым в ядрах нейрональных клеток и печени, был использован конъюгат суспензии активированной целлюлозы с гликопротеином, выделенным из ядер нейронов мозга и печени. Об интенсивности иммунного ответа судили по реакции пассивной гемагглютинации (РПГА). При перекрестной иммунодиффузии было показано отсутствие специфичности гликопротеинов из ядер нейронов головного мозга по сравнению с гликопротеинами, выделенными из печени, хотя наличие общих детерминантных групп частично и проявлялось.

Белково-целлюлозный комплекс получали конъюгацией гликопротеина из ядер мозга путем 24-часовой инкубации при 4° с активированной суспензией целлюлозы в 0,1 М карбонат-бикарбонатном буфере [22]. Непрореагировавшие гликопротеины удаляли промыванием суспензии физиологическим раствором. Количество иммобилизованного препарата определяли по окрашиванию бромфеноловым синим.

Для иммунизации использовали 10—12 мышей гибридов первого поколения (CBA×C57 BL)-F₁. После однократной иммунизации внутривентриально белково-целлюлозным комплексом наличие антител было показано на 7-й день и достигало максимума на 35-й день, после чего отмечалось снижение интенсивности антителообразования. Характеристику полученной сыворотки проводили методом РПГА.

Результаты и обсуждение

В табл. 1 приведены данные по включению [¹⁴C]лизина в клеточные ядра различных тканей кролика: при одинаковых условиях синтеза белков в ядрах нейронов головного мозга протекает интенсивнее,

чем в ядрах клеток печени и тимуса. Полученные данные хорошо согласуются с имеющимися в литературе [4, 7, 15].

Для сравнительного исследования белков, синтезированных ядрами клеток нейронов головного мозга, печени и тимуса (диализированные и лиофильно высушенные), ядерные белки фракционировали на колонке с сефадексом G-50 в одинаковых условиях. Данные по оптической плотности и радиоактивности фракций элюата представлены на рис. 1.

Таблица 1

Включение [^{14}C]лецина в изолированные ядра клеток различных органов кроликов (n=5)			
Вид ядер	Количество животных	Радиоактивность имп/мин мг ядерного белка	Процент включения
Головной мозг (нейроны)	20	4492 $\pm$ 138	100
Печень	15	2884 $\pm$ 124	64
Тимус	22	892 $\pm$ 121	20

Примечание. Здесь и в табл. 2 различия по сравнению с контролем (нейроны мозга) достоверны, $p < 0,005$.

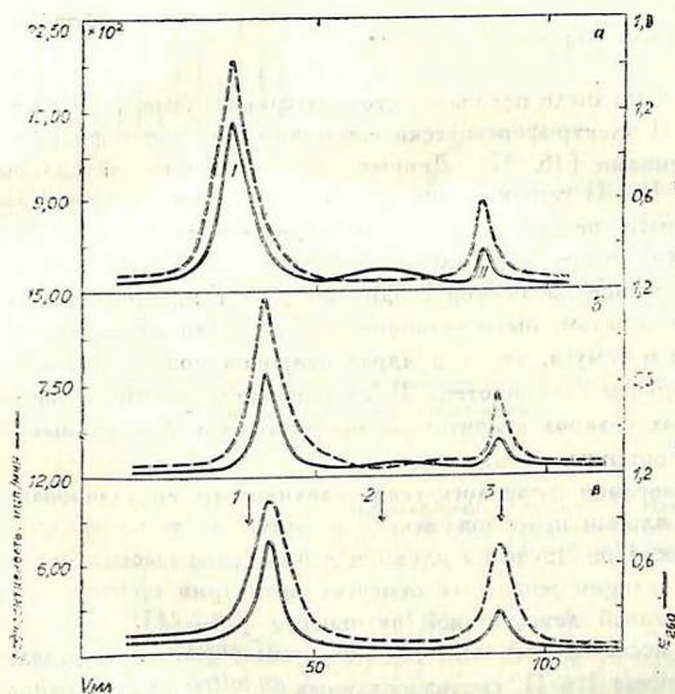


Рис. 1. Гель-фильтрация на сефадексе G-50 белков, синтезированных *in vitro* ядрами клеток различных органов кроликов: а—мозг, б—печень, в—тимус. Маркерные белки: 1—БСА (68 кД), 2—соевый ингибитор трипсина (21 кД), 3—цитохром С (12 кД)

При гель-фильтрации ядерные белки из нейронов головного мозга, печени и тимуса обнаруживают две радиоактивные фракции с M_r 25—

35 (I) и 10—15 (II) кД. По общему количеству фракции I ядерных белков в трех исследованных образцах преобладали над фракциями II. Исследование I и II фракций элюата показало, что пики по оптической плотности и радиоактивности в основном совпадают.

Таким образом, белки, синтезированные *in vitro* ядрами нейронов головного мозга, клеток печени и тимуса кроликов, в основном сходны по величине M_r .

Содержание белков и нейтральных сахаров в синтезированных *in vitro* белковых фракциях ядер различных органов ($n=4$)

Таблица 2

Орган	Гликопротеины	Содержание нейтральных сахаров в % к песу образца белковой фракции	Содержание белков в % к песу образца белковой фракции
Головной мозг (нейроны)	I	$7,0 \pm 1,0$	$26,7 \pm 1,4$
	II	$1,50 \pm 0,49$	$36,0 \pm 1,7$
Печень	I	$3,25 \pm 0,25$	$24,2 \pm 1,7$
	II	$3,0 \pm 0,2$	$8,50 \pm 0,25$
Тимус	I	$8,75 \pm 0,25$	$26,2 \pm 1,3$
	II	$15,50 \pm 0,49$	$32,7 \pm 3,8$

Ранее нами было показано, что синтезированные *in vitro* ядрами нейронов I и II электрофоретически гомогенные белковые фракции являются гликопротеинами [16, 17]. Данные по содержанию нейтральных сахаров в фракции I и II гликопротеинов, синтезированных в ядрах нейронов головного мозга, печени и тимуса, приведены в табл. 2. Содержание нейтральных сахаров во всех ядерных белках колеблется в пределах 1,5—16%, содержание же белков сходно по всем гликопротеинам (26—36%).

Таким образом, было установлено, что белки, синтезированные в ядрах печени и тимуса, как и в ядрах нейронов мозга, являются гликопротеинами, причем гликопротеин II ядерных белков тимуса по содержанию нейтральных сахаров значительно превосходит все остальные исследованные гликопротеины.

Исследования физиологической активности синтезированных гликопротеинов ядрами нейронов, печени и тимуса *in vitro* представляют особый интерес. При изучении влияния нейроспецифических белков на поведенческие реакции животных отмечена активация ориентировочных реакций, спонтанной двигательной активности [18—21].

Нами исследовалось действие как суммарных, так и отдельно взятых гликопротеинов I и II, синтезированных *in vitro* ядрами нейронов головного мозга, печени и тимуса кроликов на одном из широко применяемых интегральных поведенческих показателей—вертикальной двигательной активности животных.

На рис. 2 представлена динамика изменения вертикальной двигательной активности в интервале от 30 до 60 мин после введения гликопротеи-

нов. Введение БСА не приводило к изменениям двигательной активности по сравнению с теми животными, которым инъецировали физиологический раствор. Выделенные из мозга гликопротеины обладали наиболее умеренным действием на двигательную активность из всего ряда исследованных гликопротеинов (рис. 3, а). Наиболее активное возбуждающее действие оказывали гликопротеины ядер печени и тимуса (суммарные гликопро-

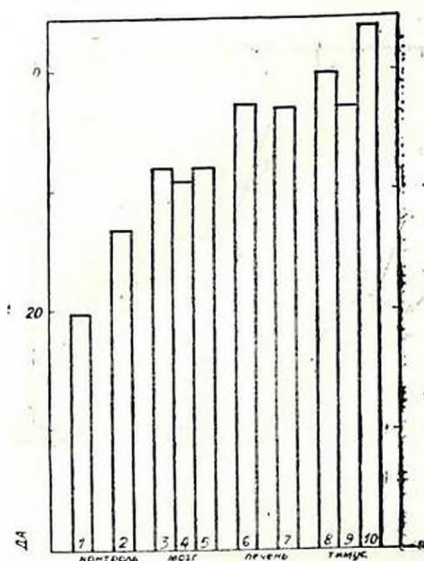


Рис. 2. Изменение динамики вертикальной двигательной активности (ДА) животных под действием гликопротеинов, синтезированных *in vitro* ядрами клеток кроликов: 1—контроль, H_2O ; 2—контроль, буфер; 3, 6, 8—суммарная фракция белков; 4, 9—I фракция гликопротеинов; 5, 7, 10—II фракция гликопротеинов

теины и отдельно фракции I и II, рис. 3, б, в). Способность ядерных гликопротеинов печени и тимуса усиливает двигательную активность, несмотря на относительно низкую скорость их синтеза, может свидетельствовать в пользу информативной значимости органоспецифичных гликопротеинов.

Таблица 3

Первичный иммунный ответ при однократной иммунизации
белково-целлюлозным комплексом

День после иммунизации	Титр антител полученной сыворотки				
	гликопротеин I мозга	гликопротеин II мозга	Нефракционированный гликопротеин мозга	гликопротеин I печени	Нефракционированный гликопротеин печени
4	—	—	—	—	—
7	1:32	1:64	1:16	1:8	1:8
15	1:128	1:128—256	1:156	1:16	1:16
30	1:256	1:256	1:512	1:32	1:32
37	1:512	1:512—1024	1:1024	1:128	1:128

Примечание. Из-за малого количества тимусного гликопротеина иммунизации не проводили.

Результаты проведенных нами исследований позволяют сделать вывод, что фракции I и II гликопротеинов, синтезированные *de novo* ядрами нейронов головного мозга, печени и тимуса, обладают нейроспецифи-

ческим действием повышения двигательной активности животных. Полученные данные позволяют сделать предположение о том, что гликопротеины, синтезированные *de novo* изолированными ядрами, обладая в норме умеренным действием на двигательную активность, могут оказаться эффективными при патологических состояниях. Значения титров антител полученной сыворотки при иммунизации белково-целлюлозным комплек-

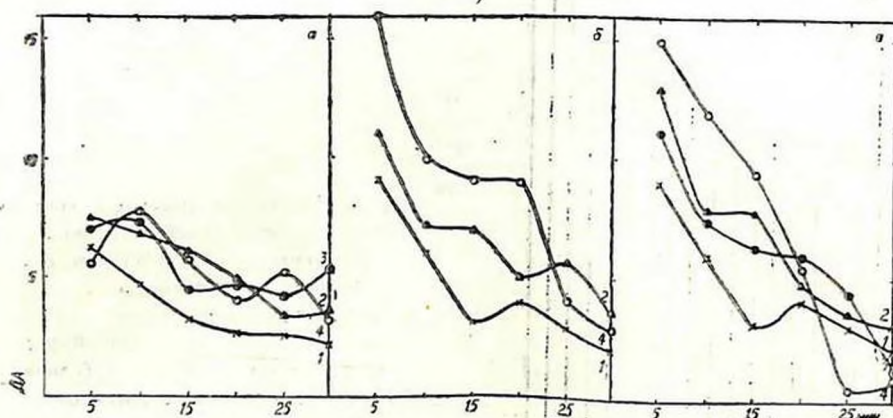


Рис. 3. Изменение вертикальной двигательной активности (ДА) животных под действием гликопротеинов, синтезированных *in vitro* ядрами нейронов головного мозга (а), печени (б) и тимуса кроликов (в). 1—контроль, буфер; 2—суммарная фракция белка; 3—I фракция гликопротеинов; 4—II фракция гликопротеинов

сом представлены в табл. 3. Показано, что гликопротеины, выделенные из ядер нейронов мозга и клеток печени, по своей специфичности отличаются, хотя иммунологически и имеют ряд общих детерминантных групп. Дальнейшие исследования по синтезу иммуносорбента с иммобилизованными антителами позволят выделить в достаточном количестве данные гликопротеины и дать точную их характеристику.

Таким образом, гликопротеины, синтезированные *in vitro* ядрами нейронов головного мозга, сходны по величине M_r с гликопротеинами печени и тимуса, но различаются содержанием нейтральных сахаров, скоростью синтеза белка и нейроспецифической активностью.

COMPARATIVE STUDY OF PROTEINS SYNTHESIZED *IN VITRO* BY NUCLEI OF BRAIN NEURONS AND ANALOGOUS PROTEINS OF OTHER TISSUES

SAITMURATOVA O. H.

A. A. Sadykov, Institute of Bioorganic Chemistry Academy of Sciences of the Uzbek SSR, Tashkent

A comparative study of glycoproteins synthesized *in vitro* by the nuclei of brain neurons, rabbit liver and thymus has been carried out.

It was shown that despite the proximity of their molecular masses, the proteins synthesized *in vitro* in the nuclei of brain neurons differ from proteins of other studied organs in the content of neutral sugars, specific activity, effect upon motor activity of animals and immunological properties.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zimmerman E. F., Nackey J., Nelson P., Arias I. *Biochemistry*, v. 8, № 6, p. 2636—2644, 1969.
2. Gallwitz D., Mueller G. C. *Eur. J. Biochem.*, v. 9, № 3, p. 431—438, 1969.
3. Burdman J. A., Journey L. J. *J. Neurochem.*, v. 16, p. 493—500, 1969.
4. Lovtrup-Rein H. *Brain Res.*, v. 19, № 3, p. 493—514, 1970.
5. David A. R., Wong E. J. *Neurochem.*, v. 19, p. 2709—2725, 1972.
6. Laval M., Moule Y. *Biochimie*, v. 58, p. 1173—1179, 1976.
7. Джохадзе Д. И., Раквиашвили Н. Р. *Сообщ. АН ГССР*, т. 77, № 3, с. 299, 1975.
8. Матинян К. С., Уманский С. Р. *Биохимия*, т. 43, вып. 1, с. 111—120, 1978.
9. Саитмуратова О. Х., Ахмедова Д., Рашидходжаева Г., Леонтьев В. Б. *Узб. биол. журн.*, № 6, с. 67—69, 1979.
10. Allfrey V. F., Littan V. C., Mirsky A. E. *J. Cell. Biol.*, v. 21, p. 213, 1964.
11. Ситвольский Н., Газарян К. Г. *Цитология*, т. 18, № 11, с. 1403, 1976.
12. Саитмуратова О. Х., Рустамова Ф. Н., Садыков А. А., Леонтьев В. Б. *Нейрохимия*, т. 6, № 3, с. 360—367, 1987.
13. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. K., Randall R. J. *J. Biol. Chem.*, v. 193, № 1, p. 265—275, 1951.
14. Монцевичюте—Эрингене Е. В. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*, т. 8, № 4, с. 71—78, 1964.
15. Роззони И. Ч., Галяс В. А. *ДАН УССР*, т. 5, № 5, с. 449—451, 1977.
16. Саитмуратова О. Х., Алимходжаева Г., Леонтьев В. Б., Леконцева В. К. *Химия природных соеди.*, № 4, с. 514—515, 1982.
17. Леонтьев В. Б., Мухамедханова С. И., Саитмуратова О. Х., Ахмедова Д., Рашидходжаева Г. Тезисы докл. Всесоюз. конф. по ЯМР—спектроскопии высокого разрешения, Ташкент, Фан, 1979.
18. Hyden H., Lange P. W. *Science*, v. 159, № 3821, p. 1370—1373, 1968.
19. Худен Х., Ланге П. В. *Журн. эволюц. биохим. и физиол.*, т. 5, № 2, с. 145—157, 1969.
20. Hyden H., Lange P. W. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 65, № 4, p. 898—904, 1970.
21. Бяловская Е. А., Малун Т. К., Свиридов С. М. *Докл. АН СССР*, т. 225, № 5, с. 1194—1197, 1975.
22. Иммуносорбенты и их использование в биотехнологии (под ред. С. В. Прозоровского), М., Наука, 1986.

Поступила 17. IV 1983



УДК 616—008.939.633.2—02:616—008.931:577.152.314

КАЛЬЦИЙНЕЗАВИСИМЫЕ АКТИВАТОРЫ
ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ

ГАЛОЯН А. А., *БОБРУСКИН И. Д., ГУРВИЦ Б. Я., АБРАМЯН Г. Э.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

*МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

В составе препарата кардиотропного нейрогормона «С», выделенного ранее из гипоталамуса быка, обнаружены три термостабильных активатора высокоочищенной кальмодулинзависимой ФДЭ мозга быка. Установлена их способность стимулировать ФДЭ в 6—10 раз в отсутствие ионов кальция. Кинетический анализ стимулирующего действия одного из активаторов выявил его высокое сродство к ферменту. Кажущаяся константа диссоциации комплекса [активатор—фермент] составляла 10 нг/мл; $pH = 1$.

Активаторы были очищены до гомогенного состояния с помощью обратно-фазовой ВЭЖХ и гель-фильтрации; величины их M_r составляют 3000—7800 Д.

Стимулирующий эффект на ФДЭ не проявлялся после обработки выделенных факторов трипсином (0.1 мг/мл, 10 мин при 30°), что указывает на их возможную пептидную природу.

В 60-е годы из гипоталамуса различных животных А. А. Галояном и соавт. были выделены коронароактивные вещества полипептидной природы [1, 2]. В дальнейшем были разработаны методы очистки трех групп коронарорасширяющих соединений, названных веществами «К», «С», и «Г» [2], а также их множественных форм [3]. Установлено, что выделенные соединения являются нейрогормонами [4].

Принципиально важным было открытие специфических белков-носителей нейрогормонов «К», «С» и «Г» [5]. В процессе очистки и идентификации кардиотропных белок-гормональных комплексов гипоталамуса обнаружены также 14 коронаросуживающих фракций, некоторые из которых являются полипептидами [6].

Далее было установлено, что нейрогормоны «К», «С» и «Г», а также пептиды, обнаруженные в составе фракций нейрогормона «С», влияют на самые различные метаболические процессы, главным образом, на обмен циклических нуклеотидов, биосинтез катехоламинов и транспорт ионов кальция [7, 8]. В частности, выявлена способность нативного коронарорасширяющего гликопептидного нейрогормона «С» ингибировать активность кальмодулинзависимой ФДЭ циклических нуклеотидов мозга и

сердца. Было показано также, что некоторые другие нейрогормоны и коронаросуживающие соединения гипоталамуса являются ингибиторами либо активаторами ФДЭ [9—11].

В этой связи большой интерес представляет исследование механизмов действия трех термостабильных Ca^{2+} -независимых активаторов ФДЭ мозга быка, выделенных из состава нейрогормона «С» при его дальнейшей очистке методом ВЭЖХ. Эти активаторы были названы нами С-модулином, так как они, по всей вероятности, являются регуляторами кардиотропного действия нейрогормона «С».

В настоящей работе приведены методы выделения С-модулинов, а также результаты исследований некоторых из их свойств и кинетических характеристик их стимулирующего действия на активность высокоочищенной кальмодулинзависимой ФДЭ мозга быка.

Материалы и методы

В работе были использованы следующие реактивы: сАМР, ЭГТА, трипсин («Calbiochem», США); трис («Serva», ФРГ); ЭДТА, дитиотреитол (ДДТ), NaN_3 , («Reanal», Венгрия); β -меркаптоэтанол («Merk», ФРГ); набор для определения величины M_r пептидов («Pharmacia» Швеция); ацетонитрил («Fluka», Швейцария); анионообменные смолы Дауэкс 1 $\times$ 2, 50—100 меш. и Амберлит CG—400, 100—200 меш. («Serva», ФРГ); хроматографические сорбенты: фекил-сефароза («Pharmacia», Швеция) и TSK DEAE Toyopearl 650 M («Toyo Soda», Япония); остальные реактивы марок х.ч. и ос.ч. («Союзхимреактив», СССР).

Препарат меченого $[8\text{-}^3\text{H}]\text{сАМР}$ («Союзхимреактив») очищали с помощью ТСХ на пластинках «Силуфол» («Kavalier», ЧССР) в системе: изопропанол—водный аммиак (25%)—вода (7:1:2). Полосу, соответствующую $[^3\text{H}]\text{сАМР}$, идентифицированную в ультрафиолете, вырезали и хранили в течение длительного времени при -10° . Перед использованием метку экстрагировали из слоя силикагеля 50%-ным этанолом, создавая требуемую удельную радиоактивность. Уровень радиоактивности проб определяли с помощью жидкостного сцинтилляционного спектрометра типа «Intertechnique» (Франция) с использованием сцинтиллятора ЖС 7А («Союзхимреактив»). ВЭЖХ проводили на хроматографе «Altex Beckman» (США) с применением колонок C_{18} ($4,6 \times 250$ мм) («Ultrasphere ODS, Beckman», США); ДЭАЭ ($21,5 \times 150$ мм) (TSK DEAE—3SW «LKB», Швеция) и колонки для гель-фильтрации ($7,5 \times 600$ мм) («Sphergel TSK 2000, SW, Altex», Япония).

Очистка кальмодулинзависимой ФДЭ. Фермент выделяли из мозга крупного рогатого скота по методу, описанному в литературе [12], разработанному на основе аффинной хроматографии на фекил-сефарозе [13]. Ткань мозга гомогенизировали в 25 мМ трис- HCl буфере, рН 7,0 (1:2:5), содержащем 1 мМ ацетата магния, 5 мМ ДТТ или β -меркаптоэтанол, 0,1 мМ NaN_3 , с помощью гомогенизатора типа «Политрон». Гомогенат

центрифугировали при 22000 g в течение 1 ч на центрифуге «Beckman J-21» (ротор G-14). Супернатант подвергали ионообменной хроматографии на колонке (4×11 см) с TSK ДЭАЭ; элюцию фермента осуществляли с помощью 200 mM NaCl в 25 mM трис-HCl буфере, pH 7,0, содержащем 1 mM MgCl₂, 1 mM ДДТ, 0,1 mM NaN₃ (буфер А). Элюат наносили на колонку (4×5,6 см) с фенил-сефарозой, с которой фермент связывался в присутствии Ca²⁺ (1 mM) и элюировался буфером А, содержащим вместо Ca²⁺ 0,2 mM ЭГТА. Далее фермент подвергали повторной ионообменной хроматографии на колонке (3,5×6 см) с TSK ДЭАЭ, элюцию с которой осуществляли линейным градиентом концентраций NaCl (50—300 mM).

Активность ФДЭ определяли по методу Thompson, Appleman [14] с использованием двухстадийной реакции гидролиза [³H]сАМР и [³H]5'-AMP с участием ФДЭ и 5'-нуклеотидазы змеиного яда соответственно. [³H]аденозин, образовавшийся в результате этой двухстадийной реакции, отделяли от негидролизованых субстратов внесением в инкубационную смесь (200 мкл) водной суспензии Амберлита или Дауэкса (1 мл). После центрифугирования определяли уровень радиоактивности супернатанта. Результаты представлены в относительных единицах активности (О.Е.А.), рассчитанных по проценту гидролизованного субстрата в мин с учетом остаточной радиоактивности проб в отсутствие фермента и уровня неспецифической сорбции аденозина на ионообменнике при полном гидролизе субстрата в присутствии избытка фермента.

Очистка кальмодулина. Кальмодулин выделяли по методу Gopalakrishna, Anderson [13] с некоторыми модификациями [12]. Дальнейшую его очистку проводили с помощью ВЭЖХ на колонке TSK ДЭАЭ (21,5×150 мм), с которой кальмодулин элюировали линейным градиентом концентраций NaCl (150—350 mM) в 25 mM трис-HCl буфере, pH 6,8. Элюат подвергали диализу против дистиллированной воды, после чего лиофилизировали. Выделенный таким образом кальмодулин оказался гомогенным по данным электрофореза в 10%-ном ПААГ в присутствии 0,1%-ного ДДС-Na, проведенным по методу Laemmli [15].

Выделение С-модулинов. Препарат кардиотропного нейrogормона «С», выделенный из магноцеллюлярных ядер гипоталамуса быка [2], подвергали дальнейшей очистке с помощью обратнo-фазовой ВЭЖХ на колонке С18. Элюцию проводили со скоростью 1 мл/мин с использованием линейного градиента ацетонитрила в воде (0—20%). Элюированные фракции после лиофилизации растворяли в 50 mM трис-HCl буфере. Пробы, проявляющие способность активировать ФДЭ, подвергали гель-фильтрации в системе ВЭЖХ на колонке TSK 2000 SW, уравновешенной 20 mM трис-HCl буфером, pH 6,8, содержащим 0,1 mM ЭГТА и 100 mM NaCl. Элюцию проводили тем же буфером со скоростью 0,5 мл/мин. Величину M_r С-модулинов определяли в сравнении с результатами гель-фильтрации в системе ВЭЖХ в указанных условиях набора стандартных пептидных фрагментов миоглобина с M_r в диапазоне 1700—172000 Д, содержащих различное число аминокислотных остатков: 14, 22, 55, 76, 131 и 153. Выход белков регистрировали по УФ-поглощению пептидной связи при

220 нм с последующей проверкой способности фракций активировать ФДЭ.

Трипсинолиз С-модулинов. С-модулины (0,01 мг/мл) инкубировали при 30° в присутствии трипсина (0,1 мг/мл) в течение 10 мин, после чего пробы помещали в кипящую водяную баню на 1,5 мин. Далее исследовали возможность взаимодействия С-модулинов с ФДЭ по стандартной методике. Ограниченный трипсинолиз ФДЭ проводили в аналогичных условиях, однако фермент инкубировали с трипсином в течение 3 мин.

Результаты и обсуждение

При фракционировании препарата нейрогормона «С» с помощью обратнo-фазовой ВЭЖХ на колонке C_{18} (4,6×250 мм) с использованием линейного градиента ацетонитрила в воде были выделены три фактора (C_1 , C_2 и C_3), обладающие способностью активировать ФДЭ, выделенную из мозга быка (см. «Материалы и методы») (рис. 1). Фермент обладал высоким сродством к кальмодулину ($K_m = 3,3$ нмоль) и активировался кальмодулином в присутствии Ca^{2+} в 10—15 раз. Из рис. 1, сле-

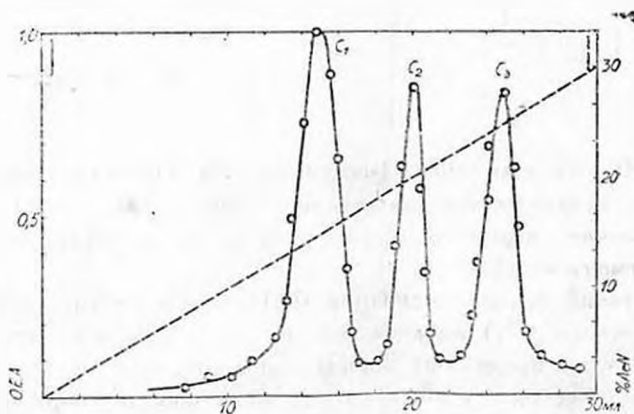


Рис. 1. Фракционирование С-модулинов путем обратнo-фазовой ВЭЖХ на колонке C_{18} . По оси абсцисс — объем элюата в мл; по оси ординат (слева) — скорость реакции в присутствии элюируемых фракций (0,1 мг/мл). $\bigcirc$ — $\bigcirc$ — профиль элюции нейропептидов, — — — градиент ацетонитрина в воде

дует, что скорость гидролиза сАМР при концентрации субстрата 5 мкМ возрастает в присутствии C_1 , C_2 и C_3 в 6—10 раз. Максимальную активацию вызывала фракция C_1 .

Наблюдаемые эффекты были Ca^{2+} -независимыми. Они проявлялись в присутствии в инкубационной смеси 0,5 мМ ЭГТА, и при замене ЭГТА на 0,5 мМ $CaCl_2$ степень активации ФДЭ под действием C_1 — C_3 не изменялась.

Активирующие свойства выделенных факторов полностью сохранялись после кипячения в водяной бане в течение 1,5 мин. После преинкубации в течение 10 мин каждого из C_1 , C_2 и C_3 в концентрации 0,01 мг/мл в присутствии трипсина (0,1 мг/мл) активация ФДЭ под действием C_1 , C_2

или C_3 не наблюдалась, что может свидетельствовать о пептидной природе этих термостабильных активаторов (рис. 2).

По данным гель-фильтрации в системе ВЭЖХ на колонке TSK 2000

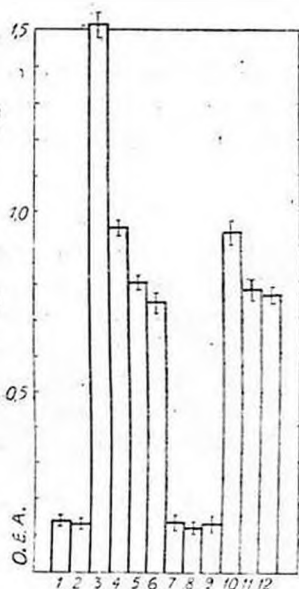


Рис. 2. Действие С-модулинов, подвергнутых ограниченому трипсинолизу на активность ФДЭ гипоталамуса (в о.е.а.). 1—базальная активность ФДЭ; 2—базальная активность ФДЭ в присутствии трипсина, подвергнутого кипячению в водяной бане в течение 1,5 мин; 3—активация ФДЭ трипсином; 4—6—активация ФДЭ под действием C_1 , C_2 и C_3 соответственно; 7—9—активность ФДЭ в присутствии C_1 , C_2 и C_3 при инкубировании с трипсином предварительно подвергнутому кипячению

SW (7,5×600 мм) величины эффективной M_r для выделенных пептидов C_1 , C_2 и C_3 составили соответственно 7800, 3500 и 3500 Д (рис. 3). Нельзя исключить вероятность того, что C_3 и C_2 являются протеолитическими фрагментами C_1 .

Кинетический анализ активации ФДЭ в присутствии одного из выделенных пептидов (C_1) показал, что по характеру действия на фермент C_1 и кальмодулин проявляют значительное сходство (рис. 4, а). На основании кинетических данных, представленных в координатах Хилла (рис. 4, б), можно сделать заключение о высоком сродстве C_1 к ферменту (кажущаяся величина K_d комплекса C_1 —ФДЭ составляет 10 нг/мл). $n_H = 1$. Характер активации ФДЭ под действием C_2 и C_3 аналогичен действию C_1 . Полученные результаты позволяют высказать предположение о структурно-функциональном сходстве выделенных активаторов.

В настоящее время известен ряд факторов, вызывающих Ca^{2+} -независимую активацию не только ФДЭ, но и других чувствительных к кальмодулину систем. К их числу относятся жирные кислоты и фосфолипиды [16]; белковый аналог кальмодулина, названный бактериомодулином, обнаруженный в числе продуктов секреции стафилококкового экзотоксина *St. aureus* [17]; термостабильный полипептид ($M_r = 17000$ Д) из синаптической фракции коры головного мозга овцы [18]; ограниченный протеолиз [19] и др. Исследование функции этих факторов могло бы значительно расширить представления о механизмах кальмодулинзависимой регуляции клеточной активности, которые в настоящее время остаются невыясненными.

Число работ, в которых кальмодулину приписывают регуляторную

роль в различных клеточных процессах, быстро растет; список чувствительных к кальмодулину систем пополняется все новыми и новыми наименованиями. Показано, что с кальмодулином связываются Ca^{2+} -зависимым способом многие белки и пептиды (β -эндорфин, аденокортикотропный гормон, глюкагон, соматостатин, основной белок миелина, гистоны) [20], различные низкомолекулярные органические соединения, в их числе—лекарственные препараты [21, 22].

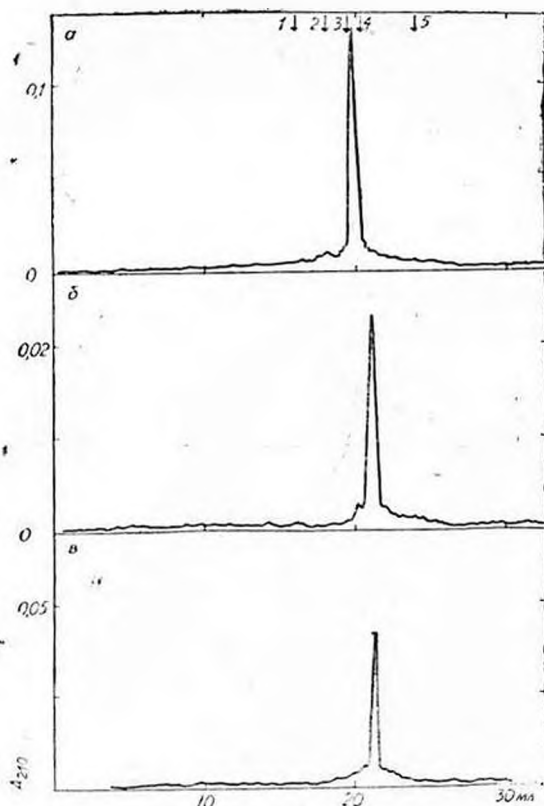


Рис. 3. Гель-фильтрация неuropeпидов C_1 (а), C_2 (б) и C_3 (в) в системе на колонке TSK 2000 SW. По оси абсцисс—объем элюата в мл, по оси ординат—оптическая плотность при 210 нм. Стрелками указаны объем элюата для стандартных пептидов с M_r (Д): 1—17200, 2—14632, 3—8235, 4—6383, 5—1695

Однако множество наблюдаемых *in vitro* реакций, происходящих с участием кальмодулина, еще не означает возможность существования подобных взаимодействий *in vivo*. Можно предположить, что увеличение гидрофобности молекулы кальмодулина вследствие ее конформационных изменений, индуцированных связыванием Ca^{2+} [23], наряду со специфичными реакциями порождает целый ряд наблюдаемых в экспериментальных условиях неспецифических взаимодействий кальмодулина с различными белками, пептидами, компонентами мембран, обладающими гидрофобными свойствами. При этом следует отметить, что связывание кальмодулина далеко не всегда является Ca^{2+} -зависимым [24], а некоторые

кальмодулинзависимые ферменты обладают Ca^{2+} -связывающими свойствами [25, 26]. По-видимому, лишь немногие из чувствительных к кальмодулину *in vitro* систем являются мишенями действия этого рецептора

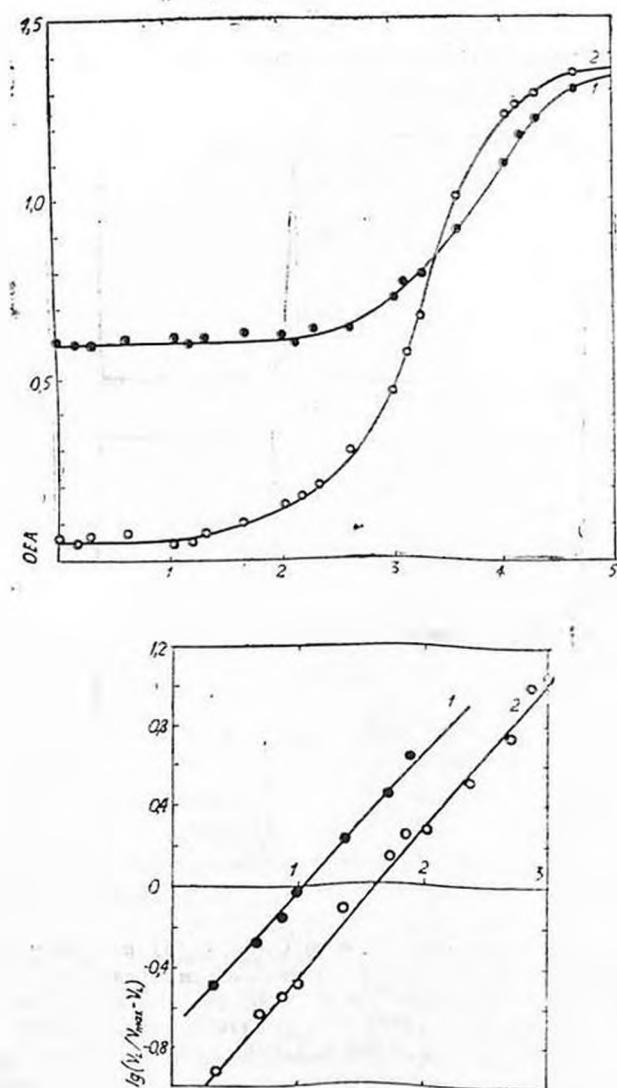


Рис. 4. а—активация ФДЭ под действием Ca^{2+} (в присутствии 0,2 мМ ЭГТА) (1); По оси абсцисс—логарифм концентраций Ca^{2+} или кальмодулина, выраженный в нг/мл, по оси ординат—скорость гидролиза сАМР при концентрации субстрата 5 мкМ; б—зависимость степени активации ФДЭ от концентрации Ca^{2+} и кальмодулина в координатах Хилла

Ca^{2+} в интактной клетке. При определенных условиях, в особенности при низком внутриклеточном уровне содержания Ca^{2+} , многие функции, приписываемые кальмодулину, выполняются Ca^{2+} -независимыми регуляторами, к числу которых принадлежат и С-модулины.

CALCIUM INDEPENDENT ACTIVATORS OF CYCLIC NUCLEOTIDE PHOSPHODIESTERASE

GALOYAN A. A., *BOBRUSKIN I. D., GURVITS B. Ya. and
ABRAMYAN G. E.

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Armenian SSR,
Yerevan and *Moscow State University, Moscow

Three heat-stable activators stimulating highly purified bovine brain calmodulin-dependent phosphodiesterase (PDE) were detected in the preparation of neurohormone C partially purified from bovine hypothalamus and possessing cardiotropic action. These activators stimulate PDE activity 6–10 fold in the absence of calcium ions. Kinetic analysis of the stimulating effect of one such activator demonstrated its high affinity towards the enzyme. The apparent dissociation constant of the activator-enzyme complex was 10 ng/ml and the Hill coefficient (n_H)=1. The activators were purified to homogeneity using reverse phase HPLC and gel filtration; their M_r values are equal to 3000–7800 D.

Treatment of the purified activators with trypsin (0.1 mg/ml, 10 min at 30 °C) abolished their stimulating effect on PDE, suggesting their peptide nature.

ЛИТЕРАТУРА

1. Галоян А. А. Докл. АН АрмССР, т. 4, № 3, с. 109–111, Изд-во АН АрмССР, Ереван, 1962.
2. Галоян А. А. Вopr. биохимии мозга, т. 13, с. 9–38, 1978.
3. Галоян А. А., Срапионян Р. М., Карапетян Р. О., Абслян Ж. Г., Саакян Ф. М., Саакян С. А., Абрамян С. С., Григорян А. Г., Одабашян А. Б., Бочко И. Ф. Нейрохимия, т. 5, № 4, с. 354–365, 1986.
4. Galoyan A. A. Neurochem. Res., v. 11, № 6, p. 751–787, 1985.
5. Галоян А. А. Докл. АН АрмССР, т. 38, № 5, с. 305–308, 1964.
6. Галоян А. А., Бархударян Н. А., Валко К., Закарян Т. Р., Шарова Н. П. Нейрохимия, т. 7, № 4, с. 519–524, 1988.
7. Галоян А. А., Чифликян М. Д., Мурадян М. Ш., Едигарян А. К., Абрамян С. С. Нейрохимия, т. 5, № 1, с. 45–48, 1986.
8. Galoyan A. A., Kevorkian G. A., Voskanian L. H., Alexanian S. S., Muradian M. Sh. Neurochem. Res., v. 13, № 5, p. 493–498, 1988.
9. Galoyan A. A., Gurvitz B. Ya., Saribekyan G. A., Kirakosova A. S.—In: Cyclic Nucleotides and Therapeutic Perspectives (eds. G. Cehovic, G. Robison), p. 165–181. Pergamon Press, N. Y., 1979.
10. Галоян А. А., Гурвиц Б. Я. Вестн. АМН СССР, т. 9, с. 64–69, 1982.
11. Galoyan A. A., Gurvitz B. Ya. Neurochem. Res., v. 10, № 11, p. 1457–1481, 1985.
12. Бобрускин И. Д., Шайхин С. М., Муратова М. В., Баранова А. А., Северин Е. С. Биохимия, т. 52, вып. 8, с. 1344–1352, 1987.
13. Gopalakrishna R., Anderson W. B. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 101, p. 830–836, 1982.

14. Thompson W. J., Appleman M. M. *Biochemistry*, v. 10, p. 311—316, 1971.
15. Laemmli U. K. *Nature*, v. 227, p. 680—683, 1970.
16. Wolff D. I., Brostrom C. O. *Arch. Biochem. and Biophys.*, v. 173, p. 720—731, 1976.
17. Дудкин С. М., Алехов В. Ю., Свеврин С. Е. мл., Шац В. И. Докл. АН СССР, т. 276, № 6, с. 1510—1513, 1984.
18. Bradford White C. J., Parker G., Dawson J. M., Fraser A. *Biochem. Soc. Trans.*, v. 9, p. 417—418, 1981.
19. Krinks M. N., Haech J., Rhoads A., Klee C. B.—In: *Advances in Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Res.* (eds. S. I. Strada, W. J. Thompson), v. 16, p. 31—47, Raven Press, N. Y., 1984.
20. Malencik D. A., Anderson S. R. *Biochemistry*, v. 21, p. 3480—3486, 1982.
21. Weiss B., Prozialeck W. C., Wallace T. L. *Biochem. Pharmacol.*, v. 31, p. 2217—2226, 1982.
22. Hidaka H., Yamaki T., Totsuka T., Asano H. *Mol. Pharmacol.*, v. 15, p. 49—59, 1979.
23. La Porte D. C., Wierman B. M., Storm D. R. *Biochemistry*, v. 19, p. 3814—3819, 1980.
24. Atwin B. B., Keller C. H., Storm D. R.—In: *Advances in Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Res.* (eds. S. I. Strada, W. J. Thompson), v. 16, p. 227—243. Raven Press, N. Y., 1984.
25. Rodbell M. J. *Biol. Chem.*, v. 250, p. 5826—5834, 1975.
26. Manahan A. S., Klee C. B. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, v. 80, p. 4291—4295, 1983.

Поступила 4. IX 1987

Современные задачи биологии развития, т. 21, Развитие нервной системы, 441 с., 1987.

Current Topics in Developmental Biology (ed. A. A. Moscona, A. Monrox), v. 21. Neural Development (vol. ed. R. K. Hunt), Academic Press, London, England, 331 p., 1987.

Этот том представляет уже четвертый выпуск серии, посвященной развитию нервной системы, из которых три первых были представлены в т. 15, 16 (1980 г.) и 17 (1982 г.). В аннотируемом томе внимание читателя фокусируется на проблемах молекулярной и клеточной дифференциации в развивающейся нервной системе и дается эклектическое описание нейрогенеза, начиная с химизма роста окончаний и экспрессии генов в мозгу в постэмбриональном периоде и кончая механизмами клонального роста и морфогенезом нейробиохимически детерминированных цепей в коре головного мозга.



УДК 577.11:616.45—001.1/3

ЭФФЕКТЫ ПЕПТИДА ДЕЛЬТА-СНА НА МЕТАБОЛИЗМ БИОГЕННЫХ АМИНОВ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ НЕВРОПАТОЛОГИИ, ВЫЗВАННОЙ ВВЕДЕНИЕМ L-ДОФА И ПЕНИЦИЛЛИНА

ДОВЕДОВА Е. А.

НИИ мозга ВНИЦ психического здоровья АМН СССР, Москва

Исследовали эффект пептида дельта-сна при системном введении кроликам, кошкам (30—120 мкг/кг массы тела) до и после воздействий L-ДОФА или пенициллина, приводящих к невро- и психопатическим отклонениям.

При действии пептида дельта-сна обнаружен реципрокный характер изменений МАО типов А и В при отсутствии сдвигов АХЭ в синапсосамах и митохондриях тел нейронов моторной коры и хвостатого ядра мозга.

Показаны также изменения содержания дофамина, серотонина и их метаболитов—норадреналина и 5-оксиндоуксусной кислоты в условиях эксперимента.

Предполагается, что в основе действия пептида дельта-сна лежит активация МАС типа А всей серотонинергической системы мозга, обеспечивающая адаптивное поведение животных.

В экспериментальных и клинических исследованиях показано разностороннее участие коротких пептидов в различных сложных функциях организма, таких, как боль, память сон, что указывает на универсальные принципы действия этих пептидов и позволяет считать их природными корректорами, адаптантами [1, 2].

Регулирующее влияние пептидов на синаптическом уровне осуществляется путем изменения многих метаболических процессов и опосредовано исходным состоянием нейромедиаторных систем. Оно может не проявиться на фоне оптимального функционирования ЦНС, но оказывается более выраженным при их нарушении или в ответных реакциях на стресс, шок и другие воздействия [3, 4].

В литературе имеются биохимические и физиологические данные о регулирующем эффекте пептида дельта-сна (ПДС) при различных патологических состояниях (гипоксии, алкогольной мотивации, холодовом и эмоциональном стрессе и т. д.) [5—7].

В связи с этим представлялось целесообразным изучение эффектов ПДС в мозгу при развитии неврологических и психопатологических отклонений. При моделировании этих состояний на животных использовался

ли фармакологические воздействия—введение L-ДОФА, приводящее к некоторым функциональным признакам психомоторного возбуждения [8, 9], и пенициллина Г, вызывающего экспериментальную эпилепсию [10].

В настоящей работе состояние нейромедиаторных систем оценивали по уровню активности MAO типов А и В, а также содержанию биогенных аминов в структурах сенсомоторной коры и хвостатого ядра мозга в норме и под влиянием ПДС до или после фармакологического воздействия.

Материалы и методы

Все животные (кошки, кролики) были объединены в группы по сериям эксперимента (3—5 опытов в каждой серии): I группа—контрольные животные (беспородные кошки массой 3,0—3,5 кг и кролики, массой 1,8—2,0 кг породы Шиншилла), II группа—экспериментальные животные, подвергнутые фармакологическому воздействию: одноразовое внутривентрикулярное введение кроликам L-ДОФА в дозе 50 мг/кг массы тела (препарат «Levodopum, Phagmos», Финляндия); одноразовое внутримышечное введение кошкам пенициллина Г, 200000 ME/кг массы тела (кристаллический препарат калий-бензилпенициллин, «Galenika», СФРЮ); III группа—экспериментальные животные, которым вводили ПДС* (кошкам внутривентрикулярно в дозе 120 мг/кг, кроликам—субокулярно в дозе 30 мг/кг, через 2 ч после введения пенициллина кошкам и через 1 ч после введения L-ДОФА кроликам). При моделировании на кошках экспериментальной эпилепсии была поставлена IV серия экспериментов (введение животным ПДС за 60 мин до введения пенициллина. Развитие эпилептической активности наблюдали в течение 2-х ч. Эффекты прослеживали в течение 30 мин, после чего животных декапитировали.

Объектом исследования служили субфракции «легких» и «тяжелых» синапсом (С и D) и свободных митохондрий нейронов (Е), выделенные в градиенте плотности сахарозы 0,8—1,4 М, а также гомогенаты моторной коры и хвостатого ядра. В указанных образованиях мозга спектрофотометрически определяли содержание белка по Lowry и соавт., активность АХЭ по Hestrin [11] и молекулярных форм MAO типа А (субстрат-серотонин) по Горкину и соавт. [12] и типа В (субстрат—л-нитрофенилэтиламин) по Роров и соавт. [13].

В гомогенатах коры и хвостатого ядра мозга спектрофлуориметрическим методом [14] определяли содержание дофамина (ДА), норадреналина (НА), серотонина (5'-ОТ) и 5-оксииндолуксусной кислоты (5-ОИУК).

Результаты каждой серии опытов обрабатывали статистически и выражали в единицах У. А. ферментов/мг белка фракции или ПГ субстратов/г ткани, а также в процентах изменения исследуемых показателей по сравнению с контролем.

* ПДС синтезирован в Институте биорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, за что приносим глубокую благодарность ведущему научному сотруднику Михалевой И. И.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлено изменение (в %) активности МАО типов А и Б и АХЭ в субфракциях синапсом (С и D), а также синаптических мембран (В) и митохондрий нейронов (Е) в результате воздействия L-ДОФА и на его фоне—эффект ПДС.

Установили, что через 1 ч после введения L-ДОФА в субклеточных структурах мозга отмечена тенденция к активации МАО типа Б, особенно в сенсомоторной коре, а также статистически достоверное снижение активности МАО типа А и АХЭ в обоих образованиях мозга.

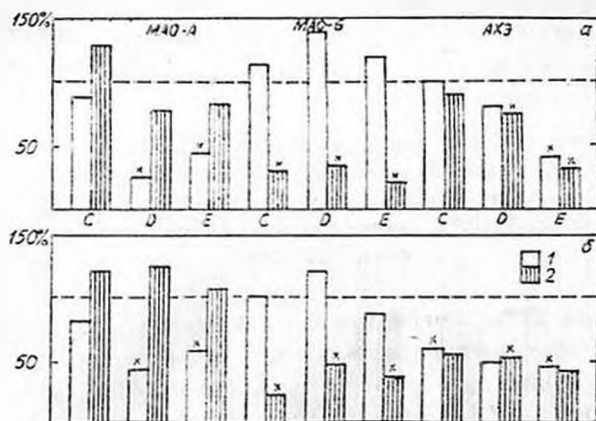


Рис. 1. Влияние ПДС на активность ферментов в субфракциях сенсомоторной коры (а) и хвостатого ядра (б) мозга кроликов в норме и на фоне введения L-ДОФА (в %). С—«легкие» синапсомы; Д—«тяжелые» синапсомы; Е—свободные митохондрии клеток. 1—изменение ферментной активности под влиянием L-ДОФА (60 мин). 2—изменение ферментной активности под влиянием ПДС на фоне L-ДОФА.

Содержание ДА, НА, 5'-ОТ и 5-ОИУК в гомогенатах коры и хвостатого ядра при введении L-ДОФА изменялось незначительно (рис. 2).

Эффект ПДС по направленности был противоположен действию L-ДОФА на ферментативную активность и выражался в практической нормализации активности МАО типа А и значительном подавлении МАО типа Б в субфракциях сенсомоторной коры и хвостатого ядра при отсутствии влияния на активность АХЭ (рис. 1).

Под влиянием ПДС на фоне действия L-ДОФА обнаружено статистически достоверное снижение содержания НА и накопление 5-ОИУК в обоих образованиях мозга, более выраженные в хвостатом ядре.

Полученные изменения в содержании 5-ОИУК под влиянием ПДС отражают активацию МАО типа А, которая, по-видимому, лежит в основе механизма действия этого пептида, как было показано ранее [15]. При этом не обнаружено значительного нарастания содержания ДА, но отмечено статистически достоверное снижение НА в исследуемых структурах мозга, что косвенно свидетельствует о подавлении синтеза этих

медиаторов (рис. 2). Таким образом, можно предположить, что, наряду с активацией серотонинергической системы, ПДС реципрокно подавляет катехоламинергическую медиацию. В то же время, по-видимому, эффекты ПДС не затрагивают механизмы холинергической передачи.

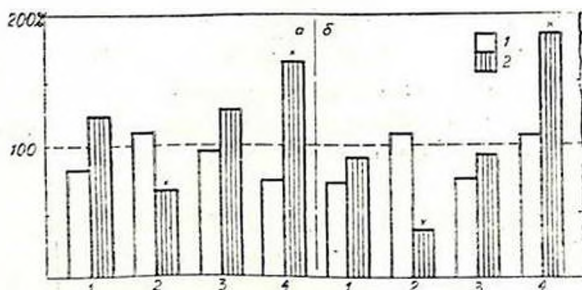


Рис. 2. Влияние ПДС на содержание биогенных аминов в гомогенатах коры (а) и хвостатого ядра (б) мозга кроликов (в %): 1—дофамин, 2—норадреналин, 3—серотонин, 4—5'-оксиндолуксусная кислота. Светлые столбики—введение L-ДОФА; заштрихованные столбики—эффект ПДС на фоне L-ДОФА.

При создании экспериментальной эпилепсии у кошек в наших опытах эпилептиформная «шипиковая» активность проявлялась на протяжении 3—4 ч с периодами от 1 до 5 с и сопровождалась миоклоническими сокращениями мышц [16]. Через 1 ч после введения пенициллина в синапсомы (но не митохондриях тел нейронов) показано снижение активности MAO типа А и нарастание активности MAO типа Б (рис. 3)*.

Действие ПДС на фоне развившейся эпилептиформной активности приводило к незначительной нормализации MAO типа А; в отношении же MAO типа Б эффект пептида не проявлялся (активность этого фермента даже нарастала во времени). При этом характер ЭЭГ не изменялся: разряды охватывали все исследуемые структуры мозга.

При введении ПДС за 1 ч до начала эпилептиформных разрядов при дальнейшем развитии эпилепсии в течение 30 мин активность MAO типов А и Б в субфракциях моторной коры и хвостатого ядра мозга кошек практически не отличалась от нормы (рис. 3). На ЭЭГ в хвостатом ядре появлялись медленные волны, характерные для ПДС, разряды охватывали не все структуры мозга и не одновременно [16].

Таким образом, при создании экспериментальной эпилепсии у животных ПДС может оказывать результирующее влияние на медиаторный обмен, однако это скорее превентивный эффект, создающий условия для ослабления патологического воздействия. На фоне развившейся эпилептической активности антистрессорный эффект пептида на исследуемые биохимические показатели практически отсутствует.

В литературе имеются физиологические данные о подавляющем действии ПДС на эпилептогенные очаги, созданные аппликацией стрихнина.

* Статистическая обработка в этой серии экспериментов не проводилась ($n=3$).

в коре больших полушарий мозга кошек, однако авторы указывают, что антиэпилептический эффект ПДС больше выражен при «стрихнинной» эпилепсии, чем при эпилепсии у крыс, вызванной пенициллином [17].

На основании полученных результатов можно сделать заключение, что при моделировании двух избранных экспериментальных невро- или психопатологических синдромов путем фармакологической индукции (введение L-ДОФА или пенициллина) нарушается нормальное функционирование нейротрансмиттерных систем, выражающееся в сдвигах активности ферментов, специфичное для каждого из них и неодинаковое в различных образованиях мозга.

При использовании ПДС до или на фоне нарушенного функционирования ЦНС происходят сдвиги в активности ферментных систем, часть которых противоположно направлена по отношению к действию фармакологического агента МАО типа Б, при этом эффекты регуляторного пептида становятся более выраженными по сравнению с контролем.

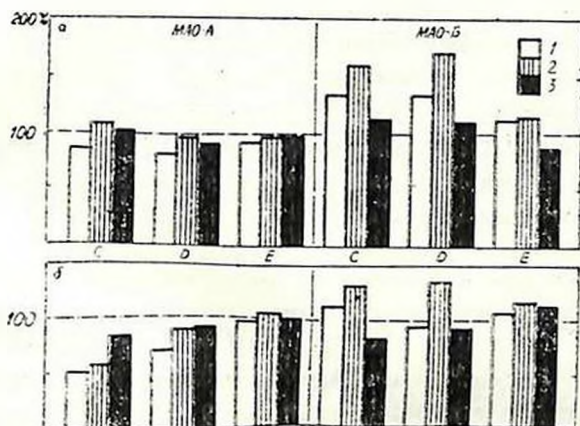


Рис. 3. Влияние ПДС на активность МАО типов А и Б в субфракциях моторной коры (а) и хвостатого ядра (б) мозга кошек в условиях экспериментальной эпилепсии (в %). 1—изменение активности МАО после введения пенициллина Г. 2—изменение активности МАО под влиянием ПДС после развития эпилепсии. 3—изменение активности МАО под влиянием ПДС до развития эпилепсии

Ранее на основании электрофизиологических данных нами было высказано предположение, что под влиянием ПДС происходит как бы затормаживание восприятия («экранизация») внешних сенсорных стимулов, в основе чего лежит активация МАО типа А и всей серотонинергической системы [18]. В этом, по-видимому, состоит одно из отличий механизма действия ПДС от эндорфинов и морфина, которые первично оказывают ингибирующее влияние на активность ДА-ергических нейронов [4].

Активация серотонинергической системы на поведенческом уровне снимает психомоторное возбуждение и подавляет эпилептиформную ак-

тивность животных. Из литературы известно, что 5'-ОТ участвует в регуляции сексуального поведения, цикла сон-бодрствование и т. д. и, по-видимому, играет важную роль в развитии различных клинических состояний, в частности аффективных расстройств и депрессий [19].

Механизмы действия регуляторных пептидов, в том числе и ПДС, на нейромедиаторные системы полностью не вскрыты, их взаимодействия носят сложный характер: помимо пресинаптической модуляции нейротрансмиссии (изменения синтеза, высвобождения и обратного захвата медиаторов) возможно влияние на их связывание с соответствующими постсинаптическими рецепторами. В литературе имеются сведения о возможности связывания коротких пептидов с липидным компонентом мембраны [1]. На основании экспериментальных данных было высказано предположение о прямом влиянии экзогенного ПДС на митохондрии мозга и о мембранном эффекте этого пептида, отчетливо проявляющемся при стрессорном состоянии организма [7]. Изменяя мембранный потенциал в синапсах и проводимость нейронов, пептиды способны регулировать эффективность действия медиаторов. Не исключена возможность и непосредственного влияния пептидов на ферментативную активность.

В то же время, изменение активности ферментов *in vivo* обусловлено рядом факторов, поэтому полученные результаты не позволяют судить о прямом воздействии ПДС на активный центр МАО А. Исходя из литературных данных, можно предположить взаимодействие пептида с регуляторным участком фермента [20].

В наших экспериментах показано значительное нарастание в образованиях мозга содержания конечного продукта обмена 5'-ОТ—5-ОИУК без заметного изменения уровня самого нейромедиатора под влиянием ПДС. По-видимому, регуляторные пептиды и, в частности ПДС, участвуют в поддержании баланса моноаминов в мозгу и, таким образом, играют важную роль в адаптивных процессах в ЦНС.

На основании полученных результатов можно сделать заключение, что по крайней мере одним из элементов антиневротического действия ПДС является активация серотонинергической системы, приводящая к изменению функционирования других нейромедиаторных систем, что в свою очередь, отражается на нейрональной активности и поведении животных.

При изыскании методов и путей коррекции нарушенных звеньев метаболических процессов в мозгу при использовании регуляторных пептидов, в данном случае ПДС, в дальнейшем следует учитывать характер действия ПДС на активность МАО типов А и В, поскольку в последние годы эти ферменты привлекают все больший интерес исследователей в связи с изучением актуальных вопросов невропатологии и психиатрии, в частности диагностики шизофрении [21].

THE EFFECT OF DELTA-SLEEP INDUCING PEPTIDE ON METABOLISM OF BIOGENIC AMINES UNDER EXPERIMENTAL NEURO- AND PSYCHOPATHIC DISTURBANCES

DOVEDOVA E. L.

Brain Research Institute, National Mental Health Center, USSR
Academy of Medical Sciences, Moscow

We studied the effect of delta-sleep inducing peptide systemically administered to rabbits or cats (30—120 ug/kg body weight) before and after administration of L-DOPA and penicillin leading to neuro- or psychopathic disturbances.

The effect of delta-sleep inducing peptide leads to reciprocal changes in MAO types A and B, whereas the activity of acetylcholine esterase in synaptosomes and mitochondria of neuron bodies from the motor cortex *n. caudatus* remains unchanged. Some shifts in the levels of dopamine, serotonin and their metabolites-noradrenaline and 5-hydroxyindolylacetic acid were also observed under experimental conditions.

It is proposed that the action mechanism of delta-sleep inducing peptide involves the activation of MAO type A in the whole serotonergic system of the brain, which is responsible for the adaptive behavior.

ЛИТЕРАТУРА

1. Клуша В. Е.—В кн.: Пептиды—регуляторы функций мозга, с. 181, Зинатне. Рига, 1984.
2. Ашмарин И. П., Кругликов Р. И. Нейрохимия, т. 2, с. 56—63, 1983.
3. Ашмарин И. П. Вопр. мед. химии т. 30, с. 2—7, 1984.
4. Бурчинский С. Г. Журн. невропатол. и психиатрии, т. 85, с. 1394—1400, 1985.
5. Коплик Е. В., Всаев В. Ф., Михалева И. И., Сарисян А. С., Иванов В. Т., Судяков К. В. Докл. АН СССР, т. 267, с. 230—233, 1982.
6. Кричевская А. А., Бондаренко Т. И., Крупенникова Е. Ю., Михалева И. И. Физiol. журн. СССР, т. 72, № 6, с. 843—845, 1986.
7. Хватова Е. М., Доведова Е. Л., Михалева И. И. Нейрохимия, т. 6, с. 57—63, 1987.
8. Подольский И. Я.—В кн.: Нейромедиаторные механизмы памяти и обучения, Пушнину, с. 59, 1984.
9. Попова Н. С., Качалова Л. М.—В кн.: Адаптивные и компенсаторные процессы в головном мозге, с. 94, М., 1986.
10. Адрианов О. С., Доведова Е. Л., Всков Р., Ракич Л., Ербанова А., Панцешева Н. В сб.: Труды I съезда психиатров соц. стран, с. 162—168, М., 1987.
11. Hestrin S. J. Biol. Chem. v. 180, p. 249—255, 1949.
12. Горкин В. З., Верскаина А. В., Гриднева Л. И.—В кн.: Современные методы в биохимии, т. 2, с. 155—157, М., Медицина, 1968.
13. Popov N., Rosler V., Thiemann C., Mathies H. Acta Biol. et Med. Germ., B. 26, S. 239—241, 1971.
14. Козан Б. М., Нечасов Н. В. Лаб. дело, т. 5, с. 301—303, 1979.
15. Доведова Е. Л., Ашмарин И. П.—Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 93, с. 56—58, 1982.

16. Попова Н. С., Доведова Е. А., Вскова Р., Якович Б., Адрианов О. С., Ракич Л.— В кн.: Интегративная деятельность мозга, с. 140—142, М., 1988.
17. Крыжановский Г. Н., Шандра А. А., Годлевский Л. С., Карпова М. Н., Михалева И. И., Иванов В. Т. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 14, с. 582—585, 1987.
18. Доведова Е. А., Попова Н. С., Качалова А. М. Нейрохимия, т. 2, с. 138, 1983.
19. Шоу Д. А.—В кн.: Нейротрансмиттерные системы, с. 196—201, М., Медицина, 1982.
20. Вальдман А. В. Вопр. мед. химии, т. 30, с. 56, 1984.
21. Москвитина Т. А., Камышанская Н. С., Горкин В. З. Вопр. мед. химии, т. 32, с. 98—102, 1986.

Поступила 15. VI 1988

Нейропептиды. Методология. 370 с., 1989 г.

Neuropeptides A. Methodology (ed. G. Fink and A. J. Harmar) J. Wiley and Sons, Baffins Lane, England, 370 p., 1989.

Книга вышла в серии IBPO Handbook Series (Методы нечрснаук, т. 11). В этом томе содержится детальное описание современных методов для изучения нейропептидов, используемых в ведущих лабораториях мира. Рассматриваются, в частности, такие вопросы, как технология для молекулярной биологии, гибридизация *in situ*, иммуоцитохимия, морфометрия ультраструктур и определение высвобождения нейропептидов *in vivo* и *in vitro*. В книге затрагиваются также биохимические и электрофизиологические методы изучения взаимодействия между нейропептидами и рецепторами и системами вторичных мессенджеров. Подобные подходы на биохимическом и клеточном уровне приводят в конечном итоге к оценке методов для изучения поведения организма в целом.



ДЛИТЕЛЬНОЕ СНИЖЕНИЕ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В МОЗГУ КРЫС ПРИ ВВЕДЕНИИ НЕЙРОПЕПТИДОВ

ГУЛЯЕВА Н. В., БИКБУЛАТОВА Л. С., ОБИДИН А. Б.,
АИРАПЕТЯНЦ М. Г., КРУГЛИКОВ Р. И.

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии АН СССР, Москва

Введение нейропептидов АКТГ₄₋₇ или дез-глицил-аргинин-вазопрессина (60 мкг/кг массы внутривентрикулярно) вызывало снижение содержания продуктов ПОЛ в мозгу и сыворотке крови белых крыс. Эффект проявлялся уже через 0,5 ч после инъекции пептидов и достигал максимума через 6 ч. Через 7 дней после инъекции уровень продуктов ПОЛ почти нормализовался в сыворотке, но составлял 30—60% от контрольных значений в мозгу. Изменение содержания продуктов ПОЛ находилось в обратной корреляции с супероксидперехватывающей активностью мозга и сыворотки крови. В липидных экстрактах мозга содержание суммарных фосфолипидов вначале возрастало (максимум через 1 ч), затем постепенно снижалось. Уровень холестерина изменялся по-разному в зависимости от введенного нейропептида: после введения АКТГ вначале возрастал (максимум через 2 ч), затем снижался, а после введения вазопрессина вначале немного снижался, а затем постепенно возрастал, достигая максимума через 3—7 дней.

Несмотря на многочисленные исследования, механизмы действия нейропептидов (НП) на ЦНС еще во многом остаются неясными. Открытым, в частности, остается вопрос о связи ПОЛ с биологическими эффектами НП. Между тем, имеются определенные основания предполагать наличие такой связи. Это прежде всего многочисленные данные об изменениях функционального состояния ЦНС под влиянием НП [1]. Однако хорошо известно, что изменения функционального состояния ЦНС сопровождаются изменениями ПОЛ [2, 3]. Вместе с тем, не исключено и непосредственное влияние НП на ПОЛ.

Задачей настоящей работы было исследование влияния введения крысам НП на интенсивность СРО и некоторые липидные показатели мозга крыс в динамике.

Материалы и методы

В работе использовали 80 белых беспородных крыс-самцов массой около 150 г. Животным внутривентрикулярно вводили АКТГ₄₋₇ (синтезирован в Институте молекулярной генетики АН СССР, Москва) или дез-

глицил-аргинин-вазопрессин (синтезирован в Институте органического синтеза АН ЛатвССР, Рига) в дозе 60 нг/кг массы тела. Через 0,5 ч и 7 суток животных декапитировали, извлекали мозг и гомогенизировали кору больших полушарий с 4-кратным объемом ледяного изотонического нейтрализованного раствора хлорида натрия, содержащего 10^{-4} М ЭДТА. Гомогенат центрифугировали 15 мин при 2500 об/мин и в супернатанте определяли содержание продуктов ПОЛ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [4], конъюгированных диенов [5], а также супероксиддисмутазную активность [6]. Липиды экстрагировали хлороформ-метанольной смесью по Folch и соавт. [7], в липидных экстрактах определяли содержание флуоресцирующих продуктов ПОЛ—оснований Шиффа [8] и после разделения методом ТСХ содержание холестерина, суммарных индивидуальных фосфолипидов [9]. Дополнительно продукты ПОЛ [4, 5] и неферментативную супероксидперехватывающую активность [6] определяли в сыворотке крови, полученной при декапитации.

Результаты исследования

На рис. 1 представлена динамика изменения уровня ПОЛ при введении НП. Уже через 30 мин начинается достоверное снижение содержания продуктов ПОЛ в мозгу, сопровождающее резкую активацию перехвата супероксидных радикалов. Минимальный уровень ТБК-реактивных продуктов и конъюгированных диенов (примерно на порядок ниже нормы) достигается через 6 ч, а затем эти показатели медленно возрастают (через 7 дней до 25—35% контрольного уровня). Содержание конечных флуоресцирующих продуктов ПОЛ снижается более медленно и на 7-е сутки тенденции к восстановлению еще отсутствует. Общая супероксидперехватывающая активность мозга, включающая ферментативный (супероксиддисмутаза) и неферментативный компоненты, возрастает, достигая максимума через 6 ч (в 7—8 раз выше нормы), а затем снижается и к 7-м суткам превышает исходный уровень примерно в 2 раза. Динамика ТБК-реактивных продуктов (конъюгированных диенов) представляет собой зеркальное отражение динамики перехвата супероксидных радикалов в мозгу. Действие обоих НП мало различается, хотя содержание флуоресцирующих продуктов ПОЛ при введении АКТГ, как правило, несколько выше, а дисмугирующая активность соответственно ниже (рис. 1).

Введение НП вызывает снижение уровня ПОЛ и активацию неферментативной супероксидперехватывающей активности и в сыворотке крови (рис. 2). Как и в мозгу, максимальное снижение ПОЛ отмечается через 6 ч после введения НП, однако, в отличие от мозгу, через 7 дней происходит значительная нормализация ПОЛ и супероксидперехватывающей активности.

Ингибирование ПОЛ при введении НП сопровождается существенными изменениями липидных характеристик мозгу (рис. 3). Содержание суммарных фосфолипидов начинает возрастать сразу после введения НП, достигает максимума (на 35—42% выше контроля) через 60 мин, а затем снижается и через 7 суток становится на 9—13% ниже контрольного.

Окисляемость фосфолипидов (отношение легкоокисляемые фосфолипиды: фосфатидилсерин+фосфатидилэтаноламин+фосфатидилинозит+кардиолипин; трудноокисляемые фосфолипиды: сфингомиелин+фосфатидилхолин) в первые 30 мин снижается на 6—12%, а затем медленно увеличивается, составляя через 7 суток 113—128% от контроля. В отличие от этих показателей, которые изменяются сходным образом при введении обоих НП, динамика содержания холестерина при введении каждого из НП неодинакова. В результате действия АКТГ содержание холестерина

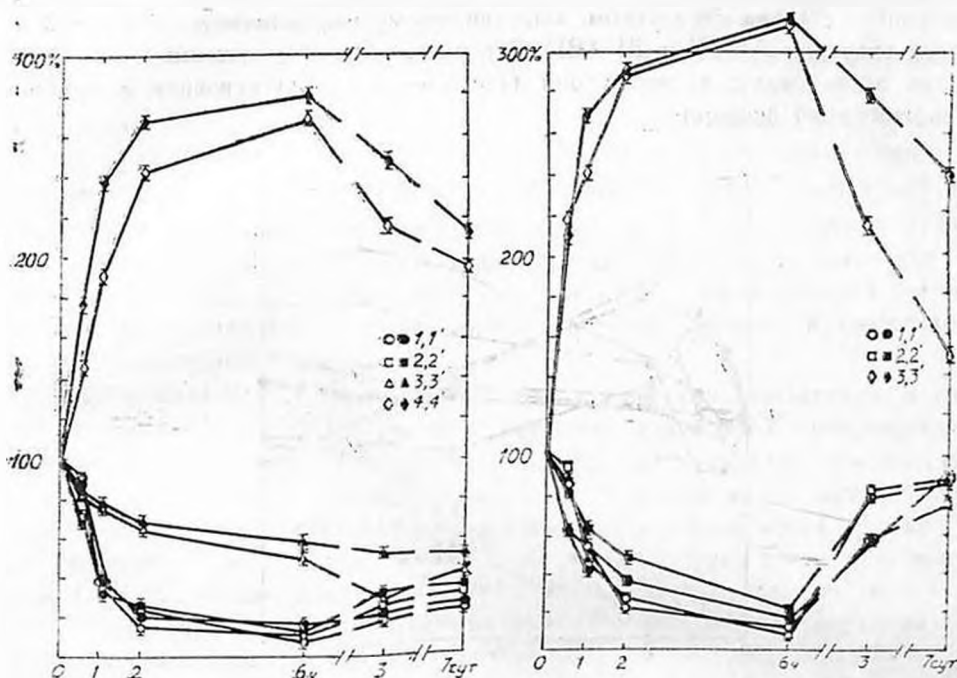


Рис. 1. Содержание продуктов ПОЛ: ТБК-реактивных (1, 1'), конъюгированных диенов (2, 2'), оснований Шиффа (3, 3'), и супероксиддисмутазная активность (4, 4') в гомогенатах коры больших полушарий мозга крыс после введения АКТГ₄₋₇ (1, 2, 3, 4) и дез-глицил-аргинин-вазопрессина (1', 2', 3', 4'). По оси ординат—содержание продуктов ПОЛ, %. За 100% приняты соответствующие показатели у контрольных животных.

По оси абсцисс—время после введения нейропептидов
Рис. 2. Содержание продуктов ПОЛ (1, 1', 2, 2') и неферментативная супероксиддисмутазная активность (3, 3') в сыворотке крови после введения нейропептидов. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1

постепенно возрастает (максимальный уровень в 1,5 раза выше контрольного через 2 ч), а затем снижается таким образом, что через 3 суток достигается контрольный уровень, а через 7 суток содержание холестерина уменьшается еще на 20%. Иные результаты получены при введении дез-глицил-аргинин-вазопрессина (ДГАВП). Через 0,5 ч содержание холестерина немного снижается, а затем прогрессивно возрастает до 7-х суток (в 1,5 раза выше контроля). Соответственно отношение холестерин:фос-

фолипиды после введения АКТГ вначале остаются неизменными в результате одинакового увеличения уровня холестерина и фосфолипидов, затем постепенно возрастает (через 2 ч на 55%), а потом снижается (через 7 суток до 93% от исходного значения). ДГАВП вначале резко снижает значение отношения (на 25% через 0,5 ч), но уже через 2 ч оно превышает исходный уровень на 22% и продолжает возрастать (через 6 ч выше нормы на 62%, через 3 суток на 71%, через 7 суток на 62%).

Дополнительно были проведены исследования показателей ПОЛ и липидного состава синапсом, выделенных из мозга животных через 2 ч после введения АКТГ и ДГАВП. Все изменения, обнаруженные в гомогенатах коры больших полушарий (рис. 1—3) присутствовали в грубой синапсомной фракции.

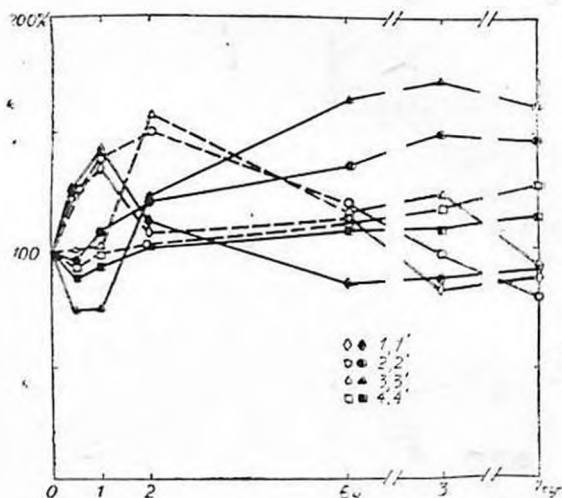


Рис. 3. Содержание фосфолипидов (1, 1'), холестерина (2, 2'), отношение холестерин/фосфолипиды (3, 3'), окисляемость фосфолипидов (4, 4') в липидных экстрактах коры больших полушарий после введения АКТГ 4-7 (1, 2, 3, 4) и дез-глицил-аргинин-вазопрессина (1', 2', 3', 4'). Остальные обозначения те же, что и на рис. 1

Обсуждение результатов

Таким образом, введение АКТГ и ДГАВП вызывает подавление ПОЛ в ткани мозга и крови крыс. В мозгу эти изменения сохраняются существенно дольше, чем в крови (в сыворотке крови содержание продуктов ПОЛ через 7 суток после введения НП почти восстанавливается, а в мозгу сохраняется на низком уровне, хотя тенденция к восстановлению имеется). Ингибирование ПОЛ сопровождается активацией систем перехвата супероксидных радикалов в мозгу и крови, где уровни продуктов ПОЛ и супероксидперехватывающая активность находятся в реципрокных взаимоотношениях.

Введение НП приводит к кратковременному накоплению фосфолипидов в мозгу. Для содержания холестерина характерно наличие периода

его повышения после введения НП, однако динамика этого показателя существенно различается в зависимости от природы введенного НП. АКТГ вызывает быстрое и кратковременное накопление холестерина в мозгу, а при введении ДГАВП содержание холестерина возрастает не сразу, однако повышенный уровень сохраняется длительное время (не менее 7 дней). Резкая разница в динамике холестерина при введении АКТГ или ДГАВП обуславливает и различия в динамике отношения холестерин:фосфолипиды—показателя, характеризующего функциональные свойства биологических мембран.

В соответствии с предложенным Е. Б. Бурлаковой свободнорадикальным механизмом регуляции клеточного метаболизма, в результате ингибирования ПОЛ липиды обогащаются более лабильными, легкоокисляемыми фракциями [10], причем содержание холестерина в тканях снижается при подавлении ПОЛ (например, при введении антиоксиданта [11]). Эта схема подтверждается многими данными, в частности нашими работами об ингибировании ПОЛ в периоды долговременной адаптации и компенсации [12, 13], когда ингибирование ПОЛ сопровождается накоплением фосфолипидов, главным образом легкоокисляемых, и снижением уровня холестерина в мозгу.

Представленные в настоящей работе данные свидетельствуют о наличии при введении НП условий, в которых нарушается свободнорадикальный механизм регуляции по схеме [10], либо реализуется иная, не обнаруженная ранее система регуляции ПОЛ и липидного состава мембран мозга, специфичная для определенного состояния мозга. В любом случае необходимо глубокое исследование молекулярных основ ингибирования ПОЛ, сопровождающегося накоплением холестерина при введении НП, поскольку именно такое сочетание показателей может сопровождать специфические эффекты НП на состояние ЦНС.

NEUROPEPTIDE ADMINISTRATION INDUCES A LONG-LASTING DECREASE OF LIPID PEROXIDATION IN RAT BRAIN

GULYAEVA N. V., BIKBULATOVA L. S., OBIDIN A. B., AIRAPETYANZ M. G., KRUGLIKOV R. I.

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

The administration of neuropeptides like ACTH₁₋₇ or des-glycyl-arginine-vasopressin (60 ng/kg body weight, intraperitoneally) resulted in a drastically decreased level of the free-radical lipid peroxidation (FRLPO) in brain and blood serum of albino rats. The effect was distinct 30 minutes after peptide injection and attained its peak after 6 hours. Seven days after the injection, the levels of free-radical lipid peroxidation products became practically normal in the serum but still equaled 30–60% of the control values in the brain. The levels of FRLPO products inversely correlated with the superoxide scavenging

activity in the brain and blood serum. In lipid extracts prepared from the brain the level of total phospholipids initially increased (maximally after 1 hour) and then gradually diminished. Cholesterol level varied in different ways depending on the administered neuropeptide: after ACTH administration it increased (maximal effect observed after 2 hours) and then decreased, whereas after vasopressin administration it decreased slightly and then gradually increased attaining maximum after 3—7 days.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кругликов Р. И.—В сб.: Механизмы памяти, с. 78—86. Л., Наука, 1987.
2. Таранова Н. П., Нилова Н. С. Физиол. журн. СССР, т. 72, № 8, с. 1065—1068, 1986.
3. Крыжановский Г. Н., Никушкин Е. В., Тупсев И. Л., Браславский В. Е. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 103, № 4, с. 396—398, 1987.
4. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. Anal. Biochem., v. 95, № 2, p. 351—358, 1979.
5. Костюк В. А., Потапович А. И., Лунев Е. Ф. Вopr. мед. химии, т. 30, № 4, с. 125—127, 1983.
6. Nishikimi M., Rao N. A., Yagi K. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 46, № 2, p. 849—854, 1972.
7. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. H. J. Biol. Chem., v. 226, № 3, p. 497—509, 1957.
8. Fletcher D. L., Dillard C. J., Tappel A. L. Anal. Biochem., v. 52, № 1, p. 1—9, 1973.
9. Osborn N. N.—In: Microchemical analysis of nervous tissue, p. 122—152. New York, Pergamon Press, 1974.
10. Бурлакова Е. Б.—В сб.: Свободнорадикальное окисление липидов в норме и патологии, с. 18—19. М., Наука, 1976.
11. Бурлакова Е. Б., Терехова С. Ф.—В сб.: Свободнорадикальное окисление липидов в норме и патологии, с. 22—24, М., Наука, 1976.
12. Гуляева Н. В., Лещина И. П., Обидин А. Б.—В сб.: Фундаментальные достижения нейрохимии—медицине, с. 181—182. Горький, 1987.
13. Обидин А. Б., Ермакова И. В., Лосева Е. В., Хоничева Н. М., Гуляева Н. В.—В сб.: Фундаментальные достижения нейрохимии—медицине, с. 198—199, Горький, 1987.

Поступила 4. V 1988



КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 612.06+612.821.7

СОДЕРЖАНИЕ АНТИОКСИДАНТОВ В СИНАПТОСОМАХ
КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС
ПРИ НАРУШЕНИИ СНА

ТАРАНОВА Н. П., НИЛОВА Н. С.

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

Согласно современным представлениям, сон является активным состоянием [1, 2], особенно необходимым для восстановления тех минорных альтерационных изменений биологических мембран (в частности синаптических), которые развиваются в процессе бодрствования [1]. В связи с этим представляет интерес исследование процессов свободнорадикального окисления мембранных липидов при сне и его нарушениях, поскольку в ходе развития ПОЛ существенно меняются свойства липидного компонента мембраны [3]. Следствием изменения уровня ПОЛ является функционально-структурная перестройка мембраны, так как состояние свободнорадикального окисления мембранных липидов определяет гидрофобно-гидрофильный баланс мембраны, ее проницаемость и активность мембраносвязанных ферментов. Регулятором ПОЛ в клетке служит система антиоксидантной защиты, включающая систему антиоксидантных ферментов и группу низкомолекулярных антиоксидантов (АО).

Ранее было показано, что нарушение сна—лишение его парадоксальной фазы (ПФС) в течение 24 ч—приводит к снижению содержания продуктов ПОЛ в синаптосомах крыс при росте антиоксидантной активности (АОА), выражающейся в увеличении активности супероксиддисмутазы [4]—одного из наиболее активных антиоксидантных ферментов. Для полноты характеристики АОА синапсом при нарушении сна казалось интересным исследовать уровень низкомолекулярных АО в этих условиях.

В живых клетках содержатся как водорастворимые АО (аскорбиновая кислота, глутатион и др.), так и жирорастворимые АО (токоферол, убихинон, филохинон). Несмотря на то, что все АО прямого действия регулируют скорость ПОЛ на стадии инициации и обрыва цепей [3], особенное значение для функционирования мембран имеют жирораство-

римые АО и, в первую очередь, токоферол. Кроме непосредственного влияния на скорость ПОЛ, токоферол обеспечивает структурно-функциональную стабильность биологических мембран [5], ограничивая молекулярную подвижность липидного слоя мембраны [6] и образуя комплексы с остатками жирных кислот мембранных липидов [7].

Целью работы было исследование содержания водорастворимых и жирорастворимых АО синапсом и гомогената коры больших полушарий головного мозга крыс при лишении животных ПФС в течение 24 ч.

Опыты ставили на белых крысах линии *Wistar* массой 160—180 г. Лишения ПФС достигали помещением животных на кубики, окруженные водой [8]. Фракцию синапсом коры больших полушарий головного мозга крыс получали по методу Hajos [9], содержание АО определяли по методу Glavind [10]. Принцип метода состоит в том, что взаимодействие свободного радикала α , α -дифенил- β -пикрилгидразила (ДФПГ) с антиоксидантами сопровождается уменьшением поглощения при 517 нм вследствие превращения свободного радикала в дифенилпикрилгидразин. Уменьшение оптической плотности при 517 нм пропорционально концентрации АО. Экстракцию жирорастворимых АО из нервной ткани производили хлороформом, водорастворимых—водой. Калибровочную кривую для жирорастворимых АО строили по α -токоферолу, для водорастворимых—по аскорбиновой кислоте. Содержание белка определяли по методу Miller [11], общих липидов—по методу Тарановой, Говоровой [12].

Исследование АО проводили в гомогенате и синапсом коры больших полушарий головного мозга крыс. Метод, примененный в настоящем исследовании [10], позволяет определить и сопоставить содержание как водорастворимых, так и жирорастворимых АО. Для сравнения их количество в обоих случаях выражали в мкэкв./мг белка.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что содержание водорастворимых АО более чем на порядок выше, чем жирорастворимых как в гомогенате, так и в синапсом (таблица). Абсолютное содержание жирорастворимых АО в гомогенате и в синапсом близко по величине, однако во фракции синапсом доля жирорастворимых АО составляет 8% всей суммы АО, а в гомогенате эта величина достигает всего лишь 2%. Это хорошо согласуется с приведенными выше данными об особой роли жирорастворимых АО в функционировании мембран.

Данные литературы по содержанию различных представителей водорастворимых АО весьма фрагментарны. Использованный нами метод дает более полное представление об общем фонде водорастворимых АО в исследуемой ткани. Что касается жирорастворимых АО, то их качественный состав более ограничен и представлен преимущественно α -токоферолом и убихиноном. Однако если перевести в сопоставимые единицы наши результаты и результаты определения α -токоферола флуорометрически [13], то окажется, что примененный нами метод [10] дает более высокие цифры содержания жирорастворимых АО в нервной ткани. Аналогичные результаты получены другими авторами [14], также использовавшими метод определения содержания жирорастворимых АО [10].

который менее специфичен, чем флуорометрические методы определения α -токоферола, и вследствие этого может дать более высокие цифры. Сопоставительный анализ результатов, полученных разными авторами в настоящее время весьма затруднителен из-за отсутствия унификации условий экстракции и определения жирорастворимых АО.

Таблица

Содержание антиоксидантов в коре больших полушарий головного мозга крыс при лишении парадоксальной фазы сна в течение 24 ч

Определяемые компоненты	Гомогенат		Синапсомы	
	контроль	лишение ПФС 24 ч	контроль	лишение ПФС 24 ч
Водорастворимые антиоксиданты (мкэкв./мг белка)	$0,0535 \pm 0,0020$ (12)	$0,0547 \pm 0,0017$ (12)	$0,0132 \pm 0,0008$ (10)	$0,0127 \pm 0,0008$ (10)
Жирорастворимые антиоксиданты (мкэкв./мг белка)	$0,0011 \pm 0,0001$ (12)	$0,0090 \pm 0,0004$ (12)	$0,0012 \pm 0,0001$ (10)	$0,0015^* \pm 0,0001$ (10)
Липид/белок (общие липиды мг/мг белка)	$0,270 \pm 0,006$ (12)	$0,27 \pm 0,01$ (12)	$0,290 \pm 0,006$ (10)	$0,290 \pm 0,007$ (10)
Жирорастворимые антиоксиданты (мкэкв./мг липидов)	$0,0040 \pm 0,0002$ (12)	$0,0036 \pm 0,0001$ (12)	$0,0042 \pm 0,0003$ (10)	$0,0053^* \pm 0,0003$ (10)

Примечание. * статистически достоверное отклонение ($p < 0,05$); в скобках указано число опытов.

Из таблицы следует, что лишение ПФС в течение 24 ч не вызывало изменения содержания АО в гомогенате. Принимая во внимание, что ранее нами было показано ингибирование начальных этапов ПОЛ, в гомогенате коры больших полушарий головного мозга крыс при нарушении сна [4], можно предположить, что в ткани коры преобладающим механизмом ингибирования ПОЛ при лишении ПФС является активация ферментов антиоксидантной защиты, а не снижение количества низкомолекулярных АО. В синапсомы при лишении крыс ПФС содержание водорастворимых АО не изменяется, но количество жирорастворимых АО возрастает на 25%. Как упоминалось выше, для удобства сопоставления данных о содержании водо- и жирорастворимых АО результаты выражали в мкэкв./мг белка. Однако более правильным является выражение концентрации жирорастворимых АО в расчете на 1 мг липидов. Определение количества общих липидов показало, что нарушение сна не влияет на соотношение липид/белок (таблица). Перерасчет содержания жирорастворимых АО на 1 мг липидов подтвердил, что лишение крыс ПФС имеет следствием увеличение их количества в среднем на 26%.

Таким образом, настоящие результаты показывают, что эффект лишения ПФС проявляется специфически только в увеличении количества жирорастворимых АО, непосредственно связанных с синаптическими мем-

бранами. Низкомолекулярные АО являются составной частью системы антиоксидантной защиты клетки. Увеличение содержания АО в синаптосомах при лишении ПФС можно рассматривать как один из механизмов, приводящих к выявленному ранее снижению уровня ПОЛ синапсом при нарушении сна [4]. Возможно, что, помимо своей роли ловушки свободных радикалов, α -токоферол может иметь дополнительное значение как стабилизатор синаптических мембран [7]. Было показано, например, что α -токоферол стабилизирует трансмембранный потенциал синапсом при повреждающем действии фосфолипаз A_2 и C [15]. Структурирующее действие α -токоферола может быть связано с взаимодействием метильных групп его фитильной цепи с цис-ненасыщенными двойными связями жирнокислотных остатков липидного бислоя, сопровождающимся изменением микровязкости мембранных липидов. Если увеличение содержания жирорастворимых АО синапсом при лишении ПФС также способствует стабилизации синаптических мембран, то это можно рассматривать как компенсаторный механизм приспособления к стрессу, вызванному нарушением сна.

THE LEVEL OF ANTIOXIDANTS IN RAT BRAIN SYNAPTOSOMES UNDER SLEEP DEPRIVATION

TARANOVA N. P., NILOVA N. S.

Pavlov Institute of Physiology, USSR Academy of Sciences, Leningrad

REM-sleep deprivation of animals for 24 hours resulted in an increased level of lipid-soluble antioxidants in synaptosomes prepared from the rat cerebral cortex; in contrast the level of water-soluble antioxidants showed no changes. The level of antioxidants did not change in the homogenate of rat brain cortex after sleep deprivation.

ЛИТЕРАТУРА

1. Демин Н. Н., Коган А. Б., Моисеева Н. И. Нейрофизиология и нейрохимия сна. Л., Наука, 1978.
2. Giuditta A. — In: Biochemical correlation of brain structure and function (ed A. N. Davison), p. 293—337, L.—N. Y.: San Francisco, Academic Press, 1977.
3. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., Наука, 1972.
4. Таранова Н. П., Нилова Н. С. Физиол. журн. СССР, т. 72, с. 1065—1068, 1986.
5. Tappel A. L. Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 203, p. 12—14, 1972.
6. Храпова Н. Г. — В кн.: Биохимия липидов и их роль в обмене веществ (под ред. С. Е. Северина), с. 147—155, М., Наука, 1981.
7. Ерин А. Н., Спирин М. М., Табидзе Л. В., Коган В. Е. Биохимия, т. 48, с. 1855—1861, 1983.
8. Jouvet D., Vimont P., Delorme F., Jouvet M. C. r. Soc. biol., v. 158, p. 756—759, 1964.

9. Hajos F. Brain Res., v. 93, p. 485—489, 1975.
10. Glavind J. Acta chem. scand., v. 17, p. 1635—1640, 1963.
11. Miller G. L. Anal. chem., v. 31, p. 964, 1959.
12. Тиранова Н. П., Гозорова Л. Б. Вopr. мед. химии. т. 33, вып. 2, с. 132—136, 1987.
13. Тупеев И. Р., Бордюков М. М., Крыжановский Г. Н., Никушкин Е. В. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 100, с. 538—541, 1985.
14. Плотников М. Б., Лобанов А. А., Иванова В. В. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 105, с. 677—679, 1988.
15. Erin A. N., Gorbunov N. N., Brusovanic V. L., Tyurin V., Prilipko L. L. Brain Res., v. 398, p. 85—90, 1985.

Поступила 6. IV 1988

Белки нейронов и глии. Структура, функция и клиническое применение, 398 с., 1988.

Neuronal and Glial Proteins. Structure, Function and Clinical Application (ed. P. J. Marangos, R. M. Coen and I. C. Campbell) Academic Press, San Diego, CA, USA, 398 p., 1988.

Последние достижения в области очистки белков и молекулярной биологии позволили приступить к изучению белков мозга в новом, информационном плане. В рассматриваемой книге собраны обзоры по всем охарактеризованным к настоящему времени белкам нейронов и глии, включая антиген Thy-1, факторы роста, PGP-9,5 и связанные с миелином гликопротеины. Возможности клинического применения белков рассматриваются преимущественно в таких областях, как маркеры опухолей, дифференциация и маркера клеток определенных типов. Книга заинтересует нейробиологов и молекулярных биологов, изучающих молекулярные аспекты деятельности мозга и нервной системы, а также исследователей, занимающихся потенциальным клиническим использованием белков мозга. Основными разделами книги являются: «Методы идентификации и модификации белков мозга», «Растворимые белки нервной системы».



УДК 612.822.1

ДЕЙСТВИЕ НЕЙРОГОРМОНА «С» НА ВЫСВОБОЖДЕНИЕ И ЗАХВАТ [^3H]НОРАДРЕНАЛИНА В СИНАПТОСОМАХ ГИПОТАЛАМИЧЕСКОЙ ОБЛАСТИ МОЗГА КРЫС

АРАКЕЛЯН А. Н., АРМЕНЯН А. Р., СРАПИОНЯН Р. М., КАРАПЕТЯН Р. О.,
СААКЯН Ф. М., СААКЯН С. А., ГАЛОЯН А. А.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

В отделе гормонов Института биохимии АН АрмССР обнаружены 4 пептидных нейрогормона («К», «С», «Г» и гексапептид), которые образуются в нейросекреторных гранулах клеток магнoцеллюлярных ядер гипоталамуса крупного рогатого скота и оказывают регулирующее влияние на сердечную деятельность [1]. В дальнейшем были выделены специфические коронароактивные белки, являющиеся предшественниками и носителями этих нейрогормонов [2]. Исследования субклеточного распределения последних показали локализацию их в синапсосомах гипоталамуса и коры мозга [3]. Из кардиотропных нейрогормонов наиболее подробно изучен нейрогормон «С» (нС). Установлено, что нС—водоростворимое низкомолекулярное соединение с высокой коронарорасширяющей способностью. Он расширяет артерио-венозные анастомозы, открывая закрытые резервные сосуды сердца [4], является активным регулятором ряда метаболических процессов в мозгу и висцеральных органах, усиливает гликолиз, гликогенолиз [5, 6], полностью ингибирует ФДЭ сАМР и сGMP сердца и мозга быка, тем самым повышая уровень циклических нуклеотидов внутри клетки [7].

Гипоталамическая область богата моноаминергическими нервными окончаниями, следовательно, синапсосомная локализация предшественников вышеупомянутых нейрогормонов предполагает возможное участие их в регуляции обмена нейромедиаторов. Исходя из этого, было интересно изучить влияние нС на захват и высвобождение [^3H]норадреналина (^3H]НА) в синапсосомах гипоталамической области.

Синапсосомы из гипоталамической области мозга крыс выделяли по методу Hajos [8]. Полученную синапсосомную суспензию инкубировали 10 мин в присутствии [^3H]НА ($5 \cdot 10^{-8}$ М) и затем по 1 мл переносили в суперфузионные камеры на миллиметровые мембранные фильтры с диаметром пор 0,65 мкм, тип ДА. Высвобождение [^3H]НА изучали супер-

фузионным методом Raiteri и соавт. [9]. Суперфузию проводили со скоростью 1 мл/мин. Степень высвобождения (i) [^3H]НА рассчитывали по отношению радиоактивности суперфузионной среды к оставшейся радиоактивности синапсом. Захват [^3H]НА изучали путем переноса и последующей промывки 0,15 М NaCl инкубированной суспензии ($0,77 \pm 0,07$ мг белка/мл) на миллипоровые фильтры. Параллельно проводили инкубацию синапсом при 0° для вычитания неспецифического захвата. Радиоактивность синапсом и среды измеряли после добавления 0,5 мл этанола и 10 мл диоксанового сцинтиллятора Брея на жидкостном сцинтилляционном счетчике «Intertechnique-SL-4221» (Франция). Подробности методов исследований описаны в работе Армениян и соавт. [10].

Синапсомы инкубировали в Krebs-бикарбонатном буфере pH 7,2—7,4 со следующим составом (в mM): NaCl—113; KCl—4,75; KH_2PO_4 —1,2; MgSO_4 —1,2; NaHCO_3 —25; CaCl_2 —2,5, глюкоза—11,5. Для предотвращения распада НА в буфер добавляли ипразид ($6 \cdot 10^{-4}$ М) и витамин С ($1,14 \cdot 10^{-3}$ М; «Sigma», США). В K^+ -обогащенной среде (40 mM) изотоничность среды сохраняли изомолярным замещением NaCl на KCl.

Использовали [^3H]НА (39 Ки/мМ; «Amersham», Англия). Белок определяли по методу Lowry и соавт. [11]. Статистическую обработку результатов проводили с использованием t -критерия Стьюдента.

Выделен нС из состава низкомолекулярных соединений уксуснокислого экстракта обезжиренной гипоталамической ткани. Препарат очищен по разработанной схеме, включающей ИОХ на ДЭАЭ-ц, гель-фильтрацию через сефадекс G-23, распределительную хроматографию на бумаге FN-11 в системе растворителей бутанол-уксусная кислота-вода (4:1:1) и повторную гель-фильтрацию через глицидинамидированный сефадекс [12].

За единицу активности (Е) нС принято то количество препарата, которое ингибирует 1 мЕ ФДЭ cAMP гомогената мозга крыс за 1 мин.

Действие различных концентраций нС на K^+ -вызванное высвобождение [^3H]НА в синапсомах гипоталамической области. После инкубации синапсом в присутствии [^3H]НА определенное количество суспензии переносили в суперфузионные камеры и промывали нормальным буфером, а с 12-й мин добавляли K^+ -обогащенную среду (40 mM), при этом высвобождение [^3H]НА усиливалось на 175% (рис., контроль). На фоне усиленного высвобождения [^3H]НА изучали концентрационную зависимость действия нС. Исследовали влияние нС в концентрациях 1,5; 3; 7; 14; 28 и 56 мЕ/мл.

Результаты проведенных исследований показали, что самая низкая—1,5 мЕ/мл (рис., а—2) и самая высокая—56 мЕ/мл (рис., б—2) концентрации нС не вызывали статистически достоверных изменений K^+ -вызванного высвобождения [^3H]НА из синапсом.

Примечательно, что остальные используемые концентрации нС подавляли K^+ -вызванное высвобождение [^3H]НА. Как показывают данные, представленные на рисунке, статистически достоверное подавление от концентраций нС 3, 7 и 28 мЕ/мл (рис., в—2, г—2, е—2) составляло

42%, тогда как от 14 мЕ/мл—50% (рис., д—2) по сравнению с контролем.

Таким образом, полученные нами результаты показали, что порог действия нС на K^+ -вызванное высвобождение $[^3H]НА$ в гипоталамических синапсах обнаруживается, начиная с концентрации 3 мЕ/мл, достигает максимума при концентрации 14 мЕ/мл и далее наблюдается постепенное уменьшение его эффекта.

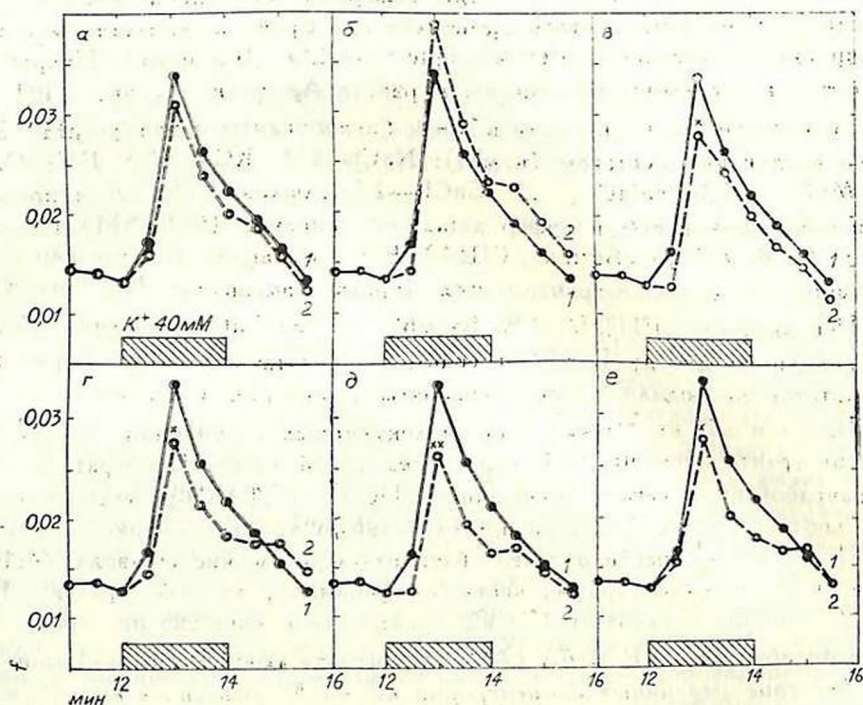


Рис. Действие различных концентраций нейрогормона «С» на K^+ -вызванное высвобождение $[^3H]$ норадреналина из синапсом гипоталамической области. По оси абсцисс—время суперфузии в мин, по оси ординат—степень высвобождения $[^3H]$ норадреналина (f). 1—контроль; 2—нейрогормон «С»: а—1,5 мЕ/мл; б—56 мЕ/мл; в—3 мЕ/мл; г—7 мЕ/мл; д—14 мЕ/мл; е—28 мЕ/мл. Нейрогормон «С» добавлен одновременно с K^+ -обогащенной (40 мМ) средой. Средние данные 5–9 опытов; стандартное отклонение не более 10%; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Влияние различных концентраций нС на специфический захват $[^3H]НА$ синапсом гипоталамической области. Результаты исследований специфического захвата $[^3H]НА$ синапсом гипоталамической области исследовали под действием нС в концентрациях 7, 14, 28 и 56 мЕ/мл.

Как видно из таблицы, все используемые нами концентрации нС не оказали заметного действия на специфический захват $[^3H]НА$.

Таким образом, как следует из полученных данных, нС (3–28 мЕ/мл) подавляет K^+ -вызванное высвобождение $[^3H]НА$ и не оказывает дейст-

вия на специфический захват его синапсосомами гипоталамической области. На основании результатов исследований, проведенных по изучению влияния кардиоактивных соединений (нейрогормоны «К», «Г» и гипоталамический гексапептид) на K^+ -вызванное высвобождение $[^3H]HA$.

Таблица

Действие разных концентраций нейрогормона «С» на захват $[^3H]$ норадреналина (в пкМ/мг белка) синапсосомами гипоталамической области мозга крыс

Контроль	Нейрогормон «С»			
	7 мЕ/мл	14 мЕ/мл	28 мЕ/мл	56 мЕ/мл
2,74±0,51 (4)	2,79±0,38 (4)	3,30±0,29 (4)	2,96±0,37 (4)	2,94±0,20 (4)

Примечание. В скобках указано количество опытов.

можно сделать вывод, что нейрогормон «К» стимулирует, а нейрогормон «Г», в зависимости от концентрации, подавляет или стимулирует K^+ -вызванное высвобождение $[^3H]HA$ [13], тогда как кардиоактивный гексапептид (10^{-5} — 10^{-7} М) подавляет этот процесс [14].

Сопоставляя полученные нами результаты, можно предположить, что нС, как и вышеупомянутые кардиоактивные нейрогормоны, участвуют в процессе пресинаптической регуляции высвобождения НА в гипоталамической области мозга.

THE EFFECT OF NEUROHORMONE «С» ON THE RELEASE AND UPTAKE OF $[^3H]$ -NORADRENALINE IN RAT BRAIN HYPOTHALAMIC SYNAPTOSOMES

ARAKELYAN L. N., ARMENYAN A. R., SRAPIONYAN R. M.,

KARAPETYAN R. H., SAHAKYAN F. M., SAHAKYAN S. A., GALOYAN A. A.

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Armenian SSR,
Yerevan

The effect of different concentrations of neurohormone «С» on the K^+ -evoked release and uptake of 3H -noradrenaline was studied with rat hypothalamic synaptosomes. The data obtained show, that neurohormone «С» in concentrations 3, 7, 14 and 28 мU/ml inhibits K^+ -evoked release of 3H -noradrenaline, whereas in concentrations of 1, 5 and 56 мU/ml it had no effect on this process. Neurohormone «С» in all concentrations tested had no effect on the uptake of 3H -noradrenaline by hypothalamic synaptosomes. Our results suggest that neurohormone «С» plays a role in presynaptic regulation affecting the release of noradrenaline in the rat brain hypothalamic region.

ЛИТЕРАТУРА

1. Галоян А. А. Докл. АН АрмССР, т. 34, с. 109—151, 1962.
2. Галоян А. А. Докл. АН АрмССР, т. 38, с. 305—308, 1964.
3. *Strapionian R. M., Sahakian F. M., Galoyan A. A.* *Neurochem. Res.*, v. 6, p. 1299—1307, 1981.
4. Абрамян С. С., Ростомян М. А., Галоян А. А. Кровообращение, т. 8, с. 13—17, 1975.
5. Галоян А. А., Алексанян С. С. Докл. АН АрмССР, т. 58, с. 183—187, 1974.
6. Галоян А. А. Вопр. биохимии мозга, Изд-во АН АрмССР, т. 13, с. 9—38, 1978.
7. Галоян А. А., Гурвиц Б. Я., Полюсян М. А. Бюл. эксперим. биол. и мед. т. 83, с. 691—693, 1977.
8. *Hajos F.* *Brain Res.*, v. 93, p. 485—489, 1975.
9. *Raiteri M., Angelini F., Levi G.* *Eur. J. Pharmacol.*, v. 25, p. 411—414, 1974.
10. Арменян А. Р., Чифликян М. Д., Бунятыан Г. Х. Вопр. биохимии мозга, Изд-во АН АрмССР, т. 14, с. 135—142, 1980.
11. *Lowry O. H., Rosebrough N. Y., Farr A. L., Randall R. J.* *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265—275, 1951.
12. Галоян А. А., Срапионян Р. М., Карапетян Р. О., Саакян С. А. Докл. АН АрмССР, т. 67, с. 176—179, 1978.
13. Арменян А. Р., Аракелян Л. Н., Срапионян Р. М., Карапетян Р. О., Саакян Ф. М., Саакян С. А., Галоян А. А. Нейрохимия, т. 6, с. 193—198, 1987.
14. Арменян А. Р., Аракелян Л. Н., Санасарян А. А., Мнджоян Е. О., Галоян А. А. Нейрохимия, т. 5, с. 218—219, 1986.

Поступила 9. VII 1987г.



ОБЗОРЫ

УДК 591.484+617.735—0.02.156+577.153

НАСЛЕДСТВЕННАЯ ДИСТРОФИЯ СЕТЧАТКИ:
ВОЗМОЖНЫЕ ПРИЧИНЫ БОЛЕЗНИ

ЭТИНГОФ Р. Н.

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

Обобщен ряд литературных материалов и некоторые собственные экспериментальные данные (получены на линии больных крыс линии Camphell) по изменениям специфических белков (родопсина, ФДЭ циклических нуклеотидов) и липидных компонентов (в основном жирные кислоты) в сетчатке и пигментном эпителии у животных, пораженных наследственной дистрофией. Рассмотрен вопрос о нарушении у этих животных (крыс) процесса фагоцитоза. Отмечено, что на ранних этапах болезни, помимо сетчатки и пигментного эпителия, имеются определенные изменения и в мозгу. Предположено, что основной причиной болезни являются изменения в сетчатке и пигментном эпителии углеводных остатков гликопротеинов, образующихся долинколзависимым путем.

Изучение пигментного ретинита людей (подобное заболевание у животных обычно называют наследственной дегенерацией или дистрофией сетчатки) представляет особый интерес в нейрохимическом плане, так как в данном случае имеют дело с необычным вариантом генетического поражения НС. Это обусловлено тем, что заболевание развивается в сетчатке, которая является дериватом мозга, но наряду с рядом подобных черт с последним характеризуется и определенными особенностями. Соответствующие подходы к изучению этой болезни своеобразны.

При наследственной дистрофии сетчатки постепенно происходит деструкция наружных сегментов палочек сетчатки, что приводит к полной слепоте. Пигментный ретинит людей—это целая группа заболеваний, протекающих неодинаково [1]. Получены линии животных (крысы, мыши, собаки и др.), на которых эта болезнь моделируется, причем её течение (темпы развития, морфологические изменения, расположение генетического локуса) у отдельных представителей различно [2, 3]. Основные экспериментальные материалы, характеризующие биохимические изменения при данном заболевании, получены на крысах и мышах.

Причина болезни неясна. Оценивая пути исследования этиологии этого заболевания, следует, по-видимому, в первую очередь учитывать

возможность нарушений специфических только для сетчатки и пигментного эпителия (ПЭ) глаза белков. Кроме того, важно, вероятно, «вычлени» те биохимические особенности этих тканей, которые отличают их от других. С этих позиций можно попытаться понять почему это генетическое поражение, в результате которого выключается или извращается синтез какого-то белка (белков), трагично именно для органа зрения.

Что касается специфических для сетчатки белков, то это прежде всего зрительный пигмент—родопсин, сосредоточенный в фоторецепторных мембранах—наружных сегментах. Другим своеобразным белком сетчатки, локализованным также в наружных сегментах, является необычная по своим свойствам ФДЭ циклических нуклеотидов, имеющая ключевое значение в развитии фоторецепторного акта [4]. Особенностью фермента является наличие в его составе специальной регуляторной субъединицы, характерной, как было показано с помощью иммунохимических методов анализа, только для ткани сетчатки [5].

Кроме белковых компонентов сетчатка, и в частности наружные сегменты, отличаются необычным жирнокислотным составом, именно преобладанием в них ненасыщенных жирных кислот [6]. Относительно недавно в наружных сегментах обнаружен и новый класс последних, характеризующихся весьма длинной цепью [7].

Из других особенностей наружных сегментов следует отметить, что они в течение всей жизни функционально связаны с клетками ПЭ глаза, с которыми непосредственно контактируют. Без этого контакта нормальное функционирование наружных сегментов невозможно, постоянно происходит их обновление за счет фагоцитоза их вершущек клетками ПЭ. При наследственной дистрофии процесс обновления наружных сегментов нарушен, причем генетический дефект может быть локализован как в сетчатке (мыши), так и в ПЭ (крысы) [8, 9].

Особенностью клеток ПЭ является наличие в их плазматических мембранах специфических рецепторов, обеспечивающих контакт с наружными сегментами. Кроме того, в этих клетках имеется и ряд специальных систем, необходимых для превращений отдельных компонентов, участвующих в фоторецепторном акте. Из приведенных данных очевидно, что при обсуждении проблемы этиологии наследственной дистрофии ПЭ представляет не меньший интерес, чем сетчатка.

Важно указать также, что при рассмотрении биохимических изменений в сетчатке и ПЭ при данном заболевании наибольший интерес имеют ранние периоды постнатальной жизни. По ходу развития болезни возможна, по-видимому, определенная компенсация возникающих нарушений, а также появление неспецифических изменений, проявляющихся как в первично пораженных, так и в других тканях больных.

В настоящем обзоре обобщен ряд данных литературы и некоторые собственные экспериментальные материалы, полученные на больных крысах линии *Campbell*. Материалы предыдущих лет кратко рассмотрены в отечественных [10, 11] и зарубежных обзорах [2, 3, 12]. Основное внимание при рассмотрении проблемы уделено изменениям, относящимся к

характерным для сетчатки и ПЭ биохимическим особенностям, то есть специфическим белкам, липидным компонентам (в основном жирным кислотам) и процессу фагоцитоза наружных сегментов клеток ПЭ.

Об изменениях специфических белков сетчатки

Представление об отсутствии различий в родопсине сетчатки у больных и здоровых индивидуумов было сформулировано относительно давно [2, 11] и подтверждено в работах последних лет в отношении белковой части зрительного пигмента. Так, например, данные такого типа были получены на больных мышах при использовании ультраиммунохимических методов анализа [13]. Серьезным подкреплением этой точки зрения являются и результаты об отсутствии существенных отличий в мРНК, кодирующих образование опсина у больных мышей [14].

Однако к настоящему времени появились новые сведения, касающиеся возможных изменений небелковой части зрительного пигмента у больных наследственной дистрофией сетчатки. Имеется единичное указание о дефекте гликозилирования родопсина у больного с пигментным ретинитом [15]. Кроме того, в нескольких сообщениях показано нарушение процесса фосфорилирования родопсина: повышение у мышей [16] и уменьшение у собак [17]. Причина этого феномена неясна. Увеличение фосфорилирования родопсина у больных мышей авторы работы склонны связывать с изменениями активности киназы, фосфорилирующей зрительный пигмент или фосфатазы, дефосфорилирующей последний [16]. Нельзя однако исключить и другое объяснение: если родопсин дефектен по своему углеводному компоненту, то очевидно, что меняется его локализация (ориентация?) в мембране и соответственно взаимодействие с ферментами. Эта точка зрения полностью подтверждается данными, полученными иммуноцитохимическим методом об изменениях локализации опсина в процессе развития болезни у мышей [18]. Учитывая, что такого же типа результаты имеются для больных крыс, а также некоторые другие факты, полученные при изучении путей гликозилирования белков сетчатки (см. ниже), можно предположить, что причиной изменений локализации родопсина являются нарушение его гликозилирования или изменения цитоскелета клетки. В связи с этим заслуживает упоминания тот факт, что еще более 20 лет тому назад основатель изучения фоторецепции в сетчатке Уолл обсуждал возможность нарушения родопсина в его «нехромоформной» области при наследственной дистрофии сетчатки [19].

С точки зрения возможного нарушения гликозилирования зрительного пигмента и соответственно его положения в мембране легко объяснить и нарушение его взаимодействия у больных мышей с антителом к родопсину [20]. Это тем более вероятно, что не установлено серьезных изменений в мРНК, кодирующей эту область полипептидной цепи опсина [14].

По поводу ФДЭ сетчатки при ее дегенерации имеется большое количество работ. Относительно старые материалы были обобщены ранее;

при этом было показано, что изменения этого фермента в сетчатке вряд ли можно рассматривать как причину заболевания крыс [2, 21]. Определенные изменения ФДЭ отмечены недавно и в ПЭ этих животных (изменена кинетика гидролиза нуклеотидов, чувствительность к ионам) [22]. Причина этих изменений, их специфичность и значимость в процессе развития болезни неясна.

Что касается других животных (мышей, собак), то роль выявленного ранее уменьшения активности ФДЭ в сетчатке мышей и свойств фермента в сетчатке собак продолжают изучать и обсуждать [3, 20, 23]. Имеющееся представление о значении накопления cGMP в качестве фактора, обуславливающего гибель клеток, оказалось неправомерным. При использовании штаммов больных мышей с различной интенсивностью развития болезни было показано отсутствие корреляции между содержанием нуклеотида, активностью ФДЭ и степенью дегенерации клеток [3, 23]. С помощью иммунохимических методов анализа была отмечена и неизменность количества ферментного белка и взаимодействия его со своим антителом у этих животных. На ранних стадиях болезни не изменялась у них и активность ФДЭ в сетчатке; ее уменьшение наблюдали лишь на более поздних этапах [20].

Из относительно новых фактов по ФДЭ сетчатки больных животных (крыс) можно отметить изменение экстрагируемости фермента из фоторецепторных мембран [24]. Специфичность этого феномена для ФДЭ как примембранного белка неясна. Отмечено также нарушение фотиндуцированной активности ФДЭ в опытах *in vitro* у крыс и мышей [16, 24]. Эти эксперименты проводят обычно при добавлении GTP или его производных, так как в процессе передачи сигнала с родопсина на ФДЭ участвует GTP-связывающий белок (трансдуцин) [4]. Установлено, что у больных животных этот белок неизменен [25]; не нарушена у них и мРНК, кодирующая его биосинтез [14]. Поскольку этот белок полноценен и мало оснований предполагать на ранних стадиях болезни нарушение самого фермента, то причиной выявленных отклонений являются, по-видимому, изменения условий взаимодействия участников реакций за счет альтерации свойств мембран. Это феномен действительно отмечен как для фоторецепторных, так и для других мембран сетчатки [26]. Причины изменений свойств мембран могут быть весьма различны, например, изменения гликопротеинов, липидных компонентов, ионных взаимодействий и т. д. Однако независимо от причин уже сейчас более или менее очевидно, что изменение некоторых свойств ФДЭ носит вторичный характер и поэтому вряд ли представляет интерес для понимания этиологии болезни.

Об изменениях липидных компонентов сетчатки и ПЭ.

Сравнение жирнокислотного состава липидов изолированных наружных сегментов сетчатки крыс и мышей, а также ПЭ крыс больных и здоровых животных было проведено в нескольких работах [27—30]. Обсуждая полученные результаты, нужно прежде всего указать на трудности ис-

следования и трактовки этого вопроса. Наружные сегменты и остальная часть сетчатки отличаются по своему жирнокислотному составу. В процессе постнатального развития в период формирования наружных сегментов происходят значительные сдвиги в составе жирных кислот. У больных крыс уже на ранних стадиях развития образуются отличающиеся по жирнокислотному составу от полноценных наружных сегментов их обломки. Отмечая те или иные различия в составе жирных кислот сетчатки или наружных сегментов у больных и здоровых животных, трудно однозначно решить вопрос, связана ли наблюдаемая разница с изменениями синтеза или превращений отдельных жирных кислот, или она определяется качеством используемых препаратов. Кроме того, при обсуждении этой проблемы нужно также учитывать возможность связывания отдельных жирных кислот «специальными» белками и их изменения в процессе развития животных [31]. Наличие белков, связывающих ненасыщенные жирные кислоты, показано и в сетчатке [32]. Интересно отметить, что один из таких белков обладал способностью к переносу производных ретинола [33], обмен которыми постоянно осуществляется между ПЭ и наружными сегментами. В то же время отмечено, что количество белков, обеспечивающих этот процесс, уменьшено у больных крыс и мышей [34, 35].

С точки зрения этиологии болезни, наибольший интерес представляет сравнение жирнокислотного состава в ПЭ крыс и сетчатке мышей (см. выше). У первых состав жирных кислот фосфолипидов не отличался в ПЭ у больных и здоровых животных на 9—11 и 12—14 дни жизни [29]. В сетчатке больных мышей отмечено уменьшение содержания докозоексаеновой кислоты фосфолипидов (основная ненасыщенная жирная кислота наружных сегментов) на 11-й день жизни и увеличение олеиновой на 20-й день. Однако поскольку эти изменения были зафиксированы уже после морфологических проявлений болезни, их следует рассматривать скорее как следствие заболевания, а не как его причину [30].

Определенные изменения в жирнокислотном составе отмечены в сетчатке и наружных сегментах и у больных крыс по сравнению с здоровыми. У последних в течение первого месяца постнатальной жизни имело место увеличение содержания ненасыщенных жирных кислот и уменьшение количества насыщенных (кроме пальмитиновой). У больных подобной картины не наблюдали и соотношение этих двух типов кислот на протяжении двух первых месяцев развития оставалось примерно одинаковым. Из анализа изменений содержания отдельных жирных кислот следует, что кислоты $\omega 3$ ряда (основная из них докозоексаеновая) до распада и исчезновения наружных сегментов у больных крыс меняются мало. Так, на 10-й день жизни в препаратах сетчатки последних содержание докозоексаеновой кислоты не отличалось от здоровых [28], а на 16-й день было лишь на 11% меньше в изолированных препаратах наружных сегментов [27]. Однако полностью исключить изменения в метаболизме этой кислоты у всех больных индивидуумов было бы преждевременно. В плазме крови больных людей показано уменьшение содержания докозоексаеновой кислоты; авторы работы не исключают, что причиной наблюдаемого

феномена может быть нарушение путей элонгации и десатурации жирных кислот при их превращениях из короткоцепочечных в длинные [36]. Действительно, на ранних этапах болезни отмечены некоторые отклонения в содержании жирных кислот 16 ряда в препаратах сетчатки и наружных сегментов у больных крыс [27, 28]. Однако причина и значимость этих изменений пока неизвестны.

Из различных превращений жирных кислот в сетчатке и ПЭ особого внимания заслуживает процесс ПОЛ при наследственной дистрофии. Докладательством интенсификации ПОЛ при данном заболевании является частое развитие у больных катаракт, что связывают с ПОЛ [37]. При искусственном форсировании ПОЛ в глазу наблюдали (также как при наследственной дистрофии) уменьшение содержания докозоекзосановой кислоты в сетчатке и изменение электроретинограммы (ЭРГ) [38].

При подробном изучении нами процесса ПОЛ в сетчатке и в других тканях организма здоровых и больных крыс было выяснено, что существенная интенсификация ПОЛ за счет эндогенных ресурсов выявляется в сетчатке больных животных только на относительно поздних сроках болезни [28, 39]. Интересно, что интенсификация ПОЛ была очевидна лишь в том случае, если процесс ПОЛ оценивали по его первичным (диеновым копьюгатам) продуктам. В то же время в очень ранних стадиях заболевания (3—5-й день) количество промежуточных продуктов ПОЛ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, оказалось в сетчатке и мозгу (но не в печени и легких) больных животных меньше, чем у здоровых. Обычно полагают, что количество этих продуктов соответствует малонового диальдегиду (МДА). Чем же можно объяснить уменьшение последнего или подобных ему соединений? Известно, что соединения такого типа легко связываются с аминогруппами разного происхождения, в том числе с ДНК, изменяя при этом ее структуру и репликационную активность [40]. МДА обуславливает и инактивацию рибонуклеазы [41]. Можно предположить, что «нехватка» альдегидных производных в сетчатке и мозгу (возможно и в ПЭ) у больных животных определяется тем, что благодаря рано проявляющейся дезорганизации клеточных структур в поражаемых тканях среди дополнительно «обнажаемых» акцепторов альдегидных групп имеются и соответствующие группы ДНК. Это должно привести к изменениям пролиферативной активности клеток тканей. Выраженность и значимость этого феномена в разных тканях может быть различной. В связи с этим представляет интерес, что изменения процесса пролиферации в ПЭ больных крыс установлены [42, 43]. Вопрос о роли МДА в этой, а также других поражаемых тканях, в регуляции пролиферативной активности нуждается в дополнительном изучении.

В целом, полученные при изучении ПОЛ данные лишь один раз показали общность биохимических черт сетчатки и мозга. На основании приведенных результатов можно также констатировать тканевую специфичность выявляемых при наследственной дистрофии сетчатки изменений, последние затрагивают не только сетчатку и ПЭ, но и мозг [28, 39]. Представляется перспективным расшифровка феномена «убыли свободной фор-

мы МДА» в пораженных тканях: это определяется и крайне разным проявлением этого феномена, и возможным участием МДА в регуляции пролиферативной активности.

Помимо жирных кислот и продуктов их окислительных превращений в последнее время наметился интерес и к некоторым интермедиатам липидного обмена в сетчатке и ПЭ больных животных. В сетчатке больных мышей отмечено уменьшение синтеза фосфатидиновой кислоты и диглицерида и увеличения синтеза триглицеридов, а также ацетилирования докозгексасиновой кислоты [44]. Особый интерес к липидным интермедиатам определяется тем, что процесс их образования весьма активно осуществляется в фоторецепторном слое сетчатки [15] и при их превращениях образуется долихол, необходимый для биосинтеза гликопротеинов (в том числе родопсина) в этой ткани [45]. При выключении долихолзависимого синтеза гликопротеинов специфическим ингибитором гликозилирования—тушкомицином наблюдают картину, весьма сходную с наследственной дистрофией [15, 46]. Следует отметить, что вообще процесс биосинтеза гликопротеинов долихолзависимым путем сложен, нельзя исключить того, что помимо долихола и ферментов, обеспечивающих гликозилирование белков, в его регуляции принимают участие и специальные белки, переносящие изопреильные остатки [47]. Надо отметить, что при изучении липидных компонентов, пораженных при наследственной дистрофии тканей, как и при исследованиях ее специфических белков (родопсина), обсуждают проблему возможного нарушения биосинтеза гликопротеинов.

На основе имеющихся данных пока трудно прийти к однозначному заключению о первичности нарушений липидных компонентов в этиологии этого заболевания. Более вероятным представляется вторичность отмеченных нарушений, так как в тканях, в которых локализован генетический дефект (ПЭ крыс, сетчатка мышей), или не обнаружено ранних изменений в составе основных «кирпичей» липидов—жирных кислот, или они выявлены лишь после явных морфологических проявлений болезни. Однако в целом вопрос мало изучен, необходимы дальнейшие эксперименты по исследованию в поражаемых тканях метаболизма липидов, в частности пути биосинтеза и превращений долихола.

Об изменениях фагоцитоза

Как уже было указано выше, у больных наследственной дистрофией изменен контакт между ПЭ и наружными сегментами, благодаря чему нарушен процесс обновления последних [48—51]. Особенно подробно изучено нарушение фагоцитоза у крыс. Уже примерно с 12-го дня заболевания, то есть еще до полного формирования фоторецепторных структур между ПЭ и наружными сегментами начинает накапливаться слой обломков наружных сегментов, и дальнейшем вся зона наружных сегментов заменяется слоем обломков, которые постепенно исчезают [48].

Фагоцитоз представляет собой сложный процесс, состоящий из нескольких стадий. Взаимодействие между ПЭ и наружными сегментами осу-

шествуется за счет локализованных на наружной мембране рецепторов и определенных лигандов [52, 53]. Некоторые авторы различают следующие стадии фагоцитоза: 1) узнавание (или опознавание) участков верхушек наружных сегментов и участков наружной мембраны клеток ПЭ; 2) прикрепление участков друг к другу; 3) поглощение, то есть окружение участков наружных сегментов отростками мембраны ПЭ, в результате чего образуется фagosома, перемещающаяся потом в цитоплазму клеток ПЭ; 4) соединение фagosома с лизосомами клеток ПЭ; 5) переваривание фрагментов наружных сегментов ферментами лизосом. Каждая стадия фагоцитоза регулируется, по-видимому, особым путем; существенное значение для процесса фагоцитоза имеют микротрубочки, способствующие перемещению фagosома [49].

Что касается роли отдельных компонентов для осуществления большинства стадий фагоцитоза, то, учитывая имеющиеся сведения о механизмах межмембранных и, в частности, межклеточных контактов, в первую очередь обращают внимание на гликопротеины, обеспечивающие, как правило, подобные взаимодействия [54, 55]. В последние годы пытаются расшифровать роль отдельных гликопротеинов на разных этапах фагоцитоза. Примером таких исследований является, например, работа, в которой клетки культуры ПЭ крыс обрабатывали различными протеазами, после чего изучали фагоцитоз. Было выяснено, что в результате протеолитического воздействия с поверхности клеток удалялось несколько гликопротеинов и, в частности белки с величиной M_r 160 и 214 кД. Удаление именно этих белков приводило к нарушению III стадии фагоцитоза, в то время как I стадия при этом не изменялась. Авторы полагают, что макромолекулы, обеспечивающие I стадию фагоцитоза, резистентны к использованным протеазам [56]. Вообще на поверхности клеток ПЭ крыс были выявлены разные гликопротеины, ассоциирующие с наружными сегментами [52]. Их роль на отдельных этапах фагоцитоза, по-видимому, различна.

Роль гликопротеинов наружных сегментов, именно родопсина, в процессе фагоцитоза неясна. Согласно данным, полученным на больных цыплятах, у которых также нарушено образование фagosома [57], углеводные компоненты родопсина не включаются в процесс взаимодействия наружных сегментов с клетками ПЭ [58].

Дефект фагоцитоза у больных крыс связан с ПЭ. Показано, что ПЭ этих животных не способен фагоцитировать наружные сегменты сетчатки здоровых крыс, а у больных могут быть нормально фагоцитированы при «подсадке» к ним ПЭ глаза здоровых [50]. Эти данные являются дополнительным подтверждением вывода о локализации генетического дефекта у крыс в ПЭ [8].

Какая же стадия фагоцитоза нарушена у больных животных? Относительно давно было предположено и в дальнейшем подтверждено, что нарушение у крыс связано с III стадией [49]. Используя метод двойной иммунофлуоресценции и комбинируя в культуре ПЭ и наружные сегменты здоровых и больных крыс, было установлено, что I и II стадии фагоцитоза протекают у больных так же, как и у здоровых. Дефектной оказалась III ста-

дия, что может быть обусловлено или нарушением контрактильного аппарата клетки или недостаточностью одного из гликопротеинов. Первое предположение маловероятно [49]. Соответственно дефектность фагоцитоза связана, по-видимому, с дефектностью гликопротеинов, обеспечивающих III стадию процесса. Интересно, что в плазматических мембранах клеток ПЭ, изолированных от 10-дневных больных животных, не полностью гликозилирован по крайней мере один белок с M_r 183 кД [59], который по величине M_r близок к одному из тех белков, которые были идентифицированы как необходимые макромолекулы, обеспечивающие III стадию фагоцитоза [56].

Таким образом, есть основания полагать, что один из «виновников» нарушения фагоцитоза идентифицирован. Это недостаточно гликозилированный белок ПЭ крыс. Надо отметить, что у больных мышей, имеющих генетический дефект в сетчатке, уже отмечено исчезновение одного из гликопротеинов из этой ткани [60].

Несмотря на большую вероятность значимости именно гликопротеинов в нарушении фагоцитоза нельзя полностью исключить и другие причины, обуславливающие этот феномен. Так, с применением липосом показана роль их фосфолипидного состава для протекания фагоцитоза [61]. Однако независимо от этого наблюдения, учитывая всю совокупность имеющихся фактов, в настоящее время представляется наиболее актуальным для выяснения причин нарушений фагоцитоза изучение роли и изменений отдельных гликопротеинов сетчатки и ПЭ.

Заключение

Из анализа приведенных материалов следует, что разные пути изучения биохимических изменений в ПЭ и сетчатке при наследственной дистрофии последней показали перспективность изучения гликопротеинов. При исследовании специфических белков сетчатки возникло предположение о нарушениях гликозилирования родопсина, которое объясняло многие феномены, отмеченные для фоторецепторов при данном заболевании. С этой точки зрения легко понять изменения локализации родопсина в мембранах (возможно изменение его ориентации) при развитии болезни [18], нарушение взаимодействия с ферментами фосфорилирования и дефосфорилирования зрительного пигмента [16, 17]. Можно полагать, что это обстоятельство является и причиной нарушенных взаимодействий родопсина с трансдуцином и соответственно с ФДЭ, что и приводит к нарушению ее фотондуцированной активации [16, 24]. Последний феномен вряд ли может быть объяснен изменениями жидкости мембран сетчатки, так как они проявляются лишь на относительно поздних этапах заболевания [28]. Дефектность же гликопротеинов—возможная причина нарушений белково-липидных взаимодействий мембран на ранних стадиях болезни [18].

Гликозилирование родопсина и, по-видимому, ряда других белков сетчатки происходит при участии интермедиата липидного обмена доли-

хола. В связи со значимостью этого пути биосинтеза гликопротеинов объяснима и локализация активного процесса биосинтеза интермедиатов липидов в фоторецепторном слое сетчатки [15]. Понятен и эффект туникомицина, блокирующий образование «ядра» углеводной цепи (присоединение N-ацетилглюкозамина [62]), что приводит к дезорганизации структуры, подобной той, которая имеет место при наследственной дистрофии [15, 46].

Что касается нарушений фагоцитоза и обновления наружных сегментов, то в данном случае прямо установлена дефектность гликопротеинов в сетчатке мышей [60] и ПЭ крыс [59] у больных индивидуумов. Более того, материалы, полученные в этом направлении, впервые позволяют обсуждать вопрос о конкретном «виновнике» наблюдаемых нарушений.

Причины изменений гликопротеинов, образующихся долинхозависимым путем может быть несколько: это и изменение (или отсутствие) ферментов гликозилирования, и нарушения в образовании долинхола, и отклонения в процессе распада этих сложных белков. Более вероятным представляется первый путь изменений, так как пока нет указаний о нарушениях липидных интермедиатов, связанных с долинхолом. Однако полностью исключить такую возможность нельзя, так как пути его метаболизма сложны и многообразны [62, 63].

Предположение о нарушении при наследственной дистрофии ферментов гликозилирования «удобно» тем, что с этой точки зрения можно объяснить разные варианты болезни за счет различной степени нарушений отдельных белков-ферментов, обеспечивающих присоединение тех или иных углеводных остатков. С такой позиции легко трактовать и разные нарушения мембран, отмеченные в непораженных тканях [64, 65]. Степень и значимость нарушений мембранных структур определяется, по-видимому, ролью отдельных гликопротеинов в функциональной активности. Но так или иначе настоящее заболевание нужно отнести, вероятно, к мембранопатиям.

Чем же обусловлено поражение именно в сетчатке? Можно полагать, что в данном случае имеет место выраженная дефектность гликопротеинов мембран сетчатки или ПЭ; это обуславливает нарушение межмембранных контактов между клетками этих тканей, что является основой для нормального функционирования наружных сегментов. Соответственно происходит дезорганизация фоторецепторов и их распад.

Естественно, что обсуждаемая гипотеза нуждается в серьезном экспериментальном подтверждении как с точки зрения ее правомочности вообще, так и в плане конкретизации того белка (белков?), синтез которого нарушен. Очевидно, что предстоит еще длинный и трудный путь исследований для понимания этиологии этой тяжелой болезни. Возможно, однако, что успех будет достигнут и относительно скоро за счет применения генетических методов анализа, которые сейчас начали использовать в исследованиях пигментного ретинита людей [66].

HEREDITARY RETINAL DYSTROPHY: ASSOCIATION WITH METABOLISM

ETINGOF R. N.

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

This review summarizes literature and author's own data (obtained with Campbell rats) on the alterations of specific proteins (rhodopsin, cyclic nucleotides PDE) and lipid components, predominantly fatty acids, in the retina and pigment epithelium of animals with hereditary retinal dystrophy. Disturbances of phagocytosis in these animals are discussed. At early stages of the disease some alterations can be observed in the brain in addition to changes in the retina and pigment epithelium. It is proposed that the main cause of the diseases is due to disturbances of carbohydrate residues produced by the dolichol-dependent pathway and present in glycoproteins of the retina and pigment epithelium.

ЛИТЕРАТУРА

1. Стукалов С. Е., Писаренко С. А. Пигментная дистрофия сетчатки. Воронеж. Изд-во Воронежского гос. ун-та, 1980.
2. Matuk Y. *Canad. J. Biochem.*, v. 62, p. 535-546, 1981.
3. Chader G., Aguirre G., Sanyal S., Acland G., Stramm L. - In: Heredity and visual development (eds. J. B. Sheffield, S. R. Hilfer). p. 1-30. Springer Verlag, N. Y. - Berlin - Heidelberg - Tokyo, 1985.
4. Hurley J. B. *Ann. Rev. Physiol.*, v. 49, p. 793-812, 1987.
5. Димлер И. А., Этингوف Р. Н. Биол. мембраны, т. 1, с. 565-572, 1984.
6. Fliesler S. J., Anderson R. E. *Progr. Lipid Res.*, v. 22, p. 79-131, 1983.
7. Avelardo M. I. *J. Biol. Chem.*, v. 262, p. 1172-1180, 1987.
8. Mullen R. J., LaVail M. M. *Science*, v. 192, p. 799-801, 1975.
9. LaVail M. M., Mullen R. J. *Exp. Eye Res.*, v. 23, p. 227-245, 1976.
10. Ойзерман М. В. Усп. соврем. биол., т. 81, с. 365-378, 1976.
11. Этингوف Р. Н., Остапенко И. А., Чусова Г. Г. - В кн.: Физиологические науки - медицине, с. 67-76, Л., Наука, 1983.
12. Retinal degenerations: Experimental and clinical studies (eds. M. M. LaVail, J. G. Hollyfield, R. E. Anderson), N. Y., Alan R. Liss, Inc., 1985.
13. Jansen H. G., Sanyal S., De Grip W. J. *Exp. Eye Res.*, v. 44, p. 347-351, 1987.
14. Bowes C., Farber D. B. *Exp. Eye Res.*, v. 45, p. 467-480, 1987.
15. Fliesler S. J. - In: Abstr. Symp. of Retinal degeneration of 6th Intern. Congr. Eye Res. (eds. M. M. LaVail, J. G. Hollyfield, R. E. Anderson), p. 35. N. Y., Alan R. Liss, Inc., 1985.
16. Farber D. B., Shuster T. A. - In: Abstr. Symp. of Retinal degeneration at 6th Intern. Congr. Eye Res. (eds. M. M. LaVail, J. G. Hollyfield, R. E. Anderson), p. 34. N. Y., Alan R. Liss, Inc., 1985.
17. Takemoto D. J., Cunnick J., Takemoto L. J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 135, p. 1022-1028, 1986.
18. Usukura J., Bok D. *Exp. Eye Res.*, v. 45, p. 501-510, 1987.
19. Wald G. (Discussion) - In: Biochemistry of the retina (ed. C. N. Graymore), p. 89. Acad. Press, L.-N. Y., 1965.

20. Takemoto D. J., Hansen J., Takemoto L. J. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 132, p. 804-810, 1985.
21. Остапенко И. А. Вopr. мед. химии, т. 4, с. 519-523, 1981.
22. Kurtz M. I., Edwards R. B., Schmidt S. J. Exp. Eye Res., v. 45, p. 67-76, 1987.
23. Fletcher T., Sanyal S., Krishna G., Aguirre G., Chader G. J. Neurochem., v. 46, p. 1240-1245, 1986.
24. Остапенко И. А., Рычкова М. П., Берман А. Л. Укр. биохим. журн. т. 59, с. 38-44, 1987.
25. Navon S. E., Lee R. H., Lolley R. N. Exp. Eye Res., v. 44, p. 115-126, 1987.
26. Остапенко И. А. Нейрохимия, т. 4, с. 123-133, 1985.
27. Organisciak D. T., Wang Hin-min, Kop A. L. Exp. Eye Res., v. 34, p. 401-412, 1982.
28. Остапенко И. А., Шабанова М. Е., Тюрин В. А., Борин М. А., Горбцов Н. В., Этишоп Р. Н. Нейрохимия, т. 5, с. 391-396, 1986.
29. Scott B. L., Reddy S. T., Bazan N. E. Exp. Eye Res., v. 44, p. 101-113, 1987.
30. Batey D. W., Mead J. F., Eckert C. D. Exp. Eye Res., v. 43, p. 751-757, 1986.
31. Wilkinson T. C., Wilton D. C. Biochem. J., v. 242, p. 905-919, 1987.
32. Lee L., Wiggert B. J. Neurochem., v. 42, p. 47-54, 1984.
33. Fukui F., Kese T., Shidotani T., Nagai T., Kataguma T. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 147, p. 899-903, 1987.
34. Gonzalez-Fernandez F., Landers R. A., Glazebrook P. A., Fong S. I., L'lou G. I., Bridges D. B. J. Cell Biol., v. 59, p. 2092-2098, 1984.
35. Carter-Dawson L., Alvarez R. A., Fong S. I., L'lou G. I., Sperling H. G., Bridges D. B. Develop. Biol., v. 116, p. 431-458, 1986.
36. Anderson R. E., Maude M. B., Lewis R. A., Newsome A. A. Exp. Eye Res., v. 44, p. 155-159, 1987.
37. Zigler J. S., Hess H. H. Exp. Eye Res., v. 41, p. 67-76, 1985.
38. Anderson R. E., Rupp L. M., Wiegand B. D. Current Eye Res., v. 3, p. 223-227, 1984.
39. Ефимова М. Г., Остапенко И. А., Этишоп Р. Н. Нейрохимия, т. 6, с. 406-412, 1987.
40. Reiss U., Tappel A. L., Chio K. S. Biochemistry, v. 11, p. 921-926, 1972.
41. Chio K. S., Tappel A. L. Biochemistry, v. 8, p. 2827-2832, 1969.
42. Страева О. Г., Панова И. Г., Бубликова А. Д. Журн. общ. биол., т. 72, с. 99-105, 1981.
43. Стросва О. Г., Бубликова А. Д. Онтогенез, т. 19, с. 30-35, 1988.
44. Bazan N. G., Reddy T. S., Birkle D. L., Dobard D. P.—In: Abstr. Symp. of Retinal degeneration at 6th Intern. Congr. Eye Res. (eds. M. M. LaVail, J. G. Hollyfield, R. E. Anderson), p. 34, N. Y., Alan. Liss, Inc., 1985.
45. Kean E. L., Planter I. J. Exp. Eye Res., v. 23, p. 89-101, 1976.
46. Flexier S. J., Tabor G. A., Hollyfield J. G. Exp. Eye Res., v. 39, p. 153-173, 1984.
47. Maltse W. A., Sheridan K. M. J. Cell. Physiol., v. 133, p. 471-481, 1987.
48. Dowling J., Sidman R. J. Cell Biol., v. 14, p. 73-110, 1962.
49. Burnside M. B. Exp. Eye Res., v. 23, p. 257-275, 1976.
50. Hall M. O., Chaitin M. H.—In: Abstr. Symp. of Retinal degeneration at 6th Intern. Congr. Eye Res. (eds. M. M. LaVail, J. G. Hollyfield, R. E. Anderson), p. 33, N. Y., Alan R. Liss, Inc., 1985.
51. Sanyal S., Chader G., Aguirre G.—In: Abstr. Symp. of Retinal degeneration at 6th Intern. Congr. Eye Res. (eds. M. M. LaVail, J. G. Hollyfield, R. E. Anderson), p. 34, N. Y., Alan R., Liss, Inc., 1985.
52. Colley N. J., Clark V. M., Hall M. O.—In: Abstr. Symp. of Retinal degeneration at 6th Intern. Congr. Eye Res. (eds. M. M. LaVail, J. G. Hollyfield, R. E. Anderson), p. 36, N. Y. Alan R., Liss, Inc., 1985.

53. Colley N. J., Hall M. O. *Exp. Eye Res.*, v. 42, p. 323—329, 1986.
54. Турманова С. Ю. *Биохимия*, т. 43, с. 387—398, 1978.
55. Hoffman S., McMahon D. J. *Biol. Chem.*, v. 253, p. 278—286, 1978.
56. Colley N. J., Clark V., Hall M. O. *Exp. Eye Res.*, v. 44, p. 377—392, 1987.
57. Ulshaefer R. J., Allen C. B.—In: *Abstr. Symp. of Retinal degeneration at 6th Intern. Congr. Eye Res.* (eds. M. M. LaVail, J. G. Hollyfield, R. E. Anderson), p. 33, N. Y., Alan R. Liss, Inc., 1985.
58. Lentricchia B. B., Iton J., Planter I. J., Kean E. L. *Exp. Eye Res.*, v. 44, p. 127—142, 1987.
59. Clark V. M., Hall M. O. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 27, p. 133—144, 1986.
60. Wallenfels B. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci.*, v. 76, p. 3223—3227, 1979.
61. Efron R., Szumter B., Edwards R. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 21, p. 611—616, 1981.
62. Beytla E. D., Porter J. W. *Ann. Rev. Biochem.*, v. 45, p. 113—142, 1976.
63. Hubbard S. C., Ivatt R. J. *Ann. Rev. Biochem.*, v. 50, p. 533—583, 1981.
64. Essner E., Rieland M., Pino R. A., Griewski B. S. *Laborat. Investig.*, v. 43, p. 418—426, 1980.
65. Бреслер В. М., Остапенко Н. А., Рсбанс Е. М., Чусова Г. Г. *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, т. 96, с. 14—16, 1983.
66. Лимборская С. А. *Вестн. АН СССР*, № 3, с. 54—62, 1987.

Поступила 10. VI 1983



УДК 616.8—009.24—092:616.831—008.939

ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ В ЦНС В НОРМЕ
И ПРИ ПАТОЛОГИИ

НИКУШКИН Е. В.

НИИ общей патологии и патологической физиологии АМН СССР, Москва

В обзоре рассмотрены особенности протекания процесса ПОЛ в ЦНС позвоночных. Приводятся доказательства осуществления этого процесса в нервной ткани *in vivo* и обсуждается его возможная функциональная роль. Рассмотрены также причины и следствия нарушения регуляции процесса ПОЛ при заболеваниях и патологических состояниях ЦНС, роль нарушений регуляции в патогенезе данных заболеваний. Обсуждается возможность применения антиоксидантов для профилактики и коррекции нарушений, регуляции ПОЛ.

Возникновение и развитие разнообразных заболеваний у высших организмов зачастую определяется повреждением клеточных мембран данного органа или ткани. Универсальность строения биомембран и механизмов поддержания их структурной целостности, а также регуляции многих их функций обуславливает, в свою очередь, существование и универсальных механизмов повреждения мембран. Вовлекаемые в эти механизмы процессы, как правило, протекают в мембране и до ее повреждения, изменяя на определенной стадии повреждения свою интенсивность или направленность.

Особенный интерес в этом плане представляют процессы, контролирующие физико-химическое состояние мембранных липидов, определяющее эффективность выполнения мембранами своих функций. Одним из таких процессов является свободнорадикальное ПОЛ. Последствия нарушения в регуляции ПОЛ весьма драматичны не только для данной мембраны, но и для клетки в целом. К настоящему времени патогенетическое значение изменений в интенсивности процесса ПОЛ продемонстрировано на нескольких десятках моделей различных заболеваний, а также в целом ряде клинических исследований. Установлено, что вклад нарушений регуляции ПОЛ в общую картину повреждения (заболевания) зависит как от вида патогенного фактора, так и от структурно-функциональных особенностей ткани (органа, системы)—мишени. Одной из наиболее чувствительных тканей является в этом плане нервная ткань. Схема регуляции процесса ПОЛ в клетках ЦНС (рис. 1) в принципе сходна с таковой для других тканей (печень, сердце и т. д.), хотя ПОЛ в

роксидаза (ПД), СОД, глутатионпероксидаза (ГП) и глутатионредуктаза (ГР) (рис. 1).

Клеточными АО являются: α -токоферол (ТФ), аскорбиновая кислота (в высоких концентрациях), тиоловые аминокислоты (цистеин, β , β -диметилцистеин), тиоловые трипептиды (глутатион), феноловые аминокислоты (тирозин), катехоловые аминокислоты (ДОПА), Se (независимо от его простетической роли в ГП), кортикостероиды, дегидроэпиандростерон, эстриол, эстрон, эстрадиол [4]. Активность защиты от токсичных продуктов восстановления кислорода зависит от уровня последнего в ткани, который, в свою очередь, регулируется функционированием системы микроциркуляции [5]. Имеет значение и структурный фактор—ненасыщенные связи жирных кислот (ЖК) расположены в середине мембраны, то есть они отделены от зон генерации активных форм кислорода. В общем случае активность ПОЛ в ткани зависит от содержания субстрата перекисления (ПНЖК), интенсивности функционирования систем генерации активных форм кислорода, напряжения кислорода, уровня прооксидантов (металлы переменной валентности, восстановители), активности «антиоксидантных» ферментов, содержания АО и некоторых других факторов. Рассмотрим особенности факторов, определяющих активность ПОЛ в нервной ткани.

По данным Norton [5], липиды в ЦНС человека составляют в белом и сером веществе головного мозга—54,9 и 32,7% от сухого веса соответственно, в миелине—70,0%. Содержание фосфолипидов (ФЛ) в мозгу составляет 25% от его сухого веса, что в 1,5 раза больше, чем в печени и в 3—4 раза больше, чем в сердце [6]. Значительная часть суммарных ФЛ в нервной ткани представлена их наиболее окисляемыми фракциями: фосфатидилэтаноламином (ФЭА)—38% и фосфатидилсерином (ФС)—14% [5]. Во фракциях ФЭА и ФС более половины жирнокислотных остатков—ненасыщенные с преобладанием полиеновых. Насыщенные ЖК эстерифицируются преимущественно в первом положении глицеридов, а ненасыщенные—во втором. ФЛ серого вещества головного мозга характеризуются более высоким содержанием ПНЖК по сравнению с миелином. Химический анализ липидов головного мозга человека показал, что во фракции глицерофосфатидов серого вещества головного мозга в 3—6 раз больше ПНЖК, особенно арахидоновой и докозагексаеновой, чем в той же фракции миелина [7]. Сравнительное изучение липидного состава 5 областей головного мозга, спинного мозга и седалищного нерва людей показало, что в ЦНС и на периферии ЖК состав отличается [8]. В седалищном нерве было сравнительно мало ПНЖК по сравнению с головным мозгом; спинной мозг занимал промежуточное положение [8]. В ЦНС ПНЖК больше всего в дисках палочек и колбочек сетчатки глаза, где они составляют около 50—60% от всех ЖК, связанных с ФЛ [9]. В нейрональных мембранах максимальное содержание ПНЖК отмечено в синаптических мембранах [10]. Содержание ПНЖК в миелиновых мембранах существенно меньше [11]. Причины различий химического состава липидов этих двух основных типов мембран головного мозга, по-ви-

димому, связаны с различием выполняемых ими функций [10]. Большая ненасыщенность липидов синаптических мембран необходима, по всей вероятности, для быстрого регулирования их основных функций: изменения проницаемости, активности ферментов, сродства рецепторов и т. д. Преобладание в мембранах миелина моноеновых жирнокислотных остатков, очевидно, способствует большей стабилизации этих мембран [10].

Благодаря высокому содержанию ПНЖК, гомогенаты и отдельные субклеточные фракции головного мозга млекопитающих подвергаются быстрому ПОЛ при инкубации в кислородсодержащей атмосфере [12—15]. Установлено, что субстрат перекисления находится в мембранах, а основными факторами, стимулирующими неферментативное ПОЛ, являются аскорбиновая кислота (АК) и Fe, расположенные в цитозоле [16]. Скорость ПОЛ еще более возрастала при инкубации образцов нервной ткани в присутствии прооксидантных систем: АК+Fe²⁺ [16, 17], NADPH+Fe²⁺ или NADH+Fe²⁺ [17], Fe²⁺+ADP+ксантин-ксантиноксидаза [18]. По способности к аскорбатзависимому ПОЛ субклеточные фракции мозга расположились в следующий ряд: микросомы > легкие митохондрии > синапсосомы > легкий миелин > тяжелые митохондрии > ядра > тяжелый миелин; а по окисляемости при NADPH-зависимом ПОЛ в ряд: микросомы > синапсосомы > тяжелые митохондрии; остальные фракции практически не окислялись. Система с ксантиноксидазой в большей степени активировала ПОЛ во фракциях синапсосом, миелина и митохондрий и в меньшей — во фракции микросом [18].

Несмотря на сравнительно небольшой объем, головного мозг млекопитающих потребляет значительную часть получаемого организмом кислорода [19, 20]. Так, мозг человека, составляющий около 2% от общей массы тела, утилизирует 20—25% всего получаемого кислорода. Серое вещество мозга человека (около 0,9% от массы тела) утилизирует 20% всего получаемого кислорода.

Интенсивность потребления кислорода целым мозгом человека, выраженная в мкл O₂/г ткани/мин, равна для целого мозга человека—32—39, собаки—31—59, кошки—33—61, крысы—31—73; для серого вещества мозга человека—45—70, собаки—70—401, кошки—63—100, крысы—69—115 [19, 20]. Другие ткани организма человека потребляют кислород (в тех же единицах) со следующей интенсивностью: печень 19—33, почки—50—60, сердце (в покое)—70—100, скелетные мышцы в покое—1,6—2,4 [19, 20]. Следовательно, головной мозг человека в целом, как и его серое вещество, мало отличаются от других тканей организма по интенсивности потребления кислорода. Однако необходимо учитывать, что основным функциональным элементом НС являются нейроны, которые занимают всего 5% объема целого мозга, а потребляют 25% всего кислорода, поглощенного мозгом. Интенсивность потребления кислорода нейронами коры головного мозга человека составляет 350—450 мкл O₂/г ткани/мин, что значительно превышает значения данного параметра для клеток других тканей [20]. Так, лейкоциты человека потребляют кислород с интенсивностью 9—24 мкл O₂/г ткани/мин, гепатоциты—22—61.

Интенсивность ПОЛ определяется не только содержанием субстрата переоисления и окислителя, но и многими другими факторами; в том числе и концентрацией прооксидантов, основным из которых в ткани млекопитающих является железо [21]. В больших полушариях головного мозга человека содержится, по данным Перри и соавт., 3.9—8.6 мг железа на 100 г свежей ткани или, по данным Смолинской, 16.2 мг на 100 г свежей ткани [22]. Это существенно меньше, чем в основных железосодержащих органах—печени и селезенке, концентрация железа в которых составляет (в мг на 100 г свежей ткани)—10,6—60,8 и 10,5—70,0 соответственно, но примерно столько же, или даже немного больше, чем в других тканях: скелетных мышцах (2—25), сердечной мышце (4—10), поджелудочной железе (4—9), надпочечниках (10,9), кишечнике (13,3), почках (3—30), легких (7—30) [22]. Различные отделы головного мозга человека по содержанию железа можно расположить в следующий ряд: бледный шар, черное вещество, красное ядро, серое вещество > белое вещество, зубчатое ядро, стволые ганглии > продолговатый мозг [22]. В отделах, составивших первую группу ряда, уровень железа был в пределах 18—21 мг на 100 г свежей ткани [22].

Роль АК в отношении ПОЛ, по-видимому, двойственна. В низких концентрациях АК выступает как прооксидант—стимулирует образование $\text{OH}^\cdot$ из H_2O_2 с восстановлением металлов, а в высоких—как АО, реагируя с $\text{O}_2^\cdot$ и $\text{O}^\cdot$. Известно, что АК активизирует неферментативное ПОЛ в субклеточных фракциях и, возможно, регулирует уровень ионов металлов, взаимодействующих с перекисями [16]. Вместе с тем, показано, что АК защищает мозг от повреждающего действия ПОЛ [23]. Концентрации АК в сером и белом веществе ЦНС высоки. Так, в головном мозгу крысы содержится 200—300 мкг АК/г ткани [24]. Концентрация АК в ГМ большинства других млекопитающих приблизительно такая же. Если предположить, что АК равномерно распределена по всему объему головного мозга, то концентрация АК в головном мозгу млекопитающих составит около 1—2 мМ [24]. В этих условиях АК ингибирует ПОЛ в гомогенатах головного мозга и выделенных из него субклеточных фракциях [25]. Хореондное сплетение имеет специальную систему транспорта, обеспечивающую более высокие концентрации АК в синовиальной жидкости (в 10 раз) по сравнению с плазмой крови [26]. Клетки нервной ткани имеют вторую систему, еще более концентрирующую АК внутри них [26]. Если исходить из данных, полученных в экспериментах *in vitro*, то при нормальном уровне Fe в синовиальной жидкости АК должна проявлять свойства АО.

Как и в других тканях, в ЦНС имеются системы, предупреждающие чрезмерное, превышающее функционально необходимое накопление свободных радикалов [27—35]. По активности каталазы различные отделы головного мозга людей в возрасте 22—30 лет можно расположить в следующий ряд: скорлупа > черное вещество, кора затылочной области, мозжечок, червь > бледный шар, таламус, красное ядро > гипоталамус, хвостатое ядро, лобная кора, кора теменной области [28]. Основные КТ-со-

держат органеллы—пероксисомы неодинаково распределены по клеточным элементам нервной ткани [29]. Значительное количество их обнаружено в нейронах симпатических ганглиев, реже они встречаются в клетках черного вещества и ганглиев дорзальных корешков спинного мозга. Единичные пероксисомы обнаружены в нейронах коры и мозжечка, причем в клетках глии во всех отделах мозга этих образований значительно больше, чем в нейронах [29].

По активности ПД различные области головного мозга человека составили следующий ряд: черное вещество > мозжечок, червь, скорлупа > затылочная кора, бледный шар, красное ядро > хвостатое ядро, гипоталамус, таламус > лобная кора, кора теменной области [28]. Общее содержание Cu , Zn -зависимой СОД в организме человека оценивается приблизительно в 3900 мг [30]. В сером веществе гиппокампа человека содержится около 135 мг/кг сырого веса Cu , Zn -СОД и 55 мг/кг сырого веса Mn -СОД. Это в 3,5 и в 6,5 раз соответственно меньше, чем в печени. В 1 л СМЖ, как и в сыворотке крови, около 0,2—0,3 мг Cu , Zn -зависимой СОД [30].

Сравнительное изучение активности ГП в головном мозгу различных животных (крыс, мышей, кроликов, морских свинок, собак, быков, золотых рыбок) показало, что она не высока—около 10 нмоль окисленного глутатиона/мин/мг белка и даже меньше [27]. По сравнению с печенью активность ГП в гомогенатах мозга быка и мембранных фракциях (митохондрии, микросомы) в 3 (микросомы) и в 15 раз (гомогенаты, митохондрии) меньше [27]. В головном мозгу крыс активность ГП в 7 раз ниже, чем в сердце и примерно в 3,5 раза ниже, чем в печени и селезенке [31]. Для других видов животных разница была примерно такой же. Обнаруженного уровня активности ГП в мозгу явно недостаточно для защиты от токсического действия образующейся в процессе метаболизма H_2O_2 ; предполагается, что должен существовать какой-то другой механизм защиты [27].

Сравнительное изучение содержания компонентов антиоксидантного ряда в спинном мозгу и периферической нервной системе—седалищном нерве собак—показало, что в спинном мозгу активность СОД в 2—2,5 раза выше, чем в нерве, в 1,5—2 раза выше с ним и содержание глутатионтрансферазы, в то время как активность КТ и ГП, а также уровень АК примерно одинаковы [32].

Кроме активности «антиоксидантных» ферментов, интенсивность ПОЛ в ЦНС зависит также от содержания в ней ТФ—основного естественного ингибитора процесса липопереокисления в организме животных и человека [33]. По содержанию ТФ головной мозг находится в втором месте после надпочечников, лейкоцитов и печени [34]. Наибольшее содержание ТФ отмечено в функционально высокоактивных областях головного мозга: обонятельных луковицах, гипофизе, ядрах диэнцефальной области, мозжечке, коре больших полушарий [35].

По суммарной антиоксидантной активности свободных липидов Журавлев [4] все ткани человека разделяет на 3 группы: I—с высокой

активностью (кора мозга, мозжечок, эпифиз, зрительный бугор, спинной мозг): II—со средними значениями активности (селезенка, почки, сердце, печень, желудок, щитовидная железа, простата); III—с низкой активностью (подкожный жир, мышцы, вилочковая железа, поджелудочная железа). Итак, с одной стороны в ЦНС млекопитающих есть все условия для протекания процесса ПОЛ на одном из самых высоких для организма уровней, с другой стороны, АО—система в ЦНС, несмотря на дефицит ее некоторых компонентов, обладает достаточной активностью, чтобы препятствовать увеличению интенсивности процесса перекисления выше определенного уровня.

Первым свидетельством протекания в ЦНС *in vivo* реакций ПОЛ явились гранулы липофусцина (ЛФ), обнаруженные в нервной ткани млекопитающих [36]. Было установлено, что ПНЖК в процессе своего автоокисления образуют ряд очень реакционноспособных соединений, которые могут взаимодействовать с различными клеточными компонентами. Одним из продуктов такого взаимодействия является ЛФ, аккумулирующийся в НС в основном в митохондриях [36]. С возрастом содержание ЛФ в различных отделах головного мозга млекопитающих увеличивается [36]. ЛФ может иметь различную структуру, в зависимости от того, в каких клетках он образуется: в глиальных или в нейронах. ЛФ обладает характерной флуоресценцией с максимумом в области 435 нм, соответствующей флуоресценции оснований Шиффа, и максимумом спектра возбуждения около 345—350 нм [37]. Детально процесс образования ЛФ пока не изучен, однако известно, что он имеет липидную природу, содержит ФЛ и холестерин, богат насыщенными ЖК и спиртами. Одной из реакций, участвующих в образовании ЛФ, по всей вероятности, является взаимодействие малонового диальдегида с аминокислотами и липидами. Участием белков в образовании ЛФ объясняют наличие у него иногда эстеразной активности. Показано, что ЛФ, выделенный из мозга людей, представляет собой липидный полимер с величиной M_r 6—7 кД, в котором встречаются эфирные связи между липидами и аминокислотами [38].

Кроме ЛФ в гомогенатах головного мозга лабораторных животных и полученных из них субклеточных фракциях были обнаружены и другие продукты ПОЛ: ТБКП [17, 39] и перекиси липидов [40]. Сравнительный анализ показал, что по уровню ТБКП ткани кролика можно расположить в ряд: мозг, селезенка > почки, легкие, сердце > кровь, печень > мышцы [39]. При исследовании активности ПОЛ в различных отделах головного мозга человека было выявлено, что наиболее высокого уровня концентрация малонового диальдегида достигает в черве мозжечка, немного ниже в таламусе, коре, черном веществе, хвостом ядра, бледном ядре, скорлупе и гипоталамусе (во всех вышеперечисленных отделах уровень малонового диальдегида был примерно одинаков) и минимальное—в эпифизе [15].

Следует отметить, что судить об интенсивности ПОЛ в ткани по уровню одного из продуктов данного процесса нельзя, поскольку ПОЛ зависит, как уж упоминалось, от многих факторов, и поскольку в тканях

протекают процессы, в ходе которых образуются интермедиаты или конечные продукты ПОЛ, например, в ходе метаболизма катехоламинов. К тому же характер ряда тканей, расположенных по уровню в них ПОЛ, оцененному по концентрации одного из продуктов перекисления, зависит от способа приведения этой концентрации—к 1 г липидов, или к 1 г ткани и т. п. [40]. Тем не менее, несомненно, что в организме млекопитающих активность ПОЛ в ЦНС находится на одном из самых высоких уровней. Возможно, что реакции свободнорадикального ПОЛ в определенной степени обеспечивают выполнение нейрональными мембранами их специфических функций: возбудимости, способности генерировать потенциал действия, проводить возбуждение и т. д., которые тесно связаны с резкими изменениями проницаемости мембран нейронов, активности мембраносвязанных ферментов и аффинности рецепторов. В последние годы большое внимание уделяется способности реакций и продуктов ПОЛ регулировать функциональную активность различных мембран. Имеются свидетельства участия реакций свободнорадикального ПОЛ в механизмах, обеспечивающих передачу информации по нервному волокну [41]. В частности, показана зависимость состояния системы регуляции ПОЛ в ритмически раздражаемом изолированном нерве от частоты стимуляции [41]. Возможно, свободнорадикальные процессы, протекающие в липидах возбудимых мембран, участвуют в регуляции их проницаемости для Na^+ и Ca^{2+} .

Исследования на моделях ряда важнейших заболеваний и патологических состояний ЦНС, таких как ишемия и травма головного мозга, травма спинного мозга, эпилепсия, вирусная демиелинизация, центральные параличи, а также на моделях поражения ЦНС при стрессе, ожоговой болезни, отравлениях талием, кобальтом, никелем и оксидами марганца, показали, что возникновение и развитие в ЦНС патологического процесса сопровождается существенными нарушениями регуляции в нервной ткани процесса ПОЛ (табл. 1), приводящими к некомпенсированной активации ПОЛ, что выражалось накоплением продуктов данного процесса в нервной ткани, в крови и СМЖ. Кроме увеличения содержания в ЦНС собственно продуктов ПОЛ развитие патологических состояний сопровождалось изменениями и со стороны других показателей липидного обмена, ряд из которых также свидетельствовал о нарушениях регуляции процесса ПОЛ. В частности, наблюдались изменения спектра ФЛ: уменьшение доли легкоокисляемых фракций—ФЭА и ФС, уменьшение содержания в ФЛ ПНЖК, главным образом арахидоновой и докозагексаеновой без изменения содержания пальмитиновой и олеиновой, отмечалось также уменьшение содержания холестерина и АК [36].

Результаты исследований, выполненных на моделях патологии ЦНС, послужили основанием для изучения состояния процесса ПОЛ у больных психо-неврологических клиник. В итоге были обнаружены нарушения со стороны регуляции ПОЛ у больных шизофренией, эпилепсией, рассеянным склерозом, у больных с болезнями Альцгеймера, Паркинсона, Боттена-Штейнерта-Куршмана, а также у больных с центральными

Таблица 1

Результаты исследования состояния процесса ПОЛ при моделировании
у животных заболеваний ЦНС

Моделируемое заболевание (поражение)	Вид животного	Исследуемая ткань	Тип продуктов ПОЛ	Обнаруженный эффект	АО-система	Обнаруженный эффект	Литература
Ишемия ГМ	крыса	ГМ	ПЛ	+	КТ, СОД, ГП, ГР	0	[42]
	" "	ГМ, кровь	ТБКП	+			[43]
	" "	ГМ			КТ, ГП	—	[44]
	" "	ГМ			GSH, GSSG	—, 0	[14]
Травма ГМ	кролик	ГМ	ТБКП	+			[45]
Эпилепсия (очаговая)	крыса	ГМ	ДК, ТБКП, ОШ	+			[46]
Эпилепсия (генерализованная)	" "	кровь	ДК, ОШ	+	СОД, ГП, ГР, ТФ	0	[46]
	" "	ГМ	ДК, ТБКП, ОШ	+	СОД, ГП, ГР	—, —, 0	[46, 47]
	" "	кроль	ДК, ОШ	+			[46, 48]
Энцефаломиелит (вирусный)	" "	СМЖ	ОШ	+			[46]
	мышь	ГМ	ДК, ОШ	+	СОД	—	[49]
Энцефаломиелит (аллергический)	морская свинка	ГМ, кровь	ДК, ТБКП	+	СОД, ГП	—	[50]
Центральный паралич	" "	кровь	ТБКП	+			[51]
Стресс	" "	ГМ	ОШ	+	СОД, ТФ	—	[52]
Ожоговая болезнь	" "	ГМ	ТБКП	+			[53]
Отравление Pb, Co, Ni	" "	ГМ	ТБКП	+			[54]
Отравление Mn	" "	ГМ	ТБКП	—			[55]

Примечание. Здесь и в табл. 2: ГМ—головной мозг, ПЛ—перекиси липидов, ДК—диеновые конъюгаты, ОШ—основания Шиффа, «+», «—» и «0»—соответственно увеличение, уменьшение и отсутствие изменения данного (ых) параметра (ов). В скобках: 1-я ссылка относится к продуктам ПОЛ, 2-я к АО—системе.

параличами и некоторыми другими формами патологии ЦНС (табл. 2). В этих работах, в отличие от экспериментов, проведенных на лабораторных животных (табл. 1), основным объектом исследования служили кровь и СМЖ, а также в меньшей степени участки нервной ткани, взятой *post mortem*. Изменения, обнаруженные со стороны компонентов системы регуляции ПОЛ, свидетельствовали о некомпенсированной активации этого процесса (табл. 2). В ряде случаев, как и при моделировании заболеваний ЦНС, увеличение уровня продуктов ПОЛ в тканях сопровождалось уменьшением в них уровня ФЛ, а в последних снижением доли ФЭА и увеличением доли лизо-ФХ [69].

Таблица 2

Нарушения регуляции процесса ПОЛ при заболеваниях ЦНС

Заболевание	Исследованная ткань	Тип продуктов ПОЛ	Обнаруженный эффект	АО-система	Обнаруженный эффект	Литература
Шизофрения	ГМ кровь	ЛФ ПД	+	ПД СОД	+	[57, 58]
Эпилепсия	кровь	ДК, ОШ	+	СОД, ГП, ГР, ТФ	—, —, 0, 0	[59, 60] [61, 48]
	СМЖ	ТБКП, ХЛ	+	СОД	—	[62]
Рассеянный склероз	СМЖ	ДК	+	АОА	—	[63]
Болезнь Альцгеймера	ГМ	ЛФ	+	ГП	—	[64, 65]
Болезнь Паркинсона	ГМ	ЛФ	+	КТ, ПД	—	[66]
Болезнь Боткина-Штейнхейм-Куршмана	ГМ	ЛФ	+	ГП	—	[66, 28]
Центральный паралич	ГМ кровь	ЛФ	+	ГП	—	[66]
Инфекция	кровь	ТБКП	+	ТФ	—	[68]
	СМЖ	ТБКП	+			[69]

Примечание. ХЛ—интенсивность хемилюминесценции, АОА—суммарная антиокислительная активность. Остальные обозначения см. в тексте и на табл. 1.

В принципе некомпенсированная активация ПОЛ может развиваться в случае интенсифицирования реакций инициирования свободнорадикальных цепей при неизменной, сниженной или недостаточно увеличенной для новой ситуации активности АО-системы, а также в случае недостаточности АО-системы при нормальном уровне инициирования ПОЛ. Рассмотрим причины дисбаланса в системе регуляции ПОЛ при наиболее изученных с этой стороны из вышеперечисленных заболеваний и повреждений ЦНС.

В основе механизма, по которому при церебральной ишемии расстраивается регуляция ПОЛ, лежат, по-видимому, нарушения в электрон-транспортующей цепи митохондрий, точнее нарушения процесса окислительного фосфорилирования. Это может иметь два важных, с точки зрения ПОЛ, следствия (рис. 2).

1. Уменьшение при ишемии уровня в клетке макроэргов, в частности АТР, сопровождается соответствующим возрастанием содержания в

способных взаимодействовать с радикалами КоQ. В результате этого взаимодействия ПНЖК окисляются по свободнорадикальному механизму [56].

Кислорода для поддержания автоокисления КоQ в гидрофобной области мембран достаточно по трем причинам: во-первых, как правило, при ишемии с помощью коллатералей обеспечивается снабжение мозговой ткани O_2 на 20—30% от нормы; во-вторых, O_2 в 7 раз более растворим в неполярной области липидов, чем в H_2O [73]; в-третьих, во время гипоксии переносчики цепи разобщены и восстановления кислорода до H_2O не происходит. Эта гипотеза подкрепляется данными, показавшими, что блокада дыхательной цепи антимицином А сопровождается резким увеличением образования H_2O_2 [74]. По-видимому, вследствие взаимодействия КоQ непосредственно с O_2 образуется O_2^- , который в результате реакции дисмутации, катализируемой митохондриальной СОД, восстанавливается до H_2O_2 (рис. 2). Следует отметить, что сохранение уровня кислорода в ткани головного мозга на уровне 20—30% от нормы достаточно для поддержания реакций в цикле трикарбоновых кислот, производящем необходимое количество восстановленных эквивалентов, в свою очередь поддерживающих реакции автоокисления КоQ. Показано [56], что свободнорадикальные реакции идут достаточно интенсивно в липосомах, находящихся в атмосфере с 5% кислорода.

В отличие от гипотез, предполагавших, что нарушения регуляции ПОЛ происходят во время ишемии нервной ткани, ряд авторов [14] считает, что дисбаланс в системе регуляции ПОЛ возникает в период после гипоксии или ишемии, на стадии реперфузии. На этой стадии кислород, вновь поступающий в клетку, медленно восстанавливается на цитохромоксидазе из-за недостатка в митохондриях ADP. Поэтому скорость реакции, катализируемой ксантиноксидазой и скорость автоокисления КоQ могут резко возрастать, приводя к стремительному накоплению инициаторов ПОЛ. Следует отметить, что полученные данные свидетельствуют о том, что O_2^- и H_2O_2 вряд ли непосредственно участвуют в иницировании свободнорадикальных цепей в липидах [70]. По всей вероятности, необходимо их предварительное взаимодействие с металлами переменной валентности, в первую очередь с железом, для образования более реакционноспособных соединений. Более того, в последнее время получила распространение и экспериментальное подтверждение точка зрения о том, что выход из клеточного депо железа, находившегося там в виде Fe^{3+} , в свободное— Fe^{2+} состояние является критическим фактором, приводящим к повреждению ткани при ее ишемии, поскольку инициатором ПОЛ является комплекс $Fe^{2+} \cdot O_2 \cdot Fe^{3+}$ [70]. Железо, депонируемое клеткой, находится в основном в виде комплекса $Fe(OH)_3$ с ферритином (рис. 2). Для высвобождения железа из этого комплекса оно должно восстановиться до Fe^{2+} . Таким восстановителем может быть O_2^- ($Fe^{3+} + O_2^- \rightarrow Fe^{2+} + O_2$) и другие клеточные восстановители, например, флавины [70]. O_2^- и восстановленные переносчики, накопленные в

клетке при ее ишемии, высвобождают из ферритина Fe^{2+} , которое при реперфузии ткани взаимодействует с активными формами кислорода, образуя реакционноспособный комплекс $\text{Fe}^{2+} \cdot \text{O}_2 \cdot \text{Fe}^{3+}$, в результате чего развивается некомпенсированная активация ПОЛ, приводящая к характерному повреждению нервной ткани. Возможно, что определенный вклад в нарушения регуляции ПОЛ при ишемии вносит обнаруженная некоторыми авторами [14, 44] недостаточность отдельных компонентов АО-системы (восстановленного глутатиона, КТ и ГП), хотя данные на этот счет противоречивы (табл. 1).

Основными начальными причинами активации ПОЛ при травме нервной ткани, по-видимому, являются выход плазмы и форменных элементов крови из сосудистого русла в поврежденную ткань с последующим высвобождением прооксидантов— Fe и Cu и нарушения окислительного фосфорилирования в митохондриях нервных клеток вследствие развивающейся гипоксии, приводящие к активации инициирования цепей ПОЛ по вышерассмотренным причинам (рис. 2).

Некомпенсированная активация ПОЛ при эпилептогенезе имеет в общем случае, по-видимому, вторичный характер, поскольку постепенное увеличение у крыс предрасположенности к возникновению генерализованных судорог в ответ на ежедневное введение подпороговых доз конвульсанта не сопровождалось какими-либо существенными изменениями со стороны компонентов системы регуляции ПОЛ [75]. Об этом же свидетельствует тот факт, что предварительное введение антиоксидантов, предупреждая активацию ПОЛ, наблюдающуюся в ответ на воздействие конвульсанта, и ослабляя в значительной степени развивающуюся эпилептическую активность, не предупреждало и не подавляло ее полностью [46]. По всей вероятности, при эпилептогенезе происходит активация инициирования свободнорадикальных реакций вследствие наблюдающихся [76] нарушений энергетического метаболизма и нарушения компартментализации внутриклеточного железа. В частности, имеющиеся данные, свидетельствующие об отложении Fe в головном мозгу больных с посттравматической формой эпилепсии [77]. Дисбаланс в системе регуляции ПОЛ, вызванный активацией реакций инициирования, усугубляется развивающейся со временем функциональной недостаточностью АО-системы. Проведенные исследования показали, что, если при остром развитии у крыс генерализованных судорог активность в головном мозгу ферментов СОД, ГП и ГР не изменяется [47], то у больных с генерализованными формами эпилепсии, длительно страдающими данным заболеванием, наблюдается уменьшение в крови активности СОД и ГП [48].

Для объяснения дисбаланса в системе регуляции ПОЛ при болезни Паркинсона можно выделить две причины [28]: 1) автоокисление накапливающегося в черном веществе и голубом пятне при паркинсонизме 6-гидроксидопамина, в результате чего в этих областях возрастает уровень H_2O_2 ; 2) существенное уменьшение в черном веществе головного мозга больных активности КТ и ПД. Очевидно, что вторая причина

способствует реализации первой. Важность накопления 6-гидроксидопамина для развития паркинсонического синдрома обоснована опытами по введению этого соединения собакам, у животных при этом появлялся характерный симптомокомплекс: гиперкинезы, ригидность и тремор [78]. Существенное значение КТ и ПД следует из способности этих ферментов ослаблять токсическое действие 6-гидроксидопамина на срезы головного мозга и синапсомы, а также из усиления токсического действия 6-гидроксидопамина ингибитором КТ—3-амино-1Н-1,2,4-триазолом [79, 80].

Нарушения регуляции ПОЛ, обнаруженные у больных с рассеянным склерозом и болезнью Боттена, возможно, связаны с генетически обусловленным снижением активности ГП [65, 67].

Активация ПОЛ при стрессорном поражении ЦНС, по всей вероятности, связана с выходом катехоламинов в кровь, накоплением их в органах-мишенях, активацией их метаболизма [81]. Предотвращение выброса катехоламинов из тканей с помощью введения γ -оксимасляной кислоты предупреждало и активацию ПОЛ [81]. Предполагается, что усиление ПОЛ при избытке катехоламинов и активации их метаболизма происходит по двум причинам: во-первых, окисление избыточного адреналина в адренохром протекает через образование семихинона адреналина, способного отдавать электрон кислороду, приводя к появлению O_2^- . Во-вторых, образование активных форм кислорода возможно в результате активации ферментов, участвующих в метаболизме биогенных аминов—дофамин- β -гидроксилазы и МАО. В реакциях с участием первого фермента образуется O_2^- [82], с участием второго— H_2O_2 [83].

Существенное значение для развития некомпенсированной активации ПОЛ в нервной ткани при ишемии, травме, эпилептической активности, стрессорном повреждении ЦНС и ряде других форм ее патологии имеют, по всей вероятности, нарушения гомеостаза внутриклеточного Ca^{2+} (рис. 2). Накопление Ca^{2+} в цитозоле вследствие его избыточного поступления извне или выхода из внутриклеточных депо, в частности при деэнергизации митохондрий, приводит к активации эндогенных фосфолипаз типа А. В результате в нервных клетках накапливаются СЖК, в том числе и ПНЖК, а также лизо-формы ФЛ. Резкое увеличение уровня СЖК в ЦНС было обнаружено, например, при ишемии головного мозга [14], развитии эпилептической активности [84] и гипогликемии [85]. ПНЖК, находящиеся в свободном состоянии, окисляются с существенно большей скоростью, чем эстерифицированные [86]. Накопление в мембранах лизоформ ФЛ приводит к уменьшению микровязкости липидного бислоя [87], и следовательно, к увеличению доступности ПНЖК для инициаторов ПОЛ и прооксидантов. Отсюда можно полагать, что одной из причин, приводящих к интенсификации ПОЛ при патологии ЦНС, является активация эндогенных фосфолипаз, происходящая вследствие нарушения гомеостаза внутриклеточного кальция. Важным обстоятельством является существование тесной прямой взаимосвязи между процессами перекисного окисления и фосфолипазного гид-

ролиза липидов в нервной ткани [46, 84]. В силу этого значительно быстрее достигается необратимость нарушений клеточного метаболизма при выходе из-под контроля одного из указанных процессов.

Некомпенсированная активация ПОЛ в нервной ткани (рис. 3) либо вследствие прямого взаимодействия продуктов ПОЛ с мембрано-связанными ферментами и рецепторами, либо вследствие изменения свойств липидной матрицы (образования гидрофильных пор и каналов, изменения микроокружения мембранных белков, содержания липидов-эффекторов, сегрегации липидов, их перераспределения в плоскости мембраны, или между наружным и внутренним монослоями и т. п.) приводит к

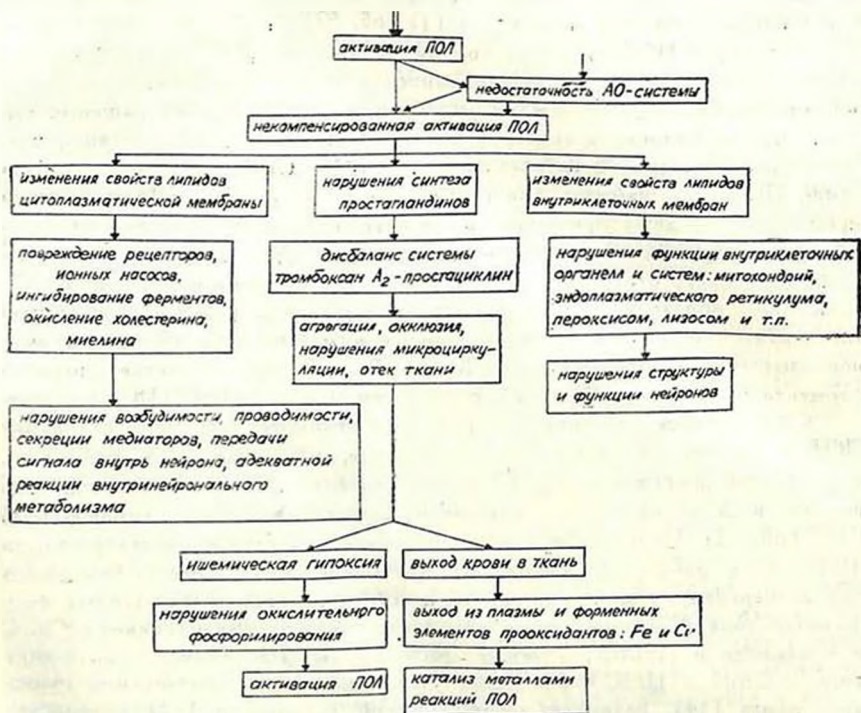


Рис. 3. Схема повреждения нервной ткани при некомпенсированной активации в ней процесса ПОЛ

нарушению проницаемости мембран, работы насосов, ферментов и рецепторов, к изменению механической и электрической прочности мембраны, ее способности к контакту и взаимодействию с другими мембранами, т. е. к изменению функциональной активности мембраны в целом [10, 21, 88—91]. На уровне клетки, в зависимости от типа мембраны, что выражается в нарушении процесса рецепции, возбудимости, секреции (цитоплазматическая), в поражении систем синтеза белков, детоксикации кле-

точных ядов (эндоплазматического ретикулума), в ингибировании ферментов гликолиза, трикарбонового цикла, в разобщении окислительного фосфорилирования (митохондриальные), в выходе в цитозоль гидролитических ферментов (лизосомальные) и т. д. В конечном итоге последствия некомпенсированной активации ПОЛ могут быть весьма драматичны не только для данной мембраны, но и для клетки в целом.

Первичные нарушения в системе регуляции ПОЛ индуцируют вторичные, к которым относятся сдвиги в протекании свободнорадикальных стадий синтеза простагландинов (рис. 3). Липопероксиды ингибируют образование эндотелиального простагландина—ПГ_{I2} [56] и индуцируют образование продуктов окисления холестерина, являющихся ангиотоксинами, кроме того липопероксиды и ОН· стимулируют синтез тромбосана А₂ [56]. Действие тромбосана А₂ на фоне ингибирования синтеза ПГ_{I2} приводит к адгезии и агрегации тромбоцитов, к постоянной вазоконстрикции и окклюзии микроциркуляторного русла. Действие на синтез простагландинов продуктов ПОЛ усугубляется активацией эндогенных фосфолипаз, взаимосвязанной, как уже упоминалось, с активацией ПОЛ. В результате фосфолипазного гидролиза в нервной ткани резко возрастает уровень СЖК, причем в первую очередь арахидоновой кислоты. Увеличение содержания предшественника простагландинов стимулирует их синтез, активация же, в частности синтеза ПГ_{G2}, в свою очередь приводит к спазму сосудов [56]. Описанные нарушения функционирования сосудов относятся в основном к системе микроциркуляции. Кроме спазма и окклюзии, они проявляются отеком нервной ткани (возможно, вследствие накопления СЖК [92]). Очень важно, что, последствия нарушения микроциркуляции могут быть весьма значительны и даже определять необратимость повреждения нервной ткани.

Значительный интерес для понимания роли нарушений регуляции ПОЛ в патогенезе заболеваний и поражений ЦНС представляют данные, полученные при исследовании токсического действия на ЦНС марганца. При отравлениях Мп, попадающим в организм человека, как правило, в виде его оксидов МпО, МпО₄, Мп₂О₃ и МпО₂, в зависимости от длительности токсического воздействия наблюдаются 2 фазы или стадии отравления [55]. В 1-ую, раннюю фазу, продолжающуюся около 1 месяца, у больных развивается симптоматика, которая напоминает шизофрению (психомоторное возбуждение, галлюцинации и т. п.). При продолжающейся интоксикации эта стадия переходит во 2-ую фазу, проявляющуюся симптомами, характерными для экстрапирамидных расстройств, в частности для болезни Паркинсона. Развитие и фазность изменений психоневрологических симптомов при отравлениях Мп связывают с нарушениями метаболизма в головном мозгу катехоламинов. При длительной интоксикации это выражается потерей катехоламинов. При длительной интоксикации это выражается потерей черным веществом меланиновых пигментов, уменьшением содержания в хвостатых ядрах допамина, а также уменьшением содержания в гипоталамусе норадреналина [55]. Исследование зависимости изменений метаболизма катехоламинов от стадии интоксикации дало не всегда сопоставимые, нередко противоречивые резуль-

таты, хотя показано, что в стриатуме крыс в 1-ую фазу отравления Мп увеличивается активность тирозингидроксилазы, а также содержание допамина, норадреналина и ряда метаболитов моноаминов [55]. Во 2-ую фазу величина этих параметров, напротив, была значительно ниже уровня, характерного для нормы [55]. Стимуляцию и подавление метаболизма моноаминов объясняют способностью Мп проявлять как анти-, так и прооксидантные свойства, в двух (Mn^{2+})- и в трех (Mn^{3+})-валентной форме соответственно [55]. Предполагается, что 1-ая фаза интоксикации связана с накоплением в отделах головного мозга Mn^{2+} , что приводит к ингибированию в них ПОЛ, в частности, за счет детоксикации активных форм кислорода O_2^- и H_2O_2 [55]. При этом, кроме изменения свойств липидной матрицы нейрональных мембран, что сказывается на функционировании ферментов и рецепторов, происходит ингибирование ферментов, активируемых свободными радикалами, в том числе таких ключевых, как гуанилатциклаза [55]. В результате нарушается синтез медиаторов, реализация и модуляция их действия, нарушается регуляция дофамин- и холинергических механизмов в базальных ядрах. 2-ая фаза Мп-интоксикации развивается, по-видимому, вследствие накопления в головном мозгу ионов Мп более высокой валентности, например Mn^{3+} , которые могут катализировать автоокисление катехоламинов с генерацией активных форм кислорода, ингибирующих ряд важнейших ферментов синтеза нейромедиаторов, в частности допамин-β-гидроксилазу [55].

Патогенетическую значимость нарушений регуляции ПОЛ в ЦНС можно выяснить, определяя степень влияния предупреждения или коррекции этих нарушений, на развитие исследуемого патологического процесса. Поскольку нарушения регуляции ПОЛ, как правило, проявлялись в виде некомпенсированной активации этого процесса (табл. 1 и 2), были предприняты попытки устранить дисбаланс в системе регуляции ПОЛ с помощью введения в организм животного или человека АО или препаратов, увеличивающих активность АО-системы. При этом наиболее часто использовали препараты основного АО организма млекопитающих—витамина Е, иногда в комбинации с другими соединениями.

ТФ относится к соединениям фенольного типа и проявляет АО-свойства благодаря подвижности протона гидроксильной группы хромового ядра [93]. В результате взаимодействия молекул ТФ с перекисными радикалами уменьшается их концентрация, происходит обрыв цепей в реакциях продолжения ПОЛ. Кроме того, ТФ ингибирует реакции иницирования, детоксицируя активные формы кислорода, и стабилизирует мембрану [93]. Предполагается, что АО-действие ТФ связано и с защитой Se, входящего в состав белков, от окисления [93]. Наконец, ТФ образует в мембранах комплексы с СЖК, что предотвращает повреждающее действие СЖК на мембраны [89].

Использованию ТФ в экспериментальной и клинической невропатологии способствовали эксперименты, показавшие, что содержание животных на ТФ-дефицитной диете, вызывает увеличение уровня в головном

мозгу продуктов ПОЛ [39] и целый комплекс психо-неврологических нарушений [94], которые значительно ослаблялись или исчезали при увеличении в организме уровня ТФ [95]. Протективное действие ТФ было показано при моделировании ишемии головного мозга [43], эпилептической активности [46], аллергического энцефаломиелимита [50], ряда поражений ЦНС [53, 81]. Защитное действие, аналогично ТФ, оказывали и другие АО: ионол [45, 46, 81], кортикостероид — метилпреднизалон [56], некоторые барбитураты [13, 56]. Оно проявлялось в ослаблении или даже в полном исчезновении клинических проявлений патологического процесса в ЦНС, в нормализации морфологических, физиологических и биохимических показателей. Наличие и выраженность защитного действия АО зависели от точности подбора дозы. Передозировка, например, ТФ приводила к отрицательным последствиям, в том числе и к уменьшению продолжительности жизни животных [96].

К настоящему моменту выраженный положительный терапевтический эффект соединений АО-ряда: ТФ, АК, липовой кислоты, препарата Эссенциале и других, наблюдали при лечении ишемической болезни мозга [97], эпилепсии [62, 98], шизофрении [99], инфекционно-токсических поражениях ЦНС [69]. Следует отметить, что ряд эффективных нейротропных средств обладает АО-действием [13, 56], что, возможно, в определенной степени определяет их фармакологическую активность.

Исходя из представлений, сформированных в современной мембранологии, можно прийти к выводу о том, что механизм повреждения клеток разных тканей, в том числе и нервной, включает в себя два типа стадий или этапов: 1) специфические, определяемые видом повреждающего агента или фактора, а также структурно-функциональными особенностями пораженного отдела или органа; 2) неспецифические, универсальные, присутствующие независимо от вида повреждающего начала и свойств пораженной мишени. Нарушения регуляции процесса ПОЛ в большинстве случаев имеют вторичный неспецифический характер, хотя механизм их возникновения может быть различным. Одновременно с этим они универсальны, поскольку встречаются при самых различных заболеваниях и патологиях. Весьма существенно то, что благодаря цепной природе процесса ПОЛ, его способности к самоускорению, а также благодаря его влиянию на множество других процессов в клетке, вклад нарушений регуляции процесса ПОЛ, их последствий в суммарное повреждение клетки (ткани) может превышать вклад специфических стадий и определять вероятность перехода обратимых изменений в необратимые.

Последний вывод имеет, очевидно, большее значение для ЦНС, чем для других систем и органов. Это обусловлено большей значимостью липидов вообще и процесса их перекисления в частности для нормального функционирования ЦНС по сравнению с другими системами жизнеобеспечения организма. Важно, что нарушения регуляции ПОЛ при заболеваниях ЦНС в подавляющем большинстве случаев приводят к одному и тому же эффекту — некомпенсированной активации этого процесса, независимо от механизма возникновения начальных нарушений ПОЛ. Это

обстоятельство значительно упрощает решение вопроса о разработке методов предупреждения и коррекции нарушений в системе регуляции ПОЛ. Очевидно, что эти методы должны быть направлены на усиление различных компонентов АО-системы организма, на увеличение ее активности. Логично предположить, что чем больше вклад дисбаланса в системе регуляции ПОЛ в повреждение нервной ткани в целом, тем большую эффективность можно ожидать от применения АО-терапии. Причем, учитывая самоускоряющий характер процесса ПОЛ, возможность коррекции будет тем вероятнее, чем раньше начато применение антиоксидантов.

LIPID PEROXIDATION IN THE CNS IN THE NORMAL STATE AND IN PATHOLOGY

NIKUSHKIN E. V.

Institute of General Pathology and Pathological Physiology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

This review analyses characteristic features of lipid peroxidation in the CNS of the vertebrates. Evidence for lipid peroxidation (LPO) in the nerve tissue is presented and its possible functional role is discussed. Causes and consequences of the altered LPO control in various diseases and CNS pathological states are also considered. The role of altered control mechanisms in pathogenesis of various diseases is discussed. Perspectives for using antioxidants in the prevention and correction of disturbances associated with LPO control is considered.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chance B., Sies H., Roberts A. *Physiol. Revs.*, v. 59, p. 527—605, 1979.
2. Misra H. P., Fridovich I. *J. Biol. Chem.*, v. 247, p. 3170—3175, 1972.
3. Misra H. P. *J. Biol. Chem.*, v. 247, p. 6960—6962, 1972.
4. Журавлёв А. И.—В кн.: Биантиоксиданты в регуляции метаболизма в норме и патологии, с. 3—36. М., Наука, 1982.
5. Norton W. T.—In: Myelin (ed. P. Morell), p. 161—200. N. Y.: Plenum Press, 1977.
6. Ansell G. B.—In: Form and function of phospholipids (ed. G. B. Ansell, P. Morell, O'Brien), p. 377. Amsterdam etc. Elsevier Sci. Publ. Co., 1973.
7. O'Brien, Sampson E. L. *J. Lipid Res.*, v. 6, p. 545—551, 1965.
8. Baker R. W. R. *Biochem. J.*, v. 79, p. 642—648, 1961.
9. Anderson R. E., Landis D. J., Dudley P. A. *Invest. Ophthalmol.*, v. 15, p. 232—236, 1976.
10. Sun G. Y., Sun A. Y. *Biochim. et biophys. acta*, v. 280, p. 306—315, 1972.
11. Butler M., Aboud L. G. *J. Membrane Biol.*, v. 66, p. 1—7, 1982.
12. Sharma S. K., Krishna M. *J. Neurochem.*, v. 15, p. 147—149, 1968.
13. Smith D. S., Rehnström S., Westerberg E., Åkesson B., Siesjö Eo K. *Acta physiol. scand.*, v. 105, 527—529, 1979.
14. Rehnström S., Siesjö Eo K., Smith D. *Acta physiol. scand.*, v. 110, Suppl. 492, p. 135—140, 1980.
15. Boche D. H., Kosecký R., Carson S., Stern F., Marks M. *Brain Res.*, v. 136, p. 11—21, 1977.

16. Sharma O. P. Indian J. Biochem. and Biophys., v. 14, p. 254—266, 1977.
17. Bishayee S., Balasubramanian A. S. J. Neurochem., v. 18, p. 909—920, 1971.
18. Chan P. H., Jurko M., Fishman R. A. J. Neurochem., v. 33, p. 525—531, 1982.
19. Иванов К. П., Кисляков Ю. Я. Энергетические потребности и кислородное обеспечение головного мозга, Л., Наука, 1979.
20. Самойлов М. О. Реакции перекисей мозга на гипоксию, Л., Наука, 1985.
21. Владимиров Ю. А. Биофизика, т. 32, с. 830—844, 1987.
22. Есрболович П. А., Утешев А. Б.—В кн.: Железо в животном организме, с. 68—106, Алма-Ата, 1967.
23. Seregi A., Schaefer A., Komlos M. Experientia, v. 34, p. 1056—1057, 1978.
24. Schenk J. O., Miller E., Gaddis R., Adams R. M. Brain Res., v. 253, p. 353—356, 1982.
25. Fehér J., Blázovics A., Cornides A., Vereckei A. Brit. J. Exp. Pathol., v. 66, p. 161—164, 1985.
26. Spector R., Eccles J. Federat. Proc., v. 43, p. 194—200, 1984.
27. De Marchena O., Guarnieri M., McKhann G. J. Neurochem., v. 22, p. 773—776, 1974.
28. Ambani L. M., Van Woert M. H., Murphy S. Arch. Neurol., v. 32, p. 114—118, 1975.
29. Панченко А. Ф., Герасимов А. М., Антоненков В. Д. Роль перекисей в патологии клетки, М., Наука, 1981.
30. Murklund S. Acta physiol. scand., v. 110, suppl. 462, p. 19—23, 1980.
31. Lawrence R. A., Burk R. F. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 71, p. 952, 1976.
32. Chvapil M., Kern J. M., Mistorowski R., Weinstein Ph. P. Exp. Neurol., v. 78, p. 765—774, 1982.
33. Witting L. A.—In: Free radicals in biology (ed. W. A. Pryor), v. 4, p. 295—317, Acad. Press, New York, London, Toronto, Sydney, 1980.
34. Keith M. O., Pelletier O. Amer. J. Clin. Nutr., v. 27, p. 368—372, 1974.
35. Horntg D., Weber F., Wiss O. Int. J. Vitam. and Nutr. Res., v. 42, p. 223—227, 1972.
36. Miquel J. O. J., Bench K. G., Johnson J. E.—In: Free radicals in biology (ed. W. A. Pryor), v. 1, p. 133—182, Acad. Press, New York, 1977.
37. Csallany A. S., Agaz K. L. Lipids, v. 11, p. 412—417, 1976.
38. Taubold R. D. Lipids, v. 10, p. 383—390, 1975.
39. Zalkin H., Tappel A. L. Arch. Biochem. and Biophys., v. 88, p. 113—117, 1960.
40. Нейфах Е. А., Казан В. Е. Биохимия, т. 34, с. 511—517, 1966.
41. Кольс О. Р., Максимов Г. В. Ритмическое возбуждение в соматических нервах. Физико-химические аспекты, М., Наука, 1987.
42. Конюс В. Д. Патол. физиология и эксперим. терапия. № 5, с. 30—32, 1982.
43. Yamamoto M. Med. J. Hiroshima Univ., v. 31, p. 345—346, 1983.
44. Маслова Г. Т., Боборико Т. А., Шамко Е. Н.—В кн.: Кислородные радикалы и жизни и биологии, с. 63—70, Минск, Наука и техника, 1984.
45. Мороз Ю. К., Прялко А. Г., Балалесовский А. И.—В кн.: Структура, биосинтез и превращение липидов в организме животного и человека, с. 59, Л., Наука, 1978.
46. Никушкин Е. В., Крыжановский Г. Н. Патол. физиология и эксперим. терапия. № 6, с. 19—24, 1987.
47. Тупсев Н. Р., Бордюков М. М., Крыжановский Г. Н., Никушкин Е. В. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 100, с. 538—541, 1985.
48. Никушкин Е. В., Крыжановский Г. Н., Тупсев Н. Р., Бордюков М. М., Юзефова С. М. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 103, с. 297—299, 1987.
49. Горбунов Н. В., Анжанипесов Х. Н. Нейрохимия, т. 4, с. 290—295, 1985.

50. Степаненко Е. М., Вилков Г. А., Крыжановский Г. Н. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 98, с. 336—338, 1984.
51. Izaо T., Mitsuaki S., Shigeo S., Kunio O., Masaru K. Stroke, v. 10, p. 323—326, 1979.
52. Богданова Е. Д., Казан В. Е., Кулиев Н. Я., Мсерсон Ф. Э., Прилипко А. А. Иммунология, № 2, с. 65—66, 1981.
53. Атаджанов М. И., Геворкян Д. М., Ерицян А. И., Мелик-Азаян Е. А., Мхитарян В. Г., Мхитарян А. В., Овакимян С. С.—В кн.: Вопросы психологии, с. 130—136, Л., Наука, 1977.
54. Mahdi H., Fatchyal S. A. Toxicol. Appl. Pharmacol., v. 57, p. 8—13, 1981.
55. Donaldson J., McGregor D., LaBella F. Can. J. Physiol. Pharmacol., v. 60, p. 1398—1405, 1982.
56. Demopoulos H. B., Flamm E. S., Pietronigro D. D., Seligman M. L. Acta Physiol. scand., v. 110, Suppl. 492, p. 91—119, 1980.
57. Gless P., Mahdi H.—In: Neuronal Aging and Diseases (ed. W. Bargmann, Doerr W.), p. 235—250. Stuttgart: Georg Thieme Publishers, 1976.
58. Андерс В. Н., Орловская Д. Д. Журн. невропатол. и психиатрии, т. 82, с. 1071—1077, 1982.
59. Прилипко А. А., Лидеман Р. Р. Вестн. Акад. мед. наук, СССР, № 1, с. 33—37, 1982.
60. Michelson A. M.—In: Biochemical and medical aspects of active oxygen (ed. Hayaishi O., Asada K.), p. 155—170, Baltimore, Maryland, University Park Press, 1977.
61. Воронко В. А., Никушкин Е. В., Пронина И. Г., Коваленко В. М., Китаева А. В.—В кн.: Актуальные проблемы заболевания и выздоровления, с. 72—75, М., 1983.
62. Мезрабян А. А., Мхитарян В. Г., Амалян М. Г., Бадалян Г. Е., Авакян С. А., Хачатрян В. Г. Журн. невропатол. и психиатрии, т. 86, с. 1407—1410, 1986.
63. Шакаришвили Р. Р. Журн. невропатол. и психиатрии, т. 87, с. 825—828, 1987.
64. Роговина Н. И. Журн. невропатол. и психиатрии, т. 80, с. 696—700, 1980.
65. Mazzella G. L., Stinforti E., Savoldi F., Allegrini M., Lanzola E., Scelst R. Eur. Neurol., v. 22, p. 442—446, 1983.
66. Clausen J. Acta Neurol. Scand., v. 70, p. 345—355, 1984.
67. Jensen G. E., Clausen J. Scand. J. Lab. Invest., v. 43, p. 187—196, 1983.
68. Kibata M., Shimizu Y., Miyake K. Igaku no Ayumi, v. 101, p. 591—592, 1977.
69. Ильчук Н. Т. Журн. невропатол. и психиатрии, т. 83, с. 1472—1478, 1983.
70. Aust S. D., White B. C. Adv. Free Radical Biol. and Med., v. 1, p. 1—17, 1985.
71. Rey R. S., McCord J. M.—In: Oxy Radicals and Their Scavenger Systems (ed. R. Greenwald, G. Cohen), p. 145—153, v. 2, New York, Elsevier Science, 1983.
72. Crowell P. W., Jones C. E., Smith E. E. Amer. J. Physiol., v. 216, p. 744—748, 1969.
73. Lawrence J. H., Loomis W. F., Tobias C. A., Turpin F. H. J. Physiol., v. 105, p. 197—222, 1946.
74. Boveris A., Cadenas E., Stoppani A. O. M. Biochem. J., v. 156, p. 435—441, 1976.
75. Тупеев Н. Р., Бордюков М. М., Крыжановский Г. Н., Никушкин Е. В. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 104, с. 167—169, 1987.
76. Sybert W.—In: Physiology and pharmacology of epileptogenic phenomena (ed. M. R. Klee, H. Caspers, U. Heimann), p. 81—92, New York, Raven Press, 1982.
77. Stesjö Bo K., Witeloch T.—In: Adv. in Neurology (ed. A. V. Delgado-Escueta, A. A. Ward, D. M. Woodbury, R. J. Porter), v. 44, p. 813—847, New York, Raven Press, 1986.
78. Van Woert M. H., Ambant L. M., Bowers M. B. Neurology, v. 22, p. 86—93, 1972.

79. *Helkkila R., Cohen G. Experimentia*, v. 28, p. 1197—1205, 1972.
80. *Shitman R., Akino M., Kaufman S. J. Biol. Chem.*, v. 246, p. 1330—1340, 1971.
81. Месерсон Ф. Э. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца, М., Медицина, 1984.
82. *Lin T. Z., Shen J. T., Ganong W. F. Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* v. 146, p. 37—40, 1974.
83. Горкин В. Э. Аминокислоты и их значение в медицине, М., Медицина, 1981.
84. Воронко В. А., Никушкин Е. В., Крыжановский Г. Н., Германов С. Б. Бюл. эксп. биол. и мед., т. 94, с. 26—30, 1982.
85. *Agardh C. D., Chapman A. G., Nilsson B., Siesjö Bo K. J. Neurochem.*, v. 36, p. 490—500, 1981.
86. Мералек М. Н., Бсариуков А. П., Иванов И. И., Швец В. И. В кн.: Биогенноактивные, т. 52, с. 217—222, М., Наука, 1975.
87. Прилипко Л. Л., Казан Б. Е., Тюрин В. А., Горбунов Н. В., Богданова Е. Д. Докл. АН СССР, т. 269, с. 1260—1263, 1983.
88. *Schvedova A. A., Sidorov A. S., Novikov K. M., Galushchenko I. V., Kagan V. E. Vision Res.*, v. 19, p. 49—55, 1979.
89. Ерин А. Н., Тюрин В. А., Горбунов Н. В., Брусованик В. И., Прилипко Л. Л. Докл. АН СССР, т. 281, с. 447—450, 1985.
90. Ревин В. В., Максимов Г. В., Мусуралиева Г. Т., Колес О. Р. Биохимика, т. 30, с. 278—280, 1985.
91. *Pellmer T. C. Neuroscience*, v. 23, p. 447—456, 1987.
92. *Chen R. H., Yurko M., Fishman R. A. J. Neurochem.*, v. 38, p. 525—531, 1982.
93. Иванов И. И. В кн.: Биомембраны. Структура, функции, методы исследований, с. 248—260, Рига, Дзинтари, 1977.
94. *Aatya-Murti S., Howard L. Krohel G., Wolf B. Neurology*, v. 36, p. 917—921, 1986.
95. Машек И., Груба Ф., Новикова В. Востр. питания, т. 36, с. 46—50, 1977.
96. *Vlaaijboer A. I., Novak L., Hooghwinke G. I. Int. J. Vitam. and Nutr. Res.*, v. 49, p. 428—433, 1979.
97. Дельва В. А., Весельский И. Ш., Гуркина С. И., Воронюк М. И.—В кн.: Неврология и психиатрия, с. 22—26, Киев, Здоровье, 1983.
98. Коваленко В. М., Крыжановский Г. Н., Коваленко В. С., Пронина И. Г., Никушкин Е. В. Журн. невропатол. и психиатрии, т. 84, с. 892—897, 1984.
99. Рыбакова С. С. Фармакология и токсикология, № 16, с. 62—69, 1981.

Поступила 10. IX 1987

РЕФЕРАТЫ СТАТЕЙ, НАПРАВЛЕННЫХ НА ДЕПОНИРОВАНИЕ В ВИНТИ

УДК 577.157

АКТИВНОСТЬ γ -ГЛУТАМИЛТРАНСПЕПТИДАЗЫ В ГОЛОВНОМ МОЗГУ ЧЕЛОВЕКА; ЕЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ В ОТДЕЛАХ МОЗГА И СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЯХ

ЛУКЬЯНЕНКО А. И., РЕВА А. Д.

γ -Глутамилтранспептидаза (γ -ГТП; КФ 2.3.2.2) является ключевым регуляторным ферментом γ -глутамилового цикла транспорта аминокислот в тканях. Этот фермент инициирует деградацию восстановленного глутатиона, осуществляет биосинтез γ -глутамил-пептидов и, вероятно, их перенос через мембраны клеток. Регуляция уровня глутамина и глутатиона в мозговых структурах играет важную роль в ЦНС, обеспечивая ее нормальное функционирование.

В связи с этим целью настоящей работы было изучение активности γ -ГТП в основных отделах и субклеточных фракциях головного мозга человека.

Исследования проводили на препаратах постмортального головного мозга лиц среднего возраста, погибших в результате несчастных случаев без сопутствующих заболеваний сердечно-сосудистой системы и внутренних органов и алкогольной интоксикации.

Гомогенаты мозга готовили в среде, содержащей 0,25 М сахарозы, 10 мМ трис-HCl, pH 7,5 в соотношении ткань: среда гомогенизации—1:10. Субклеточные фракции гомогенатов мозга получали методом дифференциального центрифугирования.

Активность γ -ГТП определяли по методу Орловски М. В нашей модификации, используя в качестве субстрата γ -глутамил-п-нитроанилин, а акцептора глутамильного радикала—глицилглицин.

Активность γ -ГТП выражали в единицах У.А., соответствующих количеству нмоль п-нитроанилина, освобожденного из субстрата в течение 1 мин под действием ферментного препарата, содержащего 100 мкг белка.

Установлено, что активность γ -ГТП в отделах головного мозга человека распределена неравномерно. Наиболее высокая активность фермента характерна для полосатого тела мозга ($6,17 \pm 1,26$), таламуса ($5,84 \pm 0,094$) и гипоталамуса ($5,83 \pm 1,18$). Высокая активность γ -ГТП в целомом мозгу ($4,17 \pm 0,18$), мозжечке ($3,41 \pm 0,85$) и среднем мозгу

($3,66 \pm 0,94$). В белом ($2,60 \pm 0,35$), сером ($2,80 \pm 0,46$) веществе и продолговатом мозгу ($2,14 \pm 0,27$) активность γ -ГТП значительно ниже, чем в других изученных структурах. Исследование субклеточных фракций позволило установить, что максимальная активность γ -ГТП проявляется в ядерной фракции. Несколько ниже—во фракции тяжелых митохондрий. Дальнейшее фракционирование клетки ведет к уменьшению активности фермента в следующем порядке: фракция легких митохондрий, микросомальная, растворимая фракция.

Проведенные исследования и сравнительный анализ полученных данных с результатами других авторов, позволяют прийти к заключению, что γ -ГТП мозга человека, крыс и мышей весьма схожи между собой, но отличаются от почечного фермента по распределению активности и условиям ее максимального проявления. Активность γ -ГТП в головном мозгу человека преобладает в ядерной и митохондриальной фракциях клеток отделов мозга, богатых нейронами, что, по-видимому, отражает высокий уровень протекающих в мозгу энергозависимых биосинтетических процессов.

Поступила 2. I. 1988.

3 с., 1 ил., библиогр. 8.

Днепропетровский государственный университет

Рукопись депонирована в ВИНТИ

УДК 612.434.73:44+612.463-

О ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТАХ ВАЗОПРЕССИНА И ОКСИТОЦИНА, ВВЕДЕННЫХ В ЛИКВОРНУЮ СИСТЕМУ

СУЛАКВЕЛИДЗЕ Т. С.

В левый латеральный мозговой желудочек крыс ($n=75$) через заранее вживленную канюлю вводили окситоцин (в дозах 25; 100; 250 мкед), вазопрессин (5 и 10 мкед), питуитрин (2,5—5,0—50,0 мкед) однократно в объеме 5 мкл на изотоническом растворе NaCl инъектором Гамильтона. Окситоцин вызывал незначительное двигательное возбуждение, потребление пищи чрез 4—5 мин после инъекции с неоднократным повторением в течение 60—90 мин (нередко с явлениями агрессии при пищевом мотивационном возбуждении), длительное увеличение мочеотделения с возвратом к фоновому чаще к 13 суткам (результат в пользу окситоцина, выступающего в роли эндогенного диуретика и при действии через ликворную систему). Введение вазопрессина в первые минуты вызывало учащение дыхания, повышение общей двигательной активности крыс, энергичную «чистку» доступных участков тела (особенно мордочки, где наблюдался отек у 11 из 25 крыс). Через 10—12 мин после инъекции вазопрессина крысы приближались к поилке и пили воду. В первые 60—90 мин каждая крыса потребляла в среднем по 5—8 мл воды (после

введения других препаратов и интактные крысы пили ночью при общем объеме суточного потребления $16,29 \pm 0,19$ мл). Ежедневное питье после вазопрессина становилось доминантой и в течение каждого последующих дней (до 14) составляло $9,10 \pm 0,80$ мл при общем суточном потреблении воды $27,65 \pm 0,63$ мл. На фоне трехсуточной питьевой депривации после инъекции вазопрессина в мозговой желудочек размер суточного питья и через неделю не возвращался к контрольному (у интактных крыс возврат отмечен через сутки), значительно превосходя такое же до условий опыта. Закреплению дипсигенного эффекта явно способствовала и диарея, которая проявилась на вторые сутки у всех крыс после введения вазопрессина (но не окситоцина).

Эти результаты, как и полученные нами ранее с эндогенным антидиуретическим гормоном, свидетельствуют в пользу того, что вазопрессин, действуя через ликворную систему, способствует включению механизмов, перераспределяющих жидкость между ренальной и экстраренальной системами выделения. Изменение мочеотделения после инъекции вазопрессина является, видимо, лишь следствием дипсигенного эффекта препарата и предшествующей внепочечной потери воды.

11 с., ил. 3, библиогр. 24

Дагестанский медицинский институт, Махачкала

Поступила 27. I. 1983

Рукопись депонирована в ВИНТИ

УДК 616.45—001.1/3:612.397.2+577.161

РЕГУЛЯЦИЯ ПРОЦЕССОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ 3,5-ДИТРЕТБУТИЛ-4-ГИДРОКСИФЕНИЛПРОПАНО- ЛОМ (γ -ПРОПАНОЛОМ) В МОЗГУ В УСЛОВИЯХ АКУСТИЧЕСКОГО СТРЕССА

МЕЛКОНЯН М. М.

За последнее десятилетие резко возросло применение синтетических антиоксидантов в медицине, что предопределяется ролью процессов ПОЛ биомембран в патогенезе ряда патологий. В этой связи значительный интерес представляло изучение эффектов синтетического антиоксиданта γ -пропанола на процессы ПОЛ и состояние антиоксидантной системы в условиях акустического стресса, характеризующегося, как это показано нами ранее, выраженными изменениями интенсивности липидной перекисидации и антиоксидантной активности тканей (Мелконян М. М. и соавт. Биол. журн. Армении, т. 37, № 7, 8, с. 586—594, 668—673, 1984).

В связи с вышесказанным, нами были изучены уровень α -токоферола и фоновых липидных перекисей, интенсивность индуцированных процессов ПОЛ, активность ферментов антирадикальной защиты клетки—

супероксиддисмутазы (СОД), глутатионпероксидазы (ГП), глутатионредуктазы (ГР), а также глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФД) в мозгу интактных и стрессированных белых крыс-самцов, получающих γ -пропанол внутривбрюшинно в дозе 5 мг на кг массы по схеме в течение всего эксперимента. Животные были подразделены на 7 групп. I группа служила контролем, крыс II—VI групп подвергали воздействию шума уровнем 91 дБА с максимальной энергией в области средних и высоких частот продолжительностью соответственно 1 и 8 ч, 7, 28 и 56 дней ежедневно по 8 ч. Животных VII группы обследовали через 24 ч после введения γ -пропанола без «озвучивания».

Результаты исследований свидетельствуют о значительном снижении уровня липоперекисления в исследуемых системах на фоне сохранения нормального или повышенного уровня α -токоферола в III—VI группах. Показано также выраженное регуляторное влияние γ -пропанола на активность СОД и ГР, сохранявшихся на уровне контрольных величин при соответствующем активировании ГП и Г-6-ФД различной степени в зависимости от продолжительности эксперимента.

Таким образом, систематическое введение γ -пропанола предотвращает развитие недостаточности систем, предопределяющих антиоксидательную активность мозговой ткани, отмечаемую в условиях акустического стресса.

9 с., 2 ил., библиогр. 11.

Ереванский государственный университет

Поступила 19. V 1988

Рукопись депонирована в ВИНТИ

УДК 612:82:577.1

ДЕЙСТВИЕ НЕКОТОРЫХ ЭКЗОГЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ СИНТЕЗА БЕЛКА В ЯДРАХ НЕЙРОНОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА

САИТМУРАТОВА О. Х.

Изучено влияние ряда синтетических и природных соединений (алкалоиды, антибиотики, ферменты, пептиды и гормоны, психо- и нейротропные препараты и т. д.) на уровень биосинтеза белков *in vitro* ядрами нейронов головного мозга кроликов.

Белоксинтезирующую активность в изолированных нейрональных ядрах, чистоту и целостность которых проверяли микроскопически, исследовали по степени включения DL-[^{14}C]лизина.

Среди изучаемых алкалоидов и их производных эффективными активаторами белкового синтеза оказались N-(β -хлорэтил)-декагидрохинолин, лупинин и ликорин. Исследование действия различных антибиоти-

ков, подавляющих рибосомальный синтез на бесклеточную ядерную систему белкового синтеза показало, что испытанные концентрации пуромицина, тетрациклина и циклогексимида (100—200 мкг/мл) оказывают весьма слабое ингибирование этого процесса. Аналогичные данные получены в отношении ДНКазы и РНКазы, которые в ядрах нейронов, в отличие от рибосом, вызывают незначительное ингибирование белкового синтеза.

Испытанные пептиды (АКТГ₄₋₇, энцефалины, эпиталамин), за исключением тафцина, являются активаторами, тогда как соединения психо- и нейротропного действия (кокаин, стрихнин, аминозин и яд кобры) и иммунодепрессант батриден—ингибиторами синтеза ядерных белков.

Полученные данные подтверждают существенное различие путей биосинтеза белка в ядрах нейронов головного мозга и рибосомах цитоплазмы, а также их различную чувствительность к одним и тем же препаратам. Это свидетельствует об уникальности происхождения белоксинтезирующей активности ядра, ее функциональных особенностях и самостоятельном значении в эволюции ядер нейронов.

8 с., 1 ил., библиогр., 15.

Институт биоорганической химии

им. А. А. Садыкова АН УЗССР, Ташкент

Поступила 1. 11 1988

Рукопись депонирована в ВИНТИ

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

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

Объем рукописи (включая резюме, список литературы и иллюстрации) не должен превышать 15 с., напечатанных на машинке через 2 интервала. Объем обзоров не должен превышать 25 с., кратких сообщений, рецензий и хроники—6 с., а писем в редакцию—3 с.

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

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

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

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

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

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

Фамилии иностранных авторов даются в тексте на языке оригинала.

6. Названия ферментов и коферментов, символы кинетики ферментов и единиц активности, написание соединений, меченных изотопами, и т. п. должны соответствовать требованиям Международного биохимического союза. Разрешаются лишь общепринятые современные сокращения слов, различных единиц измерения, физических и химических величин, терминов и т. п. В приложении к правилам для авторов, которое публикуется в каждом номере нашего журнала, приводится список наиболее часто употребляемых сокращенных обозначений, применяемых без специальной расшивки.

Используемые авторами другие сокращенные слова при первом упоминании даются полностью и в скобках в сокращенном виде.

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

1. Силакова А. И., Труш Г. П., Являкова А. *Вопр. мед. химии*, т. 7, с. 538—544, 1962.

2. Георгиев Г. П.—В кн.: *Цитология ферментов* (под ред. А. А. Покровского), с. 32—83, М., Мир, 1971.

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

9. В случае возврата статьи для исправления датой поступления ее в редакцию считается день получения исправленного текста.

10. Редакция высылает авторам бесплатно отписки опубликованной статьи.

11. При отсылке рукописи в редакцию рекомендуется прилагать к заказному письму или бандероли уведомление о вручении, редакция, в свою очередь, сообщает автору о получении статьи.

12. В случае если статья будет отклонена редакцией, возвращается второй экземпляр рукописи и акт экспертизы.

13. Корректуру авторам редакция не высылает.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Journal „Neirokhimia“ 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 „Neirokhimia“

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.

Стандартные обозначения некоторых тривиальных названий
химических соединений

Ala*—аланин	Leu—лейцин
AMP, ADP, АТР**—аденозин-5'-мо- но-, ди- и трифосфаты	Lys—лизин
cAMP — циклический аденозинмоно- фосфат	Man—манноза
Ara*—арабиноза	Met—метионин
Arg—аргинин	NAD, NADH — никотинамидаденин- динуклеотид и его восст. форма
Asp—аспарагин	NADP, NADPH — никотинамидаде- ниндинуклеотидфосфат и его восст. форма
Asp—аспарагиновая кислота	NMN — никотинамидмононуклеотид
Asx—аспарагиновая кислота или ас- парагин	Orn—орнитин
CMP, CDP, CTP—цитидин-5'-моно-, ди- и трифосфаты	Phe—фенилаланин
CoA—коэнзим А	P _i —неорганический фосфат
CoASAc—ацетилкоэнзим А	PP _i —неорганический пиродфосфат
Cys—цистеин	Pro—пролин
FAD, FADH ₂ — фламинадениндину- клеотид и его восст. форма	Rib, dRib—рибоза, 2-дезоксиррибоза
FMN, FMNH ₂ — фламинимононуклео- тид и его восст. форма	Q, QH ₂ —убихинон, убихинол
Fuc—фукроза	Seг—серин
Fru—фруктоза	Thr—треонин
Gal—галактоза	TMP, TDP, TTP—рибозилтимин-5'- моно-, ди- и трифосфаты
Glc—глюкоза	Trp—триптофан
GlcA—глюкуроновая кислота (ана- логично другие уроновые к-ты)	Tyr—тирозин
GlcN—глюкозамин	UMP, UDP, UTP—уридин-5'-моно-, ди- и трифосфаты
GlcNAc—ацетилглюкозамин (анало- гично другие дезоксисахара и их ацетилпроизводные)	Val—валин
Gln—глутамин	АКТГ—адренкортикотропный гор- мон
Glu—глутаминовая кислота	АХ—ацетилахолин
Glx—глутамин или глутаминовая кислота	ГАМК—гамма-аминомасляная кис- лота
Gly—глицин	ДДС-Na—додецилсульфат натрия
GMP, GDP, GTP—гуанозин-5'-мо- но-, ди- и трифосфаты	ДОФА—диоксифенилаланин
GSH, GSSG—глутатион и его окис- ленная форма	ДНК—дезоксиррибонуклеиновая кис- лота
His—гистидин	ДОХ-Na—дезоксикхолат натрия
Hyl—оксализин	РНК—рибонуклеиновая кислота
Hyp—оксипролин	рРНК—рибосомная РНК
Ile—изолейцин	мРНК—матричная (информационная, ядерная) РНК
IMP, IDP, ITP—инозин-5-моно-, ди- и трифосфаты	тРНК—транспортная РНК
	Glu-тРНК и т. п.—аминоацилпроиз- водные РНК
	ТХУ—трихлоруксусная кислота
	трис — трис (оксиметил)-аминоме- тан
	ЭГТА—этиленгликольтетраацетат
	ЭДТА—этилендиаминтетраацетат

*Стандартные обозначения аминокислот и моносахаридов допустимо употреблять в сокращенном виде при написании структур, а также в таблицах и на рисунках.

**Соответствующие дезоксирибонуклеотиды обозначаются путем добавления ла-
тинской строчной буквы d перед трехбуквенным символом.

Список сокращений часто употребляемых слов, терминов, символов физических и химических величин и единиц измерения

АХЭ—ацетилхолинэстераза
БСА—бычий сывороточный альбумин
ВЭЖХ—высокоэффективная жидкостная хроматография
ГЖХ—газожидкостная хроматография
ГЭБ—гематоэнцефалический барьер
ДЭАЭ-ц — диэтиламиноэтилцеллюлоза
ИКС—инфракрасная спектроскопия
ИОХ—ионообменная хроматография
ИЭТ—изоэлектрическая точка
ИЭФ—изоэлектрическое фокусирование
КМ-ц—О-карбоксиметилцеллюлоза
МАО—моноаминоксидаза
М. Е.—международная единица
М—молярность
М_r—молекулярная масса (вес)
м-, о-, п.—мета-, орто-, пара-
н.—нормальный (раствор)
НС—первая система
ПААГ—полиакриламидный гель
ПОЛ—перекисное окисление липидов
СМЖ—спинномозговая жидкость
т. кип.—температура кипения
т. пл.—температура плавления
ТСХ—тонкослойная хроматография
У. А.—удельная активность
УФ-спектр—ультрафиолетовый спектр
ФДЭ—фосфодиэстераза
ЦНС—центральная нервная система
ЭПР — электронный парамагнитный резонанс

ЭСР—электронный спиновый резонанс
ЯМР—ядерный магнитный резонанс
А—абсорбция (поглощение)
г—константа скорости реакции
K_d—константа диссоциации
K_i—константа ингибирования
K_m—константа Михаэлиса
K_s—субстратная константа
n_H—коэффициент Хилла
V—максимальная скорость реакции
Ки—киори
мКи—милликюри
Р—рентген
имп/мин—импульсы за минуту
Д—далтон
кД—килодалтон
ч—час
мин—минута
с—секунда
мкм—микрометр
мл—миллилитр
мкл—микролитр
мг—миллиграмм
мкг—микрограмм
нг—нанограмм
нм—нанометр
пг—пикограмм
мкатсм—микроатом
ммоль—миллимоль
мкмоль—микромоль
нмоль—наномоль
пмоль—пикомоль
фмоль—фемтомоль

Примечание. Сокращения для названий ферментов, как например, ГДГ, ГДК, ГФ6ДГ и т. д., не допускаются. Однако нет возражений против замены названия субстрата, входящего в тривиальное наименование фермента, стандартной аббревиатурой, например: АТРаза, РНКаза, NADH дегидрогеназа и т. п. Химические элементы следует обозначать символами, а простые неорганические соединения—формулами, например: MgCl₂. Символы ионов следует писать так: Mg²⁺, Cl⁻, PO⁻³.

СОДЕРЖАНИЕ

Хохлов А. П. Влияние синаптических водорастворимых фенольных антиоксидантов на активность м-холинэргической рецепторной системы крыс	3
Островский С. Ю., Кишмаа К. Особенности взаимоотношений нейротрансмиттерных аминокислот в мозгу крыс с различно выраженной алкогольной мотивацией	12
Соломония Р. О., Мачидзе Г. Г., Собчирская Н. М., Михладзе Д. Г. Динамика изменения количества катехоламинов в мозгу цыплят в процессе импринтинга	20
Воронова И. П., Попова Н. К. Изменение активности триптофангидроксилазы в головном мозгу при впадении в зимнюю спячку и при пробуждении	28
Захарян Р. А., Бакуни К. А., Скобелева Н. А. Специфическая реакция двухспиральной РНК на плазматической мембране клеток коры головного мозга крысы	34
Хваточа Е. М., Гарсия А., Зимин Ю. В., Семёнова Т. С. Регуляция митохондриальных ферментов мозга при нарушении связи с мембранами	39
Адамчик Е. И., Милютин А. А. Структурная организация синаптических мембран мозга животных разного возраста	47
Гринкевич Л. Н. Динамика включения [³ H]лейцина в белки ЦНС виноградной улитки при обучении	56
Арутюнян Д. А., Манукян К. Г. Влияние ацетилхолина на включение [³ H]лейцина в белки срезов коры мозга крысы	64
Саитмуратова О. Х. Сравнительное изучение белков, синтезированных <i>in vitro</i> ядрами нейронов головного мозга, с аналогичными белками других тканей	70
Галоян А. А., Бобрускин И. Д., Гурвич Б. Я., Абрамян Г. Э. Кальцийнезависимые активаторы фосфолипазы циклических нуклеотидов	78
Довздова Е. А. Эффекты пептида дельта-сна на метаболизм биогенных аминов в условиях экспериментальной невропатологии, вызванной введением L-ДОФА и пенициллина	87
Гуляева Н. В., Бикбулатова Л. С., Обидин А. Б., Айрапетянц М. Г., Крулихов Р. И. Длительное снижение перекисного окисления липидов в мозгу крыс при введении нейропептидов	95

Краткие сообщения

Таранова Н. П., Нилова Н. С. Содержание антиоксидантов в синапсомах коры головного мозга крыс при нарушении сна	101
Аракелян Л. Н., Армениян А. Р., Срапионян Р. М., Карапетян Р. О., Саакян Ф. М., Галоян А. А. Действие нейrogормона «С» на высвобождение и захват [³ H]норадреналина в синапсомах гипоталамической области мозга крыс	106

Обзоры

Этингоф Р. Н. Наследственная дистрофия сетчатки: связь с особенностями метаболизма	111
Никушкин Е. В. Перекисное окисление липидов в ЦНС в норме и при патологии	124

Рефераты статей, направленных на депонирование в ВИНТИ

Лукьяненко А. И., Рсва А. Д. Активность γ -глутамилтранспептидазы в головном мозгу человека: ее распределение в отделах мозга и субклеточных фракциях	146
Сулаквелидзе Т. С. О физиологических эффектах вазопрессина и окситоцина, введенных в ликворную систему	147
Мселконян М. М. Регуляция процессов перекисного окисления липидов 3,5-дитре-тбутил-4-гидроксифенилпропанолом (γ -пропанолом) в мозгу в условиях акустического стресса	148
Саитмуратова О. Х. Действие некоторых экзогенных препаратов на интенсивность синтеза белка в ядрах нейронов головного мозга	149

CONTENTS

<i>Khokhlov A. P.</i> The Effect of Synthetic Water-soluble Phenol Antioxidants on the m-Cholinergic Receptor System of the Rat	3
<i>Ostrovskii S. Yu., Kiinmaa K.</i> Relationships Between Neurotransmitter Amino Acids in the Brain of Rats with Different Alcohol Preference	12
<i>Solomonu R. O., Muchaidze G. G., Sobchinskaya N. M., Mikeladze D. G.</i> Changed Levels of Catecholamines in the Left and Right Cerebral Hemisphere of Chicken During Imprinting	20
<i>Voronova I. P., Popova N. K.</i> Altered Activity of Brain Tryptophan Hydroxylase in Hibernation and after Waking	28
<i>Zakharian R. A., Bakuntz K. A., Skobeleva N. A.</i> The Specific Reception of Double-Stranded RNA on the Plasma Membrane of Rat Brain Cortex Cells	34
<i>Khachatova E. M., Garcia A., Zimin Yu. V., Semenova T. S.</i> Control of Brain Mitochondrial Enzymes by Altered Association with Membranes	39
<i>Adamchik E. I., Milyutin A. A.</i> The Structural Organization of Synaptic Membranes in the Brain of Rats of Different Age	47
<i>Grinkevich L. N.</i> The Incorporation of Labeled Precursors into Proteins of the Snail Central Nervous System During Learning	56
<i>Arutyunyan D. L., Manukyan K. H.</i> The Effect of Acetylcholine on the Incorporation of ^3H -Leucine into Proteins of Rat Cerebral Cortex Slices	64
<i>Saitmuratova O. H.</i> Comparative Study of Proteins Synthesized in vitro by Nuclei of Brain Neurons and Analogous Proteins of other Tissues	70
<i>Galoyan A. A., Bobruskin J. D., Gurvits B. Ya., Abramyan G. E.</i> Calcium independent activators of cyclic nucleotide phosphodiesterase	78
<i>Dovedova E. L.</i> The Effect of Delta-Sleep Inducing Peptide on Metabolism of Biogenic Amines under Experimental neuro- and psychopathic disturbances	87
<i>Gulyaeva N. V., Bikbulatova L. S., Obidin A. B., Atrapetyanz M. G., Kruglikov R. I.</i> Neuropeptide Administration Induces a Long-Lasting Decrease of Lipid Peroxidation in Rat Brain	95

Short communications

<i>Taranova N. P., Nilova N. S.</i> The Level of Antioxidants in Rat Brain Synaptosomes under Sleep Deprivation	101
<i>Arakelyan L. N., Armenyan A. R., Sraplonyan R. M., Karapetyan R. H., Sahakyan F. M., Sahakyan S. A., Galoyan A. A.</i> The Effect of Neurohormone "C" on the Release and Uptake of ^3H -Noradrenaline in Rat Brain Hypothalamic Synaptosomes	106

Reviews

<i>Etingof R. N.</i> Hereditary Retinal Dystrophy: Association with Metabolism	111
<i>Nikushkin E. V.</i> Lipid Peroxidation in the CNS in the Normal State and in Pathology	124

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

<i>Lukjanenko A. I., Reva A. D.</i> The Activity of γ -Glutamyltranspeptidase in Different Regions and Subcellular Fractions of Human Brain	146
<i>Sulakvelidze T. S.</i> About Physiological Effects of Vasopressin and Oxytocin Administered into the Liquor System	147
<i>Melkonyan M. M.</i> 3,5-Ditertbutyl-4-hydroxyphenylpropanol (Gamma-propanol) Controls Lipid Peroxidation in the Brain of Animals Subjected to Acoustic Stress	148
<i>Saitmuratova O. Kh.</i> Effect of Some Exogenous Substances of Neuronal Nuclear Protein Synthesis	149