

ТОМ 8, № 2, 1989

ISSN 0203-493X

НЕЙРОХИМИЯ

ՆԵՅՆՈՒՄԻԱ



АКАДЕМИЯ НАУК СССР
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

НЕЙРОХИМИЯ
ՆԵՅՐՈՔԻՄԻԱ

ТОМ 8, ВЫП. 2
АПРЕЛЬ—ИЮНЬ

Журнал основан в 1982 году
Выходит 4 раза в год

ИЗДАТЕЛЬСТВО АН АРМЯНСКОЙ ССР
ЕРЕВАН 1989

Набрано на диалоговой издательской системе (ДИС)
в Вычислительном центре АН Армянской ССР

Программист А.Г. Оганесян

Ст. редактор Э.А. Хачатурова

Лит. сотрудник Г.Р. Григорян

Сдано в набор 12.03.89г. Подписано в печать 30.06.88. ВФ 04077

Формат 70×108 ¹/₁₆. Бумага №1

Гарнитура «тип Таймс». Печать офсетная.

Печл. 8,75, усл. печ. л. 12,25 учет.-издл. 10,38 Тираж 665 экз. Заказ №1006

Издат. 7563. Цена 1р. 60к.

Издательство АН Арм.ССР, 375019, Ереван, пр. Маршала Баграмяна, 24-г.

Типография Издательства АН АрмССР, 378310 г. Эчмиадзин

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. ТЯХЕПЬЛД, 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. МИКЕЛАДЗЕ, 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. ЭТИНГОФ

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 трансммиттеров и их рецепторов, глии и нейронов, хромаффинных 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



АРМЕН АНУШАВАНОВИЧ ГАЛОЯН

(к 60-летию со дня рождения)

Исполнилось 60 лет со дня рождения и 35 лет научной деятельности крупного отечественного нейрохимика, директора Института биохимии АН АрмССР, главного редактора журнала «Нейрохимия», академика АН АрмССР Галояна Армена Анушавановича.

А.А.Галоян родился 1 мая 1929г. в с.Анушаван Армянской ССР в семье врача. После окончания с отличием лечебного факультета Ереванского государственного медицинского института в 1953г. он поступает в аспирантуру в Институт морфологии животных АН СССР им.А.Н.Северцева, где под руководством академика Х.С.Коштоянца выполняет кандидатскую диссертацию по функциональной биохимии мозга, которую защищает в 1956г. После окончания аспирантуры работает в Институте мозга АМН СССР в лаборатории гистохимии. В 1958г. возвращается в Армению, работает заведующим организованной им лаборатории биохимии нейрогомонов Института биохимии АН АрмССР. С 1965 по 1979гг. он является зам.директора Института биохимии АН АрмССР, с 1979 по 1981гг. — директором Института экспериментальной биологии АН АрмССР, а с 1981г. — директором Института биохимии АН АрмССР.

В 1964г. А.А.Галоян успешно защищает докторскую диссертацию, посвященную обнаруженным и впервые им описанным кардиоактивным нейрогомонам гипоталамуса. В 1966г. ему присваивается звание профессора, в 1971г. он избирается членом-корреспондентом АН АрмССР, а в 1986г. — академиком АН АрмССР.

Трудно охватить и перечислить все научные достижения, принадлежащие А.А.Галояну и возглавляемому им коллективу сотрудников. К их числу

относится разработка им с конца 50-х годов такой весьма важной как с общепедагогической, так и с практической (клинической) сторон области — биохимии нейрогормонов и молекулярных основ их функциональной активности. Результаты его во многом оригинальных исследований в этом направлении представляют собой ценный вклад в нейрохимию. Крупное значение имеют и сделанные проф. А.А.Галояном на основе полученных экспериментальных данных творческие обобщения.

Так, в 1959—1962 гг. проф. А.А.Галояном был впервые установлен нейромедиаторный и эндокринный механизм образования и выделения пептидных нейрогормонов клетками гипоталамических ядер. В 1962 г. проф. А.А.Галоян открыл и выделил из гипоталамуса 3 кардиоактивных гормона и установил их пептидную (гликопептидную) природу. Эти индивидуальные агенты были затем обнаружены и в крови. Было показано, что новые нейрогормоны обладают свойством расширять коронарные сосуды сердца. В 1967 г. А.А.Галоян установил феномен нейросекреторного гормонообразования предсердия, а затем выделил гликопептидные гормоны из сердца, тем самым заложил основу теорий об эндокринном сердце.

Теоретическую значимость исследований А.А.Галояна и созданной им научной школы невозможно переоценить, поскольку ими установлены новые принципы регуляции деятельности мозга во взаимосвязи с деятельностью сердца и других внутренних органов. Эти принципы создают предпосылки для раскрытия патогенеза ряда нервных, эндокринных и сердечно-сосудистых заболеваний.

Проф. А.А.Галояном были обнаружены в гипоталамусе также особые водорастворимые нейроспецифические белки (1964 г.), причем было доказано, что эти белки не только являются носителями кардиоактивных нейропептидных гормонов, но и служат их предшественниками, образуя их в результате расщепления под влиянием протеолитических ферментов, которые также стали предметом изучения проф. А.А.Галояна. На основе этих данных он разработал плодотворную пептидную теорию нейроэндокринной регуляции функции сердца.

В 1965, 1967 гг. А.А.Галоян совместно с чехословацкими коллегами проводит исследования в Институте органической химии и биохимии Академии наук ЧССР в области изучения химической структуры гликопептидов мозга. В 1973 г. по приглашению директора Нейрохимического центра в Нью-Йорке проф. А.Лайта и лауреата Нобелевской премии проф. Р.Гиймена (Институт Солка, Сан-Диего) А.А.Галоян работает в их лабораториях, а также в лаборатории проф. Л.Крэга (Рокфеллеровский университет, Нью-Йорк), где занимается исследованием ферментативного механизма генеза пептидных гормонов мозга, а также химических и биологических свойств нейропептидов и специфических белков мозга.

Результаты фундаментальных исследований проф. А.А.Галояна и его сотрудников за последние 25 лет по биохимии гипоталамической регуляции, нейроспецифическим белкам головного мозга, их метаболизму и кардиоак-

тивными нейропептидам, а также кардиогормонам получили широкое признание и подтверждение в последующих работах виднейших зарубежных специалистов. Следует подчеркнуть, что проф. А.А.Галоян является признанным зачинателем исследований органотропных эффектов всех основных гипоталамических нейропептидов.

Способы выделения новых нейрогормонов мозга запатентованы в США, Швеции, Франции, Канаде, ГДР, Венгрии, ФРГ, Японии. США и Япония подали заявки на приобретение лицензий на способы выделения кардиомиметических биологически активных соединений мозга.

За последние 10 лет А.А.Галоян и сотр. получили в индивидуальном виде множественные формы кардиоактивных нейропептидов, выяснив молекулярные механизмы действия некоторых из них на гладкую мускулатуру. Получены данные первостепенной важности по биохимии метаболического влияния нейропептидов на обмен основных посредников клетки, имеющих важное значение общебиологического характера. Так, например, открыта новая система нейропептидов гипоталамуса с молекулярной массой 3000—7000 Д, активирующих Ca^{2+} - кальмодулинзависимые ферменты (фосфодиэстераза сАМР и сGMP, 5'-нуклеотидаза, киназа легкой цепи миозина и т.д.) без участия ионов кальция и кальмодулина. Они, по мнению А.А.Галояна, являются первыми активаторами этих ферментов, действующими в концентрациях, при которых кальмодулин и ионы кальция не в состоянии образовать активные комплексы. Автор назвал их С-модулинами или дубликаторами кальмодулина. Эти пептиды оказались также коронаросуживающими соединениями; активизируя киназу легкой цепи миозина, они способствуют ее фосфорилированию, что приводит к сокращению стенки коронарных сосудов.

Глубокое изучение молекулярных механизмов коронарорасширяющих нейропептидов на гладкую мускулатуру привели к разработке новых представлений о кальциймобилизирующих системах из клеток гладких мышц под влиянием полипептидов гипоталамуса.

За последнее время А.А.Галоян и сотр. выделили из гипоталамуса Ca^{2+} , кальмодулинзависимую фосфодиэстеразу в индивидуальном виде, обладающую также 5'-нуклеотидазной активностью. Одновременное увеличение сАМР и 5'-АМР (под влиянием коронарорасширяющего нейрогормона «С»), а также уменьшение их содержания (под влиянием «С»-модулинов), создает условия для противоположно направленного действия указанных нейропептидов на гладкую мускулатуру сердечных сосудов.

На основании обширного биохимического, фармакологического и морфологического материала А.А.Галоян выдвинул концепцию о функциональной системе эндокринное сердце—нейросекреторный гипоталамус.

Научные разработки А.А.Галояна и его школы выдвинули его в число ведущих отечественных и зарубежных нейрохимиков. Как директор Института биохимии АН АрмССР он вносит большой вклад в развитие приоритетных направлений нейрохимии и нейробиологии, уделяет большое внимание

росту научных кадров; он подготовил свыше 25 докторов и кандидатов наук, является автором монографий и более 250 опубликованных статей. Возглавляемый проф. А.А.Галояном Институт биохимии АН АрмССР стал признанным крупным научным нейрохимическим центром нашей страны. А.А.Галоян многократно представлял нашу страну, выступая с докладами на международных научных форумах. В 1983—1986 гг. он входил в состав Совета Международного общества нейрохимиков (представитель СССР), а в настоящее время является членом этого общества и одним из редакторов издаваемого в США журнала «Neurochemical Research».

О широком признании заслуг А.А.Галояна в развитии науки свидетельствует избрание его членом Нью-Йоркской Академии наук. А.А.Галоян ведет большую научно-организационную работу на посту председателя Общества биохимиков Армении, члена Президиума правления и национального комитета Всесоюзного общества биохимиков, председателя Секции нейрохимии Научного совета по биохимии человека и животных АН СССР, главного редактора Всесоюзного журнала «Нейрохимия», председателя Межведомственного совета по физико-химической биологии и биотехнологии при Президиуме АН АрмССР.

За большие заслуги в развитии науки А.А.Галоян награжден орденом «Знак почета», почетной грамотой Президиума Верховного совета Армянской ССР и медалями.

А.А.Галояна отличают такие качества, как большая эрудиция, научная интуиция, целеустремленность и исключительная доброжелательность и отзывчивость. Всю свою энергию и талант он отдает для становления нейробиологической науки в Армении и дальнейшего развития отечественной нейрохимии.

Редколлегия сердечно поздравляет дорогого Армена Анушавановича с юбилеем и желает ему крепкого здоровья, новых научных поисков и больших творческих успехов.

РЕДКОЛЛЕГИЯ

УДК 612.821.44+577.175.82

НЕЙРОТРАНСМИТТЕРНЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ МОЗГА ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЛИНИЙ РАЗНОТОЛЕРАНТНЫХ К ЭТАНОЛУ КРЫС

Островский С.Ю., *Киинмаа К.

Институт биохимии АН БССР, Гродно

*Исследовательские лаборатории фирмы «Алко», Хельсинки, Финляндия

Исследовано содержание нейротрансмиттерных аминокислот (ГАМК, Глу, Асп, Гли, Тау), некоторых их предшественников (Глн, Тре) и двух возможных нейромодуляторов (этаноламин и фосфоэтаноламин) в правом и левом полушариях, мозжечке и стволе мозга генетических линий высокотолерантных (АТ) и низкотолерантных (АНТ) к наркотическому действию алкоголя крыс. В левом полушарии АНТ крыс меньше, чем у АТ Гли и Глн, но соотношение суммы тормозных к возбуждающим аминокислотам у АТ линии ниже в левом полушарии и стволе мозга. Анализ корреляционных взаимоотношений всех исследованных показателей друг с другом свидетельствует о наличии существенных различий в формировании фонда и функционировании нейротрансмиттерных аминокислот в различных отделах мозга АТ и АНТ линий крыс.

Нейрохимические механизмы чувствительности животных и человека к действию этилового алкоголя широко обсуждаются по особенностям обмена АХ, катехоламинов, серотонина и ГАМК [1,2]. Три из названных нейромедиаторов являются прямыми производными аминокислот, одна из которых (Глу) сама выступает как нейротрансмиттер. Второй аминокислотой сходного с Глу механизма действия является Асп. Противоположными, тормозными эффектами, обладают Гли и Тау. Все названные аминокислоты вместе с ГАМК образуют единую систему, играющую важную роль в поддержании в ЦНС оптимальных базовых взаимоотношений между процессами торможения и возбуждения. Высказывается даже точка зрения, что функциональная готовность мозга в большей мере зависит от нейротрансмиттерных аминокислот, чем от классических нейромедиаторов, участвующих главным образом в реализации лишь части межнейрональных связей [3,4]. Особенности обмена и распределения в мозгу нейротрансмиттерных аминокислот в связи с проблемами изучения наркомании и алкоголизма до сих пор специально не рассматривались, хотя некоторые сведения об общем пуле всех свободных аминокислот мозга при алкогольной интоксикации уже описаны [2].

В патогенезе алкоголизма особая роль приписывается процессам,

обеспечивающим устойчивость (толерантность) мозга к действию этанола [5]. Простейшим способом тестирования толерантности является регистрация наркотического действия алкоголя по продолжительности сна в ответ на введение достаточно высокой дозы этанола. Показано, что АТ (короткоспящие) и АНТ (долгоспящие) животные представляют собой группы, в которых при хронической алкогольной интоксикации, с различной скоростью формируется физическая зависимость от алкоголя, являющаяся основным признаком алкоголизма [6]. Таким образом, разнотолерантные к этанолу животные могут рассматриваться как группы с различным риском в моделировании соответствующей патологии. Путем длительного отбора получены генетические линии крыс АТ по отношению к этанолу [7]. Изучение особенностей обмена веществ, и в частности классических нейротрансмиттеров [8,9], у таких животных рассматривается как один из перспективных подходов в исследовании патогенеза алкоголизма.

Материалы и методы

АТ и АНТ крыс из питомника Исследовательских лабораторий фирмы «Алко» (Финляндия) содержали на стандартном рационе питания. Животных (по 7 крыс в группе) массой 470—530 г декапитировали, мозг немедленно извлекали и разделяли на правое и левое полушария, мозжечок и ствол. Выделенные отделы немедленно погружали в жидкий азот, а затем гомогенизировали в растворе 3%-ной сульфосалициловой кислоты. Безбелковые центрифугаты использовали для определения нингидриноположительных соединений на автоматическом анализаторе аминокислот Т—339 (ЧССР) [10]. Полученные результаты оценивали на ЭВМ «Мера-Камак 125/СМ4А» по критерию достоверности различий и коэффициентам корреляции [11].

Результаты и обсуждение

По содержанию нейротрансмиттерных аминокислот АТ и АНТ крысы (табл.1) различаются по сравнимым отделам мозга весьма незначительно. Только уровень Гли в левом полушарии АНТ животных несколько ниже и в том же отделе мозга меньше Глн, которому, как путешественнику Глу, сейчас так же приписываются нейрорегуляторные функции [12]. АТ животные, однако, отличаются от АНТ по распределению аминокислот между различными отделами мозга внутри каждой из групп. Уровни ГАМК и Глн, например, в мозжечке по сравнению с таковыми в полушариях и стволе мозга ниже только у АТ крыс. Для оценки интегративных характеристик состояния процессов торможения и возбуждения у сравниваемых групп животных используются суммарные показатели и их взаимоотношения (табл.2) [4]. При таком подходе в двух отделах мозга АНТ крыс четко регистрируется преобладание тормозных аминокислот над возбужда-

ющими. Полученные данные объясняют тот факт, что в ответ на одинаковую дозу алкоголя ANT животные спят дольше, чем AT и тестирование толерантности к этанолу по любому другому показателю, например, изменению ректальной температуры, может не совпадать с вызываемым алкоголем торможением ЦНС [5]. Достоин внимания и то обстоятельство, что право-левая асимметрия мозга четко выявляется при алкогольной патологии [13], и преобладание тормозных аминокислот только в левом полушарии ANT животных в этой связи, по-видимому, не является случайным.

Таблица 1
Содержание нейротрансмиттерных аминокислот в мозгу высокотолерантных AT и низкотолерантных ANT крыс, нмоль/г

| Отделы мозга | ГАМК | Глу | Гли | Гли | Тау | Асп |
|------------------|------------------------|---------------|------------------------|-------------------------|-----------|----------|
| | | | AT крысы | | | |
| Правое полушарие | 467±53 | 3043±467 | 579±64 | 311±24 | 3731±527 | 715±52 |
| Левое полушарие | 540±55 | 3281±420 | 624±67 | 330±18 | 4086±293 | 755±95 |
| Мозжечок | 329±29 | 1657±74 | 348±21 | 1019±32 | 2646±385 | 649±62 |
| Ствол | 515±64 | 3778±1261 | 633±119 | 289±36 | 3270±542 | 743±165 |
| | *1-3 • 3-4 • 2-3 | *1-3 • 2-3 | *1-3 • 2-3 • 3-4 | *1-3 • 2-3 • 3-4 | *2-3 | |
| | | | ANT крысы | | | |
| Правое полушарие | 729±157 | 4730±1195 | 841±198 | 338±59 | 6301±1418 | 1044±256 |
| Левое полушарие | 438±37 | 2524±499 | 447±55** | 222±12** | 4936±983 | 530±83 |
| Мозжечок | 456±81 | 1981±433 | 461±108 | 1025±282 | 4814±1442 | 694±166 |
| Ствол | 478±62 | 2933±388 | 667±93 | 291±34 | 4936±984 | 743±153 |
| | | • 1-3 | | • 1-3 • 2-3 • 3-4 | | |

Примечание: *достоверные ($p < 0,05$) различия между отделами мозга у крыс одной линии; **достоверные ($p < 0,05$) различия между одноименными отделами AT и ANT крыс

Таблица 2
Интегративные показатели, характеризующие соотношение тормозных и возбуждающих нейротрансмиттерных аминокислот в мозгу AT и ANT крыс

| Показатели | Правое полушарие | | Левое полушарие | | Мозжечок | | Ствол | |
|-------------------------|------------------|---------|-----------------|----------|----------|---------|---------|----------|
| | AT | ANT | AT | ANT | AT | ANT | AT | ANT |
| ГАМК+Гли+Тау (мкМ) | 4,5±0,5 | 6,8±1,3 | 5,0±0,3 | 5,6±1,0 | 4,0±0,4 | 6,3±1,8 | 4,1±0,5 | 4,7±0,5 |
| Асп+Глу (мкМ) | 3,8±0,5 | 5,8±1,4 | 4,0±0,5 | 3,1±0,5 | 2,3±0,1 | 2,7±0,5 | 4,5±1,4 | 3,7±0,5 |
| ГАМК+Гли+Тау Асп+Глу | 1,2±0,1 | 1,3±0,1 | 1,3±0,1 | 1,8±0,2* | 1,7±0,2 | 2,2±0,3 | 1,1±0,1 | 1,4±0,1* |

Более тонкие особенности формирования аминокислотных нейрот-

рансмиттерных пулов у АТ и АНТ крыс можно проследить на основании корреляционного анализа всех полученных данных. В табл.3 включены дополнительно сведения по фосфоэтаноламину (ФЭА) и этаноламину

Таблица 3

Коэффициенты корреляции (r) между нейротрансмиттерными аминокислотами мозга АТ и АНТ крыс (* $p < 0,05$)

| Сравниваемые показатели | Правое полушарие | | Левое полушарие | | Мозжечок | | Ствол | |
|-------------------------|------------------|-------|-----------------|-------|----------|-------|--------|-------|
| | АН | АНТ | АН | АНТ | АН | АНТ | АН | АНТ |
| ГАМК-Глу | 0,57 | 0,98* | 0,83* | 0,21 | 0,03 | 0,90* | 0,77* | 0,55 |
| ГАМК-Гли | 0,83* | 0,98* | 0,85* | 0,11 | -0,55 | 0,92* | 0,84* | 0,74 |
| ГАМК-Гли | -0,06 | 1,0* | 0,85* | 0,26 | 0,15 | 0,72* | 0,94* | 0,38 |
| ГАМК-Тау | 0,72* | 0,96* | 0,49 | 0,28 | 0,85* | 0,88* | 0,78* | 0,63 |
| ГАМК-Асп | 0,87* | 0,97* | 0,81* | 0,22 | 0,52 | 0,87* | 0,84* | 0,97* |
| ГАМК-Фза | 0,42 | 0,58 | 0,55 | 0,31 | 0,42 | 0,50 | -0,06 | 0,15 |
| ГАМК-Эам | 0,65 | 0,19 | 0,52 | -0,20 | 0,35 | 0,14 | -0,46 | -0,07 |
| Гли-Глу | 0,29 | 0,98* | 0,87* | 0,25 | 0,90* | 0,78* | 0,90* | 0,93* |
| Гли-Гли | -0,11 | 0,98* | 0,87* | 0,25 | 0,55 | 0,90* | 0,95* | 0,82* |
| Гли-Тау | 0,44 | 0,97* | 0,53 | 0,13 | 0,25 | 0,92* | 0,90* | 0,69 |
| Гли-Асп | 0,26 | 0,98* | 0,82* | 0,31 | 0,39 | 0,94* | 0,95* | 0,50 |
| Гли-Фза | 0,79* | 0,60 | 0,50 | 0,81* | 0,34 | 0,44 | 0,14 | 0,38 |
| Гли-Эам | 0,35 | 0,21 | 0,17 | -0,60 | -0,38 | 0,18 | -0,50 | -0,19 |
| Тау-Глу | 0,60 | 0,99* | 0,74* | 0,71* | 0,09 | 0,92* | 0,84* | 0,67 |
| Тау-Гли | 0,71* | 0,97* | 0,76* | 0,63 | -0,27 | 0,93* | 0,87* | 0,60 |
| Тау-Асп | 0,42 | 0,98* | 0,76* | 0,69 | 0,61 | 0,94* | 0,84* | 0,68 |
| Тау-Фза | 0,80* | 0,70* | 0,77* | 0,25 | 0,37 | 0,34 | 0,23 | 0,75* |
| Тау-Эам | 0,45 | 0,14 | -0,30 | -0,23 | 0,06 | 0,23 | -0,36 | -0,52 |
| Глу-Гли | 0,73* | 1,0* | 0,97* | 0,96* | 0,53 | 0,99* | 0,99* | 0,93* |
| Глу-Асп | 0,44 | 1,0* | 0,99* | 0,99* | 0,38 | 0,73* | 0,97* | 0,65 |
| Глу-Фза | 0,34 | 0,59 | 0,80* | 0,29 | 0,57 | 0,22 | 0,08 | 0,29 |
| Гли-Эам | 0,21 | 0,16 | -0,01 | -0,32 | -0,19 | -0,09 | -0,69* | 0,01 |
| Асп-Гли | 0,80* | 0,99* | 0,97* | 0,97* | 0,28 | 0,94* | 0,99* | 0,83* |
| Асп-Фза | 0,56 | 0,14 | 0,79* | 0,35 | 0,16 | 0,48* | 0,12 | 0,17 |
| Асп-Эам | 0,43 | 0,14 | -0,04 | -0,37 | 0,30 | -0,01 | -0,58 | -0,03 |

Примечание. *статистически значимые различия с контролем при $p = 0,05$; **различия статистически достоверные в сравнении с шоком ($p < 0,001$)

(ЭАМ), поскольку двум последним производным аминокислот приписываются нейромодуляторные функции [14,15]. В основном наборе нейротрансмиттерных аминокислот, сопоставленном с уровнем ГАМК, сразу бросается в глаза различие между правым и левым полушариями мозга сравниваемых групп животных. Правое полушарие АНТ крыс функционально

подобно (по коэффициентам корреляции) левому полушарию АТ животных. Сходная картина воспроизводится и со вторым (Гли) тормозным компонентом. Еще более выражена указанная выше закономерность в отношении Тау. Из данных табл.3 также следует, что симметричные полушария мозга высоко- и низкотолерантных к этанолу животных по их аминокислотному нейротрансмиссерному пулу организованы неодинаковым образом. Соответствующий физиологический эксперимент на основании полученных данных позволил бы протестировать право-левую асимметрию [16] тех же животных в поведенческих моделях.

Взаимоотношения интересующих нас аминокислот в мозжечке (табл.3) весьма существенно различаются по более высокой сопряженности показателей у АНТ крыс по сравнению с АТ. По-видимому, в этом отделе мозга у животных более чувствительных к тормозному (наркотическому) действию этанола все аминокислоты (тормозные и возбуждающие) активно участвуют в противодействии внешнему дестабилизирующему состоянию ЦНС агенту. Особых качественных (по знаку коэффициента корреляции) различий в формировании пула нейротрансмиссерных аминокислот ствола мозга сравниваемых крыс не выявляется. Можно говорить лишь о некоторых более достоверных связях показателей в парах с ГАМК, Гли и Тау для АТ животных.

Уровень Гли как нейромедиатора трудно оценивать в связи с использованием аминокислоты в целом ряде других общеметаболических процессов [17,18]. Тре как специфический предшественник Гли заслуживает при этом отдельного рассмотрения, поскольку в треонинальдолазной реакции, помимо Гли, образуется ацетальдегид, которому в последнее время приписывается роль не только в механизмах алкогольной интоксикации, но также и в патогенезе алкоголизма [19]. Судя по нашим показателям (табл.4), Тре по-разному используется как предшественник Гли в различных отделах мозга АТ и АНТ крыс. Интересно, что и другой (Сер) предшественник Гли повторяет те же закономерности. По-видимому, все три аминокислоты образуют достаточно взаимосвязанную систему глицинового гомеостаза при участии треонинальдолазы и серинметилтрансферазы [18], которые функционируют с некоторыми особенностями у разнотолерантных к алкоголю животных. Подобие взаимоотношений двух аминокислот (Сер, Тре) с продуктами их катаболизма (Гли) дает право на утверждение, что образование тормозного нейротрансмиссера важнее, чем эндогенный синтез ацетальдегида в треонинальдолазной реакции [19]. В этой связи становятся понятными и ранее полученные возможности активно влиять на уровень глицина в нервной ткани путем дополнительного парентерального введения крысам Тре [20].

Корреляционные взаимоотношения (r) в метаболическом пуле Глн в отделах мозга (АТ) и (АНТ) крыс ($*p < 0,05$)

| Сравнимые показатели | Правое полушарие | | Левое полушарие | | Мозжечок | | Ствол | |
|----------------------|------------------|-------|-----------------|-------|----------|-------|-------|-------|
| | АТ | АНТ | АТ | АНТ | АТ | АНТ | АТ | АНТ |
| Тре-Гли | 0,32 | 0,86* | 0,85* | 0,95* | 0,30 | 0,92* | 0,98* | 0,36 |
| Сер-Гли | 0,28 | 0,97* | 0,35 | 0,49 | -0,05 | 0,97* | 0,79* | 0,34 |
| Сер-Тре | 0,85* | 0,90* | 0,33 | 0,35 | 0,07 | 0,95* | 0,72* | 0,95* |

В связи с анализом корреляционных взаимоотношений в пуле нейротрансмиттерных аминокислот уместно остановиться на некоторых более общих закономерностях, выявляемых при анализе экспериментальных данных. Обращает на себя внимание независимая от линий животных и отделов мозга положительная взаимосвязь сдвигов в паре Глу—Глн (табл.3). Этим объясняется частичное совпадение корреляций ГАМК—Глн с таковыми для ГАМК—Глу, поскольку первый участник этой пары показателей образуется только из Глу. Аналогичная закономерность прослеживается и в отношении Асп—Глн при сравнении с Асп—Глу. Полученные результаты находятся лишь в кажущемся противоречии с результатами опытов, в которых исследовали судьбу равномерно меченного Глн в сенсорно-двигательной зоне коры мозга животных. В элюенте, получаемом при кратковременном деполаризующем стимулировании этого участка мозга, метка из Глн сразу же обнаруживалась, в основном, в составе Глу, но не ГАМК [21]. Решающим фактором в оценке приведенных данных, по нашему мнению, являются различия в сравнимых временных интервалах, поскольку наши расчеты (табл.3) характеризуют значительно более длительные периоды функционирования системы. Прямое влияние Глн на уровень ГАМК в мозгу было продемонстрировано нами ранее [22] в опытах на животных с различной выраженностью алкогольной мотивации. Полученные данные указывают на несомненную роль Глн как депо Глу в мозгу, а не только как простого переносчика аммиака из ЦНС в печень и почки [23]. Первая функция при этом представляется более важной, чем вторая, поскольку при обратных оценках соответствующие (Глн—Глу) коэффициенты корреляции были бы отрицательными, а не положительными. Седативные эффекты Глн, обусловленные, как это следует из наших данных, влиянием на уровень ГАМК в мозгу, уже используются в медицине [24].

Сопряженность сдвигов в содержании Тау и ФЭА, известная по наблюдениям других авторов для гиппокампа [14], подтверждена нами и для полушарий мозга. Вообще нейромодуляторные функции ФЭА и ЭАМ [14,15], если они и проявляются в каких-то частных экспериментальных

условиях, общей роли в распределении основных нейротрансмиттерных аминокислот, по-видимому, не играют. Количество достоверных корреляционных коэффициентов в соответствующих парах относительно невелико. Можно отметить лишь, что наработка ФЭА и ЭАМ в киназной реакции [25], возможно, имеет определяющее значение только в левом полушарии ($r = -0,92$) и стволе ($r = -0,75$) мозга ANT крыс. Уровень ФЭА в других отделах мозга определяется множеством других переменных, не учитываемых примененным нами анализом.

Резюмируя все изложенные данные, можно утверждать, что генетические линии разнотолерантных к наркотическому действию этанола крыс (AT и ANT) отличаются друг от друга по содержанию Гли и Глн в левом полушарии мозга, по преобладанию тормозных аминокислот над возбуждающими в левом полушарии и стволе мозга ANT животных и по взаимоотношениям различных нейротрансмиттерных аминокислот друг с другом во всех исследованных отделах мозга.

BRAIN NEUROTRANSMITTER AMINO ACIDS IN GENETIC STRAINS OF RATS WITH DIFFERENT TOLERANCE TO ETYL ALCOHOL

Ostrovsky S.Yu., *Kiinmaa K.

Institute of Biochemistry, Byelorussian

*SSR Academy of Sciences, Grodno, *Alco Research Laboratories, Helsinki, Finland*

Concentration of neurotransmitter aminoacids (GABA, Gly, Asp, Glu, Tau), some of their precursors (Gln, Thr) and two possible neuromodulators (ethanolamine and phosphoethanolamine) were studied in the right and left hemispheres, cerebellum and brain stem of rat strains with high (AT) and low tolerance (ANT) to the hypnotic effect of ethanol. The left hemisphere of ANT rats had lower concentrations of Gly and Gln than that of AT rats, but the ratio of the total amount of inhibitory aminoacids to excitatory ones was lower in the left hemisphere and brain stem of the AT strain. Analysis of correlation between various indexes indicated significant differences in the formation of the pool and functioning of neurotransmitter aminoacids in different brain regions of AT and ANTrat strains.

ЛИТЕРАТУРА

1. Боброва Н.Л.—В кн.: *Этанол и обмен веществ* (под ред. Ю.М.Островского), с.104—118, Минск, Наука и техника, 1982.
2. Сыгинский И.А. Биологические основы действия этанола на центральную нервную систему, М., Медицина, 1980.
3. Bloom F.E., *Am.J.Physiol.*, v.246, N3, p.184, 1984.
4. Cooper J.R., Bloom F.E., Roth R.H. *The biochemical basis of neuropharmacology*, N.Y., Oxford

Univ. Press, 1978.

5. *Tabakoff B., Melchior C.L., Hoffman P.L.* Alcoholism: Clin.Exp.Res., v.6, p.356, 1982.
6. *Fuller J.L.* —In: Animal Models in Alcohol Research, L.—N.Y., Acad.Press, p.57, 1980.
7. *Eriksson K.* —In: Animal Models in Alcohol Research, L.—N.Y., Acad.Press, p.3, 1980.
8. *Antee L., Attila L., Kiinmaa K.* —In: Animal Models in Alcohol Research, L.—N.Y., Acad.Press, p.51, 1980.
9. *Pista J.P., Huttunen M., Sarviharju M., Ylikari R.* Alcohol and Alcoholism, v.21, N2, p.181, 1986.
10. *Дзевени Т., Тергей Я.* Аминокислоты, пептиды и белки, М., Мир, 1976.
11. *Рокицкий П.Ф.* Биологическая статистика, Минск, Высшая школа, 1973.
12. *Yöüing A., Bradford H.* J.Neurochem., v.47, N5, p.1399, 1986.
13. *London W.* P.Alcohol, v.4, N3, p.207, 1987.
14. *Lehman A., Hamberger A.* J.Neurochem., v.42, N5, p.1286, 1984.
15. *Wolfensberger M., Felix D., Suenod M.* Neurosci.Lett., v.32, N1, p.53, 1982.
16. *Костандов Э.А.* Функциональная асимметрия полушарий мозга и несознательное восприятие, М., Наука, 1983.
17. *Montis G., Beaumont K., Javoy-Agid F.* J.Neurochem., v.38, N3, p.718, 1982.
18. *Musil J., Novakova O., Kunz K.* Biochemistry in Schematic Perspective, Prague, Avicenum, 1977.
19. *Островский Ю.М., Садовник М.Н., Сатановская В.И.* Биологический компонент в генезисе алкоголизма, Минск, Наука и техника, 1986.
20. *Maher T.J., Wurtman R.J.* Life Sci., v.26, N16, p.1283, 1979.
21. *Thanki C.M., Sugden D., Thomas A., Bradford H.F.* J.Neurochem., v.41, N3, p.611, 1983.
22. *Ostrovsky S.Yu.* Subst.Alcohol Actions/Misuse, v.5, p.247, 1985.
23. *Cooper A. Plum F.* Physiol.Rev., v.67, N2, p.440, 1985.
24. *Negwer M.N.* Organic Chemical Drugs and Their Synonyms, Berlin, Academic-Verlag, 1971.
25. *Kunishita T.J.* J.Neurochem., v.48, N1, p.1, 1987.

Поступила 13.10.1988

УДК 577.150.8+577.17

ДЕЙСТВИЕ L-ДОФА И 5-ГИДРОКСИТРИПТОФАНА НА АКТИВНОСТЬ МАО МОЗГА КРЫС

Войтенко Н.Н., Пиянзин А.И.

Институт цитологии и генетики СО АН СССР, Новосибирск

Изучали влияние однократного интраперитонеального и интрацеребровентрикулярного введения L-ДОФА и 5-гидрокситриптофана на активность МАО мозга крыс линии *Wistar*. Показано, что L-ДОФА и 5-гидрокситриптофан при обоих способах введения активировали МАО типа А и типа В; активностью Д, введенный как интраперитонеально, так и интрацеребровентрикулярно, предотвращал активирующее действие L-ДОФА и 5-гидрокситриптофана на МАО типа А и типа В. Дофамин и серотонин при интрацеребровентрикулярном введении существенного влияния на МАО мозга не оказывали.

Проблема регуляции в организме активности МАО [(МАО) амин:кислород оксидоредуктаза (дезаминирующая) (содержащая флаavin)], одного из основных ферментов деградации биогенных аминов, до сих пор не вполне выяснена. Существуют малочисленные и неоднозначные данные об участии в регуляции активности МАО ее субстратов [1] серотонина и норадреналина. Имеются данные о том, что L-ДОФА, предшественник дофамина, изменяет активность МАО [2—4]. В последние годы стало известно, что [³H] ДОФА связывается с негистоновыми белками хроматина [5]. Эти факты позволяют предположить, что действие L-ДОФА на активность МАО опосредовано геном и L-ДОФА может инициировать транскрипцию генов, кодирующих МАО, белки или пептиды, которые участвуют в посттранскрипционной модификации активности МАО. Данные о влиянии 5-гидрокситриптофана на активность МАО единичны и носят косвенный характер [6].

Цель настоящего исследования заключалась в изучении влияния на активность МАО биогенных аминов дофамина и серотонина и их предшественников L-ДОФА и 5-гидрокситриптофана.

Материалы и методы

Работа выполнена на 4-месячных самцах крыс линии *Wistar* массой 250 г. За два дня до опыта крыс помещали в индивидуальные клетки, корм и воду не ограничивали. Опыты проводили в 10—12 ч. В первой серии опытов крысам вводили однократно интраперитонеально L-ДОФА

(«Reanal», Венгрия) в дозе 80 мг/кг за 60 мин, 5-гидрокситриптофан («Calbiochem», Швейцария) в дозе 100 мг/кг за 40 мин до декапитации. Время действия препаратов соответствовало их максимальному влиянию на уровень дофамина [7] и серотонина [8] в мозгу. Актиномицин Д («Fluka», ФРГ) вводили в этой серии опытов интраперитонеально в дозе 10 мкг/100 г [9] за 60 мин до введения L-ДОФА или 5-гидрокситриптофана. Контрольным животным интраперитонеально вводили физиологический раствор. Во второй серии опытов L-ДОФА вводили интрацеребровентрикулярно через предварительно вживленную в третий желудочек мозга канюлю в дозе 20 мкг, 5-гидрокситриптофан вводили в дозе 100 мкг в 10 мкл физиологического раствора и через 30 мин животных декапитировали. Актиномицин Д во второй серии опытов вводили интрацеребровентрикулярно [10] в дозе 1 мкг за 60 мин до интрацеребровентрикулярного введения L-ДОФА и 5-гидрокситриптофана. Контрольные крысы получали актиномицин Д без последующего введения препаратов L-ДОФА и 5-гидрокситриптофана.

Для разделения эффекта L-ДОФА и 5-гидрокситриптофана на активность MAO от эффекта дофамина и серотонина, которые образуются из L-ДОФА и 5-гидрокситриптофана соответственно, в третьей серии опытов интрацеребровентрикулярно вводили дофамин гидрохлорид («Koch Light», Англия) в дозе 10 мкг в 10 мл физиологического раствора. Серотонин креатининсульфат («Reanal», Венгрия) вводили в дозе 100 мкг в таком же объеме физиологического раствора. Через 30 мин крыс декапитировали. Контрольных и подопытных крыс декапитировали в одно и то же время суток. Мозг выделяли на холоде и гомогенизировали в 0,32 М растворе сахарозы. Неразделенную фракцию митохондрий, выделенную методом дифференциального центрифугирования [11], хранили при -20° до исследования. Инкубацию препаратов митохондрий, содержащих MAO, проводили при 37 в 0,1 М Na^+ , K^+ -фосфатном буфере, pH 7,4 [12] в течение 30 мин. В качестве субстратов использовали серотонин («Reanal», Венгрия) и бензиламин (Харьковский ХФЗ), специфические субстраты MAO типов А и Б соответственно. Активность MAO выражали в нмоль аммиака на мг белка за мин. Аммиак определяли после изотермической отгонки с последующим применением реактива Несслера и измерением оптической плотности при 410 нм [13]. Белок определяли по Лоури.

Результаты и обсуждение

Проведенные исследования показали, что под влиянием как L-ДОФА, так и 5-гидрокситриптофана, введенных однократно интраперитонеально, активность в мозгу крыс MAO типов А и Б существенно возрастала (табл.1). Предварительное ингибирование ДНК-зависимой РНК-полимеразы актиномицином Д [14] препятствовало активирующему действию L-ДОФА и 5-гидрокситриптофана на активность MAO типов А и Б, поскольку ее значение в обоих случаях под влиянием L-ДОФА и 5-гидрокситриптофана

на фоне актиномицина Д не повышалось по сравнению с теми значениями, которые наблюдали у крыс в присутствии только актиномицина Д (табл.1).

Таблица 1
Влияние актиномицина Д на измененную L-ДОФА и 5-гидрокситриптофаном активность MAO мозга крыс при интраперитонеальном введении препаратов (n=5)

| Серии опытов | MAO типа А | MAO типа Б |
|-------------------------------------|------------|------------|
| Физиологический раствор | 1,03±0,08 | 2,23±0,10 |
| L-ДОФА | 2,41±0,07* | 3,70±0,21* |
| 5-гидрокситриптофан | 2,07±0,16* | 2,90±0,22* |
| Актиномицин Д | 2,05±0,27* | 1,83±0,08* |
| Актиномицин Д + L - ДОФА | 1,90±0,19 | 1,72±0,17 |
| Актиномицин Д + 5-гидрокситриптофан | 2,13±0,09 | 1,97± 0,05 |

Примечание. * $p < 0,05$ по сравнению с физиологическим раствором.

Введенные однократно интрацеребровентрикулярно L-ДОФА и 5-гидрокситриптофан также повышали активность обоих типов MAO в головном мозгу крыс (табл.2). Актиномицин Д, введенный интрацеребровентрикулярно, как и введенный интраперитонеально, полностью предотвращал активизирующее влияние L-ДОФА и 5-гидрокситриптофана на MAO типов А и Б (табл.2). Полученные факты свидетельствуют о том, что L-ДОФА, 5-гидрокситриптофан и актиномицин Д оказывали сходное действие на MAO мозга крыс независимо от способа введения.

Как видно из табл. 1 и 2, актиномицин Д, введенный интраперитонеально или интрацеребровентрикулярно, существенно снижал активность MAO типа Б. Активность MAO типа А при этом существенно повышалась только при интраперитонеальном введении актиномицина Д (табл.1), а при интрацеребровентрикулярном его введении наблюдалась только лишь тенденция к ее повышению (табл.2).

Отношение активности MAO типа А к MAO типа Б в присутствии актиномицина Д увеличивалось в 2—2,5 раза и было более выражено в стволовой части мозга, чем в полушариях (табл.3).

Серотонин и дофамин вводили интрацеребровентрикулярно, так как эти препараты плохо проникают через ГЭБ. Серотонин и дофамин не оказывали существенного влияния на активность MAO типов А и Б головного мозга крыс, поскольку значения активностей MAO типов А и Б у контрольных крыс не отличались от активностей MAO мозга крыс, которым в третий желудочек мозга вводили дофамин и серотонин (табл.2).

Таблица 2

Влияние актиномицина Д на измененную L-ДОФА и 5-гидрокситриптофаном активность MAO мозга крыс при интрацеребровентрикулярном введении препаратов

| Серии опытов | MAO типа А | MAO типа Б |
|-------------------------------------|-----------------|-----------------|
| Физиологический раствор | 0,90±0,10 (6) | 1,15±0,09 (6) |
| Дофамин | 0,95±0,07 (6) | 1,14±0,08 (6) |
| Серотонин | 1,07±0,13 (6) | 1,23±0,21 (5) |
| L-ДОФА | 2,51±0,27* (6) | 2,22±0,13* (4) |
| 5-гидрокситриптофан | 2,33±0,06* (4) | 1,89±0,05* (4) |
| Актиномицин Д | 1,03 ± 0,20 (6) | 0,73±0,13* (6) |
| Актиномицин Д + L-ДОФА | 1,50 ± 0,13 (6) | 1,02± 0,21 (5) |
| Актиномицин Д + 5-гидрокситриптофан | 1,10±0,06 (5) | 1,05 ± 0,10 (5) |

Примечание. В скобках указано число животных, * $p < 0,05$ по сравнению с физиологическим раствором.

Таким образом, полученные в настоящем исследовании данные показали, что однократное введение L-ДОФА и 5-гидрокситриптофана оказывает активирующее действие на MAO мозга крыс. Сами нейромедиаторы—серотонин и дофамин в то же время и в тех же условиях существенного влияния на активность MAO мозга не оказывали. Под влиянием как интраперитонеального, так и интрацеребровентрикулярного введения применявшихся доз L-ДОФА и 5-гидрокситриптофана существенно возрастала активность обоих типов MAO мозга крыс. Действие L-ДОФА и 5-гидрокситриптофана на MAO мозга крыс было опосредовано, по всей видимости, геномом, поскольку актиномицин Д полностью предотвращал активирующее действие L-ДОФА и 5-гидрокситриптофана на MAO мозга крыс. Очевидно, L-ДОФА и 5-гидрокситриптофан за 30 мин инициируют транскрипцию генов, кодирующих индуцибельную группу MAO типов А и Б, поскольку известно, что без введения L-ДОФА и 5-гидрокситриптофана для регенерации 50% активности MAO головного мозга требовалось 11 дней [15], или транскрипцию генов, кодирующих белки или пептиды, участвующие в посттранскрипционной модификации активности MAO [16—18].

Применение актиномицина Д позволило выявить сложную картину регуляции активности MAO. Так, актиномицин Д подавлял экспрессию гена, кодирующего активность MAO типа Б и усиливал экспрессию гена, кодирующего активность MAO типа А. Последнее можно объяснить подавлением актиномицином Д синтеза мРНК, которая ингибирует проявление активности MAO типа А. То есть, по всей видимости, существует определенный фактор белковой или пептидной природы, который может

ингибировать активность МАО типа А. В настоящее время известны пептиды, ингибирующие и активизирующие МАО типа А [17—19], хотя молекулярные механизмы их действия пока не известны. Тем не менее, существуют данные о регулирующем действии пептида дельта-сна на активность МАО типа А [19] и, возможно, что регуляция активности МАО осуществляется на уровне деградации фермента, так как пептид дельта-сна регулирует одновременно и протеолиз [20].

Таблица 3

Изменение отношения активностей МАО А/ МАО Б в стволе и в полушариях головного мозга крыс при интраперитонеальном введении актиномицина Д

| Серии опытов | Ствол | Полушария |
|-------------------------------------|-------|-----------|
| Физиологический раствор | 0,86 | 0,80 |
| L-ДОФА | 0,66 | 0,64 |
| 5-гидрокситриптофан | 0,84 | 0,61 |
| Актиномицин Д | 2,02 | 1,49 |
| Актиномицин Д + L-ДОФА | 1,98 | 1,33 |
| Актиномицин Д + 5-гидрокситриптофан | 1,89 | 1,76 |

Наши данные о повышенной активности МАО типа А под влиянием L-ДОФА согласуются с данными предыдущих работ [21, 22], в которых показано, наряду с повышением уровня дофамина, снижение уровней норадреналина и серотонина, субстратов МАО типа А, под действием L-ДОФА. Судя по этим фактам, L-ДОФА является не только предшественником дофамина, повышающим его уровень в мозгу, но и фактором, обладающим способностью снижать уровни других биогенных аминов, нарушая при этом соотношения нейромедиаторов [22].

Полученные нами данные позволяют объяснить эффективность комбинированного применения L-ДОФА и ингибиторов МАО при лечении дофаминдефицитных состояний [23]. При комбинированном применении L-ДОФА и ингибиторов МАО содержание дофамина в мозгу увеличивается не только за счет вновь образованного дофамина из L-ДОФА, но и за счет дофамина, защищенного ингибиторами МАО от разрушения. Наряду с этим, ингибиторы МАО препятствуют усиленному дезаминированию норадреналина и серотонина МАО, активированной L-ДОФА, и таким образом способствуют сохранению соотношения этих нейромедиаторов [23].

Неоднозначное действие актиномицина Д на МАО типов А и Б (табл. 1 и 2) находится в соответствии с данными литературы [16—18] и подчеркивает существование разных геномных механизмов, регулирующих активности этих двух неидентичных типов МАО. Полученные нами факты свидетельствуют также о более быстром и более выраженном изменении

отношения активности MAO типа А к MAO типа Б под влиянием актиномицина Д в стволовой части мозга, где локализованы преимущественно перикарионы моноаминергических MAO-содержащих нейронов по сравнению с полушариями, которые содержат аксоны этих нейронов (табл.3). Приведенные факты служат доказательством в пользу того, что действие L-ДОФА и 5-гидрокситриптофана на MAO мозга крыс осуществляется в перикарионах MAO-содержащих нейронов на геномном уровне.

Действие L-ДОФА в зависимости от дозы может резко различаться. Так, доза 50—60 мкг/кг [4] понижала, а доза 80 мг/кг существенно повышала активность MAO типа А мозга крыс (табл.1). То есть L-ДОФА, продукт гидроксирования фенилаланина, выступает регулятором метаболизма биогенных аминов, нейромедиаторов мозга, и направленность этой регуляции определяет уровень L-ДОФА.

EFFECT OF L-DOPA AND 5-HYDROXYTRYPTOPHAN ON MONOAMINE OXIDASE ACTIVITY IN RAT BRAIN.

Voitenko N.N., Piyansin A.I.

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

The effects of single intraperitoneal (*ip*) and intraventricular (*iv*) administration of L-DOPA and 5-hydroxytryptophan on MAO activity in the brain of Wistar rats were studied. L-DOPA and 5-hydroxytryptophan after either *ip* or *iv* administration activated MAO-A and MAO-B, whereas actionomycin D administered by similar routes abolished the activating effects. Serotonin and dopamine had no effect on the MAO forms after either *ip* or *iv* administration.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балаклеевский А.И., Шевченко Н.В., Корень Н.А., Петренко С.В., Переверзев В.А., Тиссари А., Джесса ДжЛ. — В сб.: Физиология и биохимия медиаторных процессов. Тезисы докл. 5-й Всесоюз. конф., ч.1, с.33, М., 1985.
2. Collins G.G.S., Pryse-Davies J., Sandler M., Southgate J. *Nature*, v.226, p.642—643, 1970.
3. Петренко С.В., Балаклеевский А.И. *Вопр. мед. химии*, т.26, N12, с.264—270, 1980.
4. Хватова Е.М., Доведова Е.Л., Михалева И.И. *Нейрохимия*, т.6, N1, с.57—63, 1987.
5. Третьяк Т.М., Архипова Л.В. *Нейрохимия*, т.4, N2, с.125—130, 1986.
6. McBride W.J., Aprison J.N. *J. Neurochem.*, v.23, p.385—391, 1974.
7. Algeri S., Cerletti S. *Eur. J. Pharmacol.*, v.27, p.191—197, 1974.
8. Trulson M.E., Jacobs B.L. *Neuropharmacol.*, v.15, p.339—344, 1976.
9. Gandhi B.S., Kanungo M.S. *Indian J. Biochem. Biophysics*, v.11, p.102—104, 1974.
10. Карасик Г.И., Корочкин Л.И., Максимовский Л.Ф. *Журн. высш. нервн. деят.—сти*, т.26, вып.5, с.1066—1073, 1976.
11. Gray E.G., Whittaker V.P. *J. Anat.*, v.96, part 1, p.79—87, 1962.
12. Горкин В.Э., Вережкина И.В., Гриднева Л.И., Жердева Л.В., Кляшторин Л.Б., Крищенко

- Р.С., Комиссарова Н.В., Леонтьева Г.А., Романова Л.А., Северин И.С., Фейгина С.М.* — В кн.: *Современные методы в биохимии* (под ред. В.Н.Ореховича), с.155—172, М., Медицина, 1968.
13. *Силакова А.И., Труш Г.П., Являкова А.* *Вопр. мед. химии*, N8, с.538—545, 1962.
 14. *Карасик Г.И., Сукоян М.А. Корочкин Л.И., Белая Д.К. Голубица А.Н., Малецкая Е.И., Максимовский Л.Ф.* *Журн. высш. нервн. деят.-сти*; т.21, вып.1, с.184—189, 1971..
 15. *Goridis C., Neff N.H.* *J. Neurochem.*, v.18, p.1673—1682, 1971.
 16. *Wahlund L.-O., Sääft J., Ross S.B., Wetterberg L.* *Acta phisiol. scand.*, v.120, p.337—341, 1984.
 17. *Isaac L., Schoenbeck R., Backer J., Skolnik Ph., Paul S.M.* *Neurosci. Lett.*, v.66, N3, p.257—262, 1986.
 18. *Камышанская Н.С., Москвитина Т.А., Позднев В.Ф., Горкин В.З.* *Нейрохимия*, т.4, N3, с.340—341, 1985.
 19. *Доведова Е.Л., Попова Н.С., Качалова Л.Н.* *Нейрохимия*, т.4, N2, с.138—147, 1983.
 20. *Бондаренко Т.И., Грищенко Е.С., Кричевская А.А.* *Нейрохимия*, т.7, N1, с.153—154, 1988.
 21. *Bartholini G., Da Prada M., Pletscher A.* *J. Pharm. Pharmacol.*, v.20, p.228—229, 1968.
 22. *Butcher L.L., Engel J., Fuxe K.* *Brain Res.*, v.41, N2, p.387—411, 1972.
 23. *Сэндлер М.* *Журн. Всес. хим. об-ва им.Д.И.Менделеева*, т.2, с.190—196, 1976.

Поступила 17.08.1988

Березин В.А., Белик Я.В. Специфические белки нервной ткани — Киев: *Наук. думка* 1990(III). — 20 л—4р. 30 к.

В монографии обобщены новейшие литературные данные и результаты исследований авторов по идентификации, очистке, физико-химическим свойствам, тканевому и клеточному распределению, субклеточной локализации, функциональной роли различных специфических белков нервной ткани. Рассматриваются основные иммунохимические и физико-химические методы идентификации, очистки, изучения и количественного определения нейроспецифических белков. Особенностью монографии является то, что в ней тщательно анализируется теоретическое и практическое значение нейроспецифических белков в нейробиологии и нейропатологии. Рассматриваются особенности экспрессии нейроспецифических белков при малигнизации клеток мозга и проблемы применения этих белков в качестве маркеров при иммунохимической послеоперационной диагностике опухолей мозга. Подчеркивается перспективность использования моноклональных антител к нейроспецифическим маркерам в диагностике и иммунотерапии опухолей.

УДК 577.152.143

АКТИВНОСТЬ МАО В ОТДЕЛАХ МОЗГА МОНГОЛЬСКИХ ПЕСЧАНОК ПРИ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ И В ПЕРИОД РЕЦИРКУЛЯЦИИ

Горошинская И.А., *Стойнович Т.,
*Мичич Д., *Мршуля Б.Б.

НИИ биологии Ростовского государственного
университета,

*Институт биохимии Белградского
университета, Югославия

Изучены активность, субстратная специфичность и кинетика МАО в митохондриальной и синаптической фракциях коры головного мозга, стриатума и гиппокампа монгольских песчанок при 1-, 5-минутной ишемии и в постшемический период. Наиболее выраженные изменения свойств МАО, проявляющиеся в снижении активности, приобретении способности дезаминировать глюкозамин, увеличении K_m , снижении V и в значительном отклонении формы кинетических кривых от гиперболического характера, обнаружены в митохондриальной фракции всех исследованных отделов мозга при 5-минутной ишемии. В синаптической фракции изменения свойств МАО имеют ту же направленность, но выражены при 5-минутной ишемии в меньшей степени, чем в митохондриях. В постшемический период активность и субстратная специфичность МАО нормализуется уже через 1 ч рециркуляции. Нормализация кинетических параметров наблюдается через 1 ч лишь в коре, в стриатуме—через 4 суток. Сравнение реакции разных отделов мозга указывает на большую чувствительность гиппокампа по сравнению с корой и стриатумом.

* * *

Ишемия головного мозга является основным повреждающим фактором, определяющим развитие функциональных и метаболических нарушений при инсульте, одном из трех важнейших заболеваний в развитых странах мира. Удобной моделью для исследования ишемии и восстановительных процессов после ишемического инсульта служат монгольские песчанки *Meriones unguiculatus*. Эти животные обладают своеобразным строением круга кровообращения, позволяющим вызывать ишемию головного мозга как при двустороннем, так и при одностороннем пережатии общих сонных артерий. Нами использована модель с двусторонней окклюзией общих сонных артерий, вызывающая у всех животных неврологические признаки ишемии, тогда как при односторонней окклюзии ишемического состояния достигается только у 40% животных [1]. Ведущую роль в механизме патогенетических изменений, происходящих при ишемии, играют нарушения обмена медиаторных систем. Для церебральной ишемии характерны значительные изменения уровня серотонина и катехоламинов,

а также активности ферментов деградации моноаминов [2]. Наиболее чувствительными к ишемии оказались мембраносвязанные ферменты [3].

Целью настоящей работы явилось исследование активности, субстратной специфичности и кинетики MAO, фермента митохондриальных мембран, являющегося ключевым звеном обмена моноаминовых медиаторов.

MAO обладает способностью претерпевать обратимые качественные изменения каталитических свойств (трансформацию) при состояниях, сопровождающихся интенсификацией ПОЛ [4]. Ранее нами обнаружено изменение субстратной специфичности MAO при высотной гипоксии [5]. Накопление липидных перекисей в условиях ишемии [6,7] позволяет предположить, что и при гипоксическом состоянии данной этиологии создаются условия для трансформации MAO. Для проверки данного предположения наряду с активностью фермента со специфическим субстратом кинурамином исследовали интенсивность дезаминирования глюкозамина. Глюкозамин в норме не относится к субстратам MAO, но в условиях, способствующих изменению субстратной специфичности, например, при гипероксии, высотной гипоксии и холодовом стрессе [8], начинает дезаминироваться с наибольшей скоростью по сравнению с другими необычными субстратами. Учитывая неодинаковую чувствительность отделов мозга к ишемическому фактору, исследования проводили в коре головного мозга, стриатуме и гиппокампе при 1-, 5-минутной ишемии и в постишемический период через 1 ч и 4 суток после 5-минутной ишемии. Поскольку MAO локализована не только в свободных митохондриях, но и в синапсомных, активность фермента определяли в обеих субклеточных фракциях.

Материалы и методы

В работе использовано 116 половозрелых монгольских песчанок обоего пола массой 50—60 г. Ишемию головного мозга вызывали двусторонним пережатием общих сонных артерий в шейном районе животных [2]. Животных декапитировали сразу после 1- и 5-минутной ишемии и через 1 ч и 4 суток после 5-минутной ишемии. В одном опыте объединяли участки мозга, полученные от 4—5 животных, в каждой группе использовано от 16 до 32 песчанок. Субфракции чистых митохондрий и синапсом получали центрифугированием в градиенте фикола [9,10]. Активность MAO с субстратом кинурамином определяли микрофлуорометрическим методом [11]. Интенсивность дезаминирования глюкозамина исследовали по скорости образования глюкозы, о котором судили по образованию восстановленного NADP в присутствии глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и гексокиназы. Глюкозамин использовали в концентрации 10 мМ. Белок определяли по методу Bradford [12]. На основании величин активности фермента при 6 разных концентрациях кинурамина ($1 \cdot 10^{-4}$, $2 \cdot 10^{-4}$, $3 \cdot 10^{-4}$, $4 \cdot 10^{-4}$, $6 \cdot 10^{-4}$ и $1 \cdot 10^{-3}$ М) строили кривые зависимости начальной скорости (V_0) реакции дезаминирования кинурамина от концентрации

субстрата [S]. K_m и V определяли графически, пользуясь методом двойных обратных величин Лайнуивера-Берка, а также в ряде случаев для сравнения методом Хофсти (график зависимости V_o от V_o/S). Статистическую достоверность различий определяли по t -критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Активность MAO не изменялась в условиях 1-минутной ишемии в митохондриях коры головного мозга и стриатума, только в гиппокампе обнаружена тенденция к снижению. При 5-минутной ишемии активность фермента значительно снижается в митохондриальных фракциях всех исследованных отделов мозга: в коре — на 69%, стриатуме — на 65%, гиппокампе — на 67%. Снижение активности MAO при 5-минутной ишемии сопровождается 2—7-кратным усилением интенсивности дезаминирования глюкозамина. Достоверное увеличение глюкозаминдеаминазной активности в гиппокампе наблюдается уже при 1-минутной ишемии (табл.1).

Таблица 1

Дезаминирование кинурамина и глюкозамина в митохондриях мозга монгольских песчанок в условиях ишемии и при восстановлении кровотока (нм/мг белка/мин)

| Условия опыта | Кора головного мозга | | Стриатум | | Гиппокамп | |
|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------|
| | Кинурамин | Глюкозамин | Кинурамин | Глюкозамин | Кинурамин | Глюкозамин |
| Контроль | 2,61 ± 0,27 | 1,47 ± 0,32 | 2,70 ± 0,25 | 1,12 ± 0,37 | 2,31 ± 0,29 | 0,40 ± 0,21 |
| 1-минутная ишемия | 0,88 ± 0,27 $p > 0,05$ | 1,97 ± 0,33 $p > 0,05$ | 2,62 ± 0,32 $p > 0,05$ | 2,03 ± 0,28 0,17 $p > 0,05$ | 1,70 ± 0,08 0,17 $p > 0,05$ | 1,58 ± 0,36 $p < 0,05$ |
| 5-минутная ишемия | 0,82 ± 0,05 $p < 0,001$ | 2,85 ± 0,38 $p < 0,05$ | 0,94 ± 0,03 $p < 0,001$ | 3,01 ± 0,36 $p < 0,02$ | 0,76 ± 0,04 $p < 0,01$ | 3,01 ± 0,76 $p < 0,01$ |
| 5-минутная ишемия + 1ч | 2,89 ± 0,17 $p > 0,05$ | 1,31 ± 0,14 $p > 0,05$ | 2,11 ± 0,20 $p > 0,05$ | 1,54 ± 0,41 $p > 0,05$ | 2,06 ± 0,13 $p > 0,05$ | 0,81 ± 0,22 $p > 0,05$ |
| 5-минутная ишемия + 4 суток | 3,03 ± 0,20 $p > 0,05$ | 0,17 ± 0,11 $p < 0,05$ | 2,63 ± 0,28 $p > 0,05$ | 0,21 ± 0,12 $p < 0,05$ | 2,21 ± 0,22 $p > 0,05$ | 0,44 ± 0,44 $p > 0,05$ |

Примечание. Здесь и в табл.2 каждая цифра является средней из 4-8 опытов (16-32 животных).

В синапсосомной фракции при 5-минутной ишемии общая активность MAO снижается в меньшей степени, чем в митохондриях: в коре — на 28%, стриатуме — на 41%, гиппокампе — на 38%. В то же время в синапсосомной фракции снижение активности MAO (в коре — на 39%, стриатуме на 23%) наблюдается и при 1-минутной ишемии. Усиление интенсивности дезаминирования глюкозамина имеет место в синапсосомах всех отделов мозга и при 1-минутной, и при 5-минутной ишемии (табл.2).

Исследование активности MAO в постишемический период показало, что в митохондриальной фракции уже через 1 ч после восстановления

кровотока как общая активность MAO, так и дезаминирование глюкозамина нормализуется. В синапсосомной фракции, так же как и в митохондриальной, активность MAO с кинурамином нормализуется уже к первому часу рециркуляции и остается на контрольном уровне и через 4 суток. Способность дезаминировать глюкозамин через 1 ч после восстановления кровотока снижается в синапсосомах по сравнению с 5-минутной ишемией, но остается на сравнительно высоком уровне. На 4-е сутки рециркуляции дезаминирование глюкозамина полностью отсутствует (табл.1,2).

Таблица 2
Дезаминирование кинурамином и глюкозамина в синапсосомах мозга монгольских песчанок в условиях ишемии и при восстановлении кровотока (нм/мг белка/мин)

| Условия опыта | Кора головного мозга | | Стриатум | | Гиппокамп | |
|-----------------------------|----------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|----------------------|
| | Кинурамин | Глюкозамин | Кинурамин | Глюкозамин | Кинурамин | Глюкозамин |
| Контроль | 1,62±0,07 | 0,37±0,23 | 1,64±0,13 | 0,48±0,23 | 1,19±0,06 | 0,35±0,26 |
| 1-минутная ишемия | 0,99±0,19 p<0,05 | 2,16±0,50 p<0,02 | 1,26±0,15 p>0,05 | 1,37±0,27 p<0,05 | 1,02±0,28 p>0,05 | 1,71±0,34 p<0,02 |
| 5-минутная ишемия | 1,16±0,05 p<0,01 | 1,41±0,17 p<0,01 | 0,97±0,08 p<0,01 | 3,57±0,07 p<0,001 | 0,73±0,07 p<0,01 | 4,27±0,66 p<0,001 |
| 5-минутная ишемия + 1ч | 1,69±0,08 p>0,05 | 1,36±0,49 0,1>p>0,05 | 1,40±0,01 p>0,05 | 1,61±0,59 0,1>p>0,05 | 1,14±0,07 p>0,05 | 0,88±0,29 p>0,05 |
| 5-минутная ишемия + 4 суток | 1,38±0,22 p>0,05 | 0,00 | 1,55±0,03 p>0,05 | 0,23±0,22 | 1,04±0,07 p>0,05 | 0,00 |

Таким образом, в условиях ишемии имеет место обратимое изменение субстратной специфичности MAO: снижается активность с кинурамином и резко усиливается интенсивность дезаминирования глюкозамина. Это позволяет заключить, что для ишемии характерны качественные изменения каталитических свойств MAO, подобные обнаруженным ранее при других экстремальных состояниях и обусловленные окислением сульфгидрильных групп фермента липидными перекисями.

Кинурамин является общим субстратом для двух форм фермента: MAO типа А и MAO типа В [13]. Преинкубация с избирательно действующим ингибитором MAO типа А хлоргилином [14] показала, что в условиях ишемии ингибируются обе формы фермента.

При 5-минутной ишемии более выраженное снижение моноаминоксидазной активности обнаружено в митохондриальной фракции по сравнению с синапсосомной. В то же время при более мягком воздействии — 1-минутной ишемии синапсосомная MAO оказалась более чувствительной к действию экстремального фактора. В синапсосомах коры снижение общей активности MAO при 1-минутной ишемии выражено даже больше, чем при 5-минутной. Достоверное усиление глюкозаминдезаминазной активности

имеет место в синапсоммах всех исследованных отделов мозга. В митохондриальной же фракции при 1-минутной ишемии изменяется активность и субстратная специфичность MAO только в гиппокампе. Полученные данные свидетельствуют об определенных различиях в чувствительности к ишемии митохондриальных и синапсомных MAO.

Изучение кинетики реакции дезаминирования кинурамина показало, что во всех трех исследованных отделах мозга интактных животных кривые зависимости V_0 от $[S]$ имеют гиперболический вид. В условиях ишемии форма кинетических кривых меняется: они приобретают более сложный негиперболический характер. В митохондриях коры головного мозга и стриатума существенное отклонение формы кривых от гиперболического вида наблюдается только при 5-минутной ишемии. Наиболее сложную форму приобретают кинетические кривые в гиппокампе. В данном случае значительные отклонения формы кривых от гиперболического характера имеют место как при 5-минутной, так и 1-минутной ишемии (рис.1).

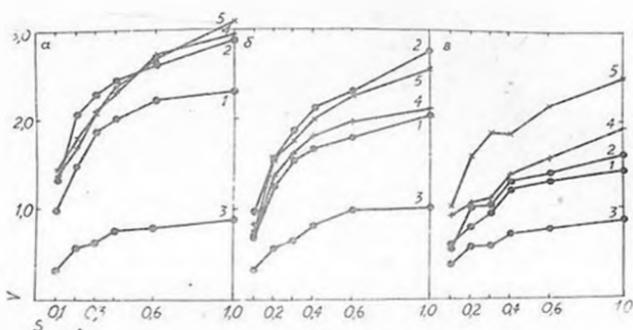


Рис.1. Зависимость скорости дезаминирования кинурамина (V , нмоль/мг белка/мин) MAO митохондрий коры головного мозга (а), стриатума (б) и гиппокампа (в) моногольских песчанок от концентрации субстрата (S , мМ) в норме и при ишемии. 1—контроль, 2—1-минутная ишемия, 3—5-минутная ишемия, 4—через 1 ч после 5-минутной ишемии, 5—через 4 суток после 5-минутной ишемии

Хотя кривые зависимости скорости моноаминоксидазной реакции от концентрации кинурамина лишь в ряде случаев подчиняются уравнению Михаэлиса-Ментен, мы, несмотря на известную некорректность нашего подхода, попытались определить кинетические параметры, представив данные в двойных обратных координатах. Из рис.2 видно, что в условиях 5-минутной ишемии наблюдается значительное увеличение K_m , сопровождающееся снижением V во всех исследованных отделах мозга. При 1-минутной ишемии увеличение K_m наблюдается в митохондриях стриатума

и гиппокампа, но отсутствует в коре. V в условиях 1-минутной ишемии достоверно не изменяется. При 5-минутной ишемии во всех отделах мозга можно выявить как бы две формы фермента, отличающиеся по сродству к субстрату, но имеющие близкие V . В коре K_m одной формы увеличена по сравнению с контролем на 197%, K_m другой формы — на 52%, V снижена на 51 и 62% соответственно. В стриатуме K_m одной формы увеличена на 440%, другой формы — на 170%, V снижена на 26 и 36% соответственно. В гиппокампе K_m одной формы увеличена на 46%, K_m другой формы достоверно не отличается от контроля, V снижена на 45 и 34% соответственно. При 1-минутной ишемии появление двух форм фермента имеет место только в гиппокампе, где K_m одной формы превышает контрольный уровень на 61%, K_m другой формы достоверно не отличается от контроля.

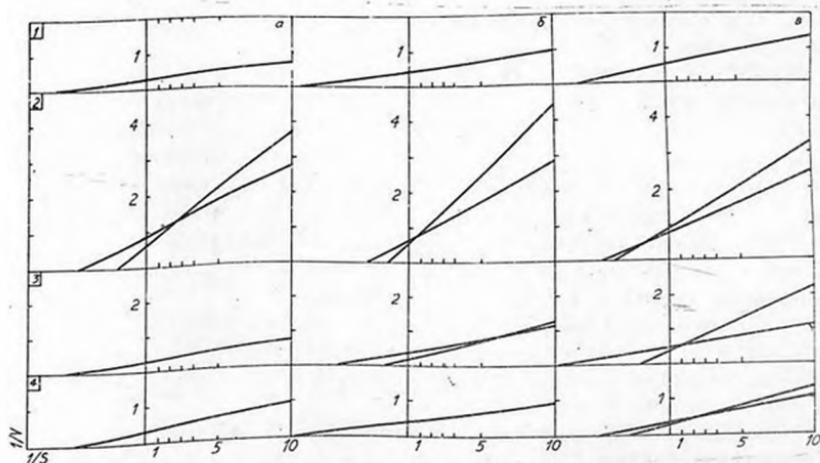


Рис. 2. Зависимость скорости дезаминирования кинурамина от концентрации субстрата в обратных величинах по Лайнуверу-Берку в митохондриях коры головного мозга (а), стриатума (б) и гиппокампа (в) монгольских песчанок в норме и при ишемии. 1 — контроль, 2 — 5-минутная ишемия, 3 — через 1 ч после 5-минутной ишемии, 4 — через 4 суток после 5-минутной ишемии

Особый интерес представлял вопрос, сопровождается ли восстановление активности и субстратной специфичности MAO в постишемический период нормализацией кинетики катализируемой ферментом реакции. Как видно из рис. 1, при восстановлении рециркуляции форма кривых зависимости V_0 от S в митохондриях коры головного мозга и стриатума приближается к гиперболической. Однако кривые не становятся идентичными соответствующим гиперболическим кривым интактных животных, в большей степе-

ни напоминая характер кривых у животных, подвергнутых 1-минутной ишемии. В отличие от коры и стриатума в митохондриях гиппокампа и через 1 ч, и через 4 суток после восстановления рециркуляции кинетические кривые имеют сложный негиперболический характер.

Представление данных в двойных обратных координатах показало, что через 1 ч после восстановления кровотока нормализация кинетических показателей наблюдается лишь в коре головного мозга. В стриатуме и гиппокампе сохраняется существование двух прямых, которым соответствуют разные значения K_m и V . На 4 сутки рециркуляции в стриатуме выявляется лишь одна форма MAO, идентичная по K_m ферменту интактных животных, а в гиппокампе сохраняются как бы две формы фермента. K_m одной формы увеличена на 102%, K_m другой формы не отличается от контроля. При этом в отличие от 5-минутной ишемии, когда V были снижены, на 4 сутки рециркуляции V обеих форм в гиппокампе увеличены на 83 и 57% соответственно. Увеличение на 29% V наблюдается и в коре головного мозга (рис.2).

Сравнение реакции MAO разных отделов мозга на воздействие ишемического фактора указывает на большую чувствительность гиппокампа по сравнению с корой и стриатумом. При 1-минутной ишемии только в этом отделе мозга обнаружено снижение активности митохондриальной MAO, изменение ее субстратной специфичности и появление двух форм фермента, отличающихся по сродству к субстрату. Об этом же свидетельствует и исследование кинетических показателей в период рециркуляции. Из всех исследованных отделов мозга лишь в гиппокампе сохраняются две формы фермента через 4 суток после ишемии.

Полученные нами биохимические данные согласуются с результатами электрофизиологических и гистологических исследований, также свидетельствующих о большей чувствительности к ишемии гиппокампа по сравнению с другими отделами мозга [1].

Сопоставление представленных в нашей работе данных с результатами проведенного нами ранее изучения влияния высотной гипоксии [5] свидетельствует о значительно большем ингибировании активности MAO при ишемии. При этом в условиях ишемии наблюдается как ингибирование MAO типа А, так и ингибирование MAO типа Б, тогда как при гипоксической гипоксии снижается только активность MAO типа А. При ишемии выявлены также существенные изменения ультраструктуры синапсов, проявляющиеся прежде всего в уменьшении числа синаптических пузырьков, набухании митохондрий, уменьшении числа крист [15]. Снижение активности MAO, показанное нами в условиях ишемии в синаптической фракции мозга, согласуется с повреждением структуры митохондрий синапсов. Одной из причин нарушения мембранных структур, в том числе ультраструктуры нейронов, происходящего в процессе ишемии [16], по-видимому, является появление способности MAO дезаминировать структурный компо-

нент мембран глюкозамин. Ишемическая форма гипоксии представляется более тяжелой патологией, чем гипоксическая гипоксия, поскольку наряду с дефицитом кислорода организм испытывает недостаточное снабжение рядом других компонентов, поступающих с кровотоком.

MONOAMINE OXIDASE ACTIVITY IN VARIOUS BRAIN REGIONS OF *MONGOLIAN GERBILS* UNDER CEREBRAL ISCHEMIA AND DURING REPERFUSION

Goroshinskaya I.A., Stojanovic T.,

*Mičić D., *Mršulja B.B.

*Institute of Biology, Rostov University, Rostov-on-Don,
Institute of Biochemistry, Belgrade University, Yugoslavia

The activity, substrate specificity and kinetics of MAO were studied in mitochondrial and synaptosomal fractions of *Mongolian gerbils* cerebral cortex, striatum and hippocampus after 1 or 5 minutes of ischemia and during the postischemic period. The most pronounced changes of MAO involved a decrease in its activity, appearance of the ability to deaminate glucosamine, increase in K_m , decrease in the reaction rate and deviation of the kinetic curves from the hyperbolic type; these effects were observed in the mitochondrial fraction of studied all brain structures after 5 minutes of ischemia. In the synaptosomal fraction changes of MAO properties followed the same pattern, but were less pronounced as compared with mitochondria after 5 minutes of ischemia. During the postischemic period MAO activity and substrate specificity returned to the norm already one hour after reestablishment of circulation. Kinetics of the cerebral cortex enzyme normalized after 1 hour, but kinetics of the striatum enzyme normalized only after 4 days. Comparison of the enzyme activity response from various brain regions showed greater vulnerability of hippocampus as compared with cerebral cortex and striatum.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lust W.D., Arai H., Yasumoto Y., Whittingham T.S., Djuričić B., Mršulja B.B., Passonneau J.V.—In: Cerebral energy metabolism and metabolic encephalopathy (ed.D.W.McCandless), p.79—117, Plenum Publishing Corporation, 1985.
2. Cvejić V., Mičić D.V., Djuričić B.M., Mršulja B.J., Mršulja B.B. Acta Neuropathologica, v.51, p.71—77, 1980.
3. Mičić D.V., Abe K., Rausch W.D., Abe T., Spatz M. Circulatory and developmental aspects of brain metabolism (ed.M.Sratz, B.B.Mršulja, L.Rakić, W.D.Lust), p.81—95, Plenum Publishing Corporation, 1980.
4. Горкин В.З. Молекуляр.биология, т.10, с.717—736, 1976.
5. Горошинская И.А., Броновицкая З.Г., Кричевская А.А., Кабарухина Е.Г. Нейрохимия, т.1, с.282—286, 1982.

6. Селиченко В.В., Полуэктов Л.В., Конвай В.Д. Бюл.эксперим.биол.и мед. т.96, N7, с.12-14, 1983.
7. Itaiizumi S., Kayata T., Suzuki J. *Stroke*, v.15, p.1061—1065, 1984.
8. Горошинская И.А. Бюл.эксперим.биол.и мед., т.99, с.672—674, 1985.
9. Guard J.W., Jones L.R., Mahler H.R., Moore W.J. *J.Neurochem.*, v.22, p.281—290, 1974.
10. Morgan I.G., Wolfe L.S., Mandel P., Gombos G. *Biochim.et biophys.acta*, v.241, p.737—751, 1971.
11. Krajl M. *Biochem.Pharmacol.*, v.14, p.1683—1685, 1965.
12. Bradford M. *Anal.Biochem.* v.72, p.248—251, 1976.
13. Hall T.R., Figueroa H.R. *Pharmacol.Res.Commun.*, v.14, p.431—441, 1982.
14. Yang H.Y.T., Neff N.H. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, v.189, N3, p.733—740, 1974.
15. Боголепов Н.Н. Ультраструктура мозга при гипоксии, М., Медицина, 1979.
16. Petitto C.K., Pulsinelli W.A. *J.Neuropathology and experimental neurology*, v.43, p.141—153, 1984.

Поступила 21.09.1988

G. Naether. Amino Acid Availability and Brain Function in Health and Disease (NATO ASI Servies, v.H20), Springer, Berlin, 490p., 1988.
Усвояемость аминокислот и функция мозга у здоровых и больных.

Анализ существующей информации и новейших достижений в области усвояемости аминокислот и физиологии мозга представлен в трудах более чем 40 ведущих специалистов. Семь взаимосвязанных глав охватывают следующие проблемы: периферический контроль поступления аминокислот в мозг; захват, компарментализация и утилизация аминокислот в мозгу; влияние изменения уровня поступающих аминокислот-предшественников на обмен транзиттеров на функциональную нейротрансмиссию, на физиологию и поведение; влияния изменения в поступлении аминокислот на нейрологические и психиатрические заболевания; роль усвояемости аминокислот в ходе эмбриогенеза в развитии мозга.

Книга представляет интерес для специалистов по нейронаукам.

УДК 615.214.22.015.4.07

ГАРМАН МОДУЛИРУЕТ ФУНКЦИЮ МЕЛАТОНИН-ОПИОИДНОЙ СИСТЕМЫ МОЗГА, УЧАСТВУЮЩЕЙ В МЕХАНИЗМЕ РАЗВИТИЯ ТРАВМАТИЧЕСКОГО ШОКА

Самсоненко Р.А., Долженко А.Т. Ельский В.Н.,
Титиевский А.В.

*Центральная научно-исследовательская
лаборатория медицинского института, Донецк*

В опытах на интактных белых крысах линии *Wistar* и крысах в условиях травматического шока установлено, что β -карболины (гарман и 3,4-тетраметиленгарман; С-383) в дозах 10 и 30 мг/кг соответственно модулируют процесс высвобождения опиоидных пептидов (Leu-энкефалина и β -эндорфина) в плазму крови. Повышая содержание опиоидных пептидов в плазме крови интактных животных, β -карболины способствуют значительному снижению опиоидов в условиях травматического шока. Вместе с тем, гарманы повышают содержание мелатонина в ткани эпифиза интактных и подвергнутых травматическому воздействию крыс. Обсуждается участие циклических нуклеотидов (сАМР и сGMP) в способности β -карболинов модулировать функцию мелатонин-опиоидной системы мозга крыс.

* * *

Этиловый эфир β -карболин-3-карбоновой кислоты [1], гарман [2], норгарман [3] и некоторые другие β -карболины [4] конкурентно ингибируют специфическое связывание радиоактивных бензодиазепинов с мембранными препаратами или гомогенатами мозга. Поскольку β -карболин-3-карбоновая кислота и гарман являются естественными метаболитами в организме человека и животных, они рассматриваются в качестве возможных эндогенных лигандов бензодиазепиновых рецепторов. Ранее сообщалось [5,6], что некоторые производные β -карболина проявляют свойства потенциальных транквилизаторов, а гарман (10^{-7} — 10^{-5} М), подобно хлордиазепоксиду (10^{-6} — 10^{-3} М), потенцирует влияние ГАМК на нейроны спинного мозга и усиливает пресинаптическое торможение первичных афферентов [7], повышает импульсное высвобождение ГАМК при электростимуляции срезов мозга крыс [8].

Стресс-протективную активность обнаруживает и мелатонин, основной гормон эпифиза, участвующий в функционировании синапсов [9] и поддерживающий нейроэндокринный гомеостаз, имеющий существенное значение в развитии тяжелого стресса и травматического шока. Антистрессорный эффект мелатонина, по-видимому, реализуется с участием опиоид-

ной и ГАМК-ергической систем мозга, поскольку налтрексон, функциональный антагонист опиоидов, предупреждает стресс-протективное действие мелатонина [10], а сам мелатонин в радиолигандных экспериментах повышает сродство ГАМК и диазепамы к местам специфического связывания [11].

В настоящей работе показано модулирующее влияние β -карболинов— гармана и 3,4-тетраметилгармана (соединение С-383) на функцию мелатонин-опиоидной системы животных в условиях травматического шока.

Материалы и методы

Опыты выполнены на крысах-самцах линии *Wistar* массой 200 ± 20 г, находящихся на обычном вскармливании и питьевом режиме. У интактных животных и крыс, подвергнутых травматическому воздействию, в гомогенатах эпифиза определяли содержание мелатонина, в гомогенатах гипоталамической области мозга и надпочечников — содержание сАМР и сGMP, а в плазме крови—содержание опиоидных пептидов (Leu-энкефалина β -эндорфина). Исследования выполнены методом радиоиммунного анализа с использованием радиоиммунных наборов фирмы INCSTAR Corp., США (Leu-энкефалин и β -эндорфин, мелатонин) и Института радиоизотопов, ЧССР (сАМР, сGMP). Травматический шок моделировали компрессией мягких тканей задних конечностей в течение 6 ч, сила компрессии составляла 4 кг/см^2 , декомпрессионный период длился 30 мин. Животных декапитировали после 30-минутного декомпрессионного периода. Гарман («Sigma», США) и 3,4-тетраметилгарман (С-383; синтезирован в Институте физико-органической химии и углехимии АН УССР, Донецк [12]) вводили внутривентриально в дозах 10 и 30 мг/кг соответственно за 10 мин до снятия компрессии. Интактным животным вводили внутривентриально изотонический раствор хлорида натрия в таком же объеме. Обработку полученных данных проводили методами непараметрической статистики.

Результаты и обсуждение

Установлено, что в эректильной фазе развития шоковой реакции через 30 мин декомпрессии содержание в плазме крови Leu-энкефалин и β -эндорфина незначительно повышалось по сравнению с содержанием пептидов в плазме крови интактных животных (табл.1). Через 24 ч декомпрессии уровень Leu-энкефалина и β -эндорфина практически соответствовал содержанию опиоидных пептидов в плазме крови интактных крыс. Гарман и 3,4-тетраметилгарман (С-383), введенные интактным животным, приводили к усилению высвобождения в кровь Leu-энкефалина и отчасти β -эндорфина. Эффективность соединения С-383 как либератора опиоидных пептидов превышала активность гармана. Вместе с тем, β -карболины, введенные за 10 мин до снятия компрессии, способствовали значи-

тельному понижению содержания опиоидных пептидов в плазме крови крыс, подвергнутых травматическому воздействию (табл.1). Способность β -карболинов повышать содержание Leu-энкефалина и β -эндорфина в плазме крови интактных животных и существенно понижать содержание опиоидов в условиях травматического шока свидетельствует о модулирующем влиянии гарманов на опиоидную систему. Модуляция функции опиоидной системы β -карболинами определяется высоким сродством гарманов к опиатным рецепторам, выявленным в радиолигандных экспериментах с мембранными фрагментами нейронов мозга крыс. Ингибирующие на 50% связывание [^3H]морфина с опиатными рецепторами концентрации гармана (IC_{50}) были в 4 раза меньше, чем IC_{50} , угнетающие связывание радиолигандов с дофаминовыми и серотониновыми рецепторами [13].

Таблица 1

Влияние гармана и 3,4-тетраметилгармана (С-383) на содержание опиоидных пептидов в плазме крови интактных и подвергнутых травматическому воздействию крыс ($M \pm m$)

| Серия экспериментов | Число опытов | Содержание в плазме крови (нг/мл) | |
|-----------------------------------|--------------|-----------------------------------|--------------------|
| | | Leu-энкефалина | β -эндорфина |
| Интактные + изотонический раствор | 10 | 622,32 \pm 29,99 | 77,45 \pm 5,09 |
| Интактные + гарман | 7 | 926,46 \pm 32,61 | 81,24 \pm 3,96 |
| Интактные + С-383 | 7 | 1159,92 \pm 198,04* | 83,14 \pm 4,32* |
| Шок | 10 | 752,72 \pm 36,27* | 84,02 \pm 3,87* |
| Шок + гарман | 7 | 506,28 \pm 42,12** | 60,75 \pm 4,18** |
| Шок + С-383 | 7 | 473,79 \pm 68,06** | 53,64 \pm 4,73** |

Примечание. *Статистически значимые различия с контролем при $p < 0,05$; **различия статистически достоверны в сравнении с шоком ($p < 0,01$).

Однонаправленное действие гарманы оказывают как на содержание опиоидных пептидов в плазме крови интактных крыс, так и на содержание мелатонина, определяемого в ткани эпифиза. Однако эта тенденция в действии β -карболинов не проявляется в условиях травматического шока. В табл.2 представлены данные, отражающие влияние гармана и его производного С-383 на содержание мелатонина в эпифизе интактных крыс и у животных в состоянии шока. Уровень мелатонина в ткани эпифиза интактных животных составлял 1700 и 2978,6 пг/мг ткани и повышался до 2300 и 3318,1 пг/мг ткани при шоковом воздействии.

Внутрибрюшинное введение гармана (10 мг/кг) или С-383 в дозе 30 мг/кг интактному животному приводило к значительному (в 2—9 раз) повышению содержания мелатонина в ткани эпифиза. Некоторую способность повышать содержание мелатонина гарман и 3,4-тетраметилгарман сохраняют в условиях развившейся шоковой реакции. Изменение содержания мелатонина, опосредуемое воздействием гарманов, коррелирует со способностью этих веществ понижать количество опиоидных пептидов в плазме крови животных, находящихся в состоянии травматического шока. На функциональную связь между активностью опиоидной системы и

функционированием эпифиза указывает также способность налтрексона, антагониста опиоидных рецепторов, предупреждать эффекты мелатонина [10]. Модулирующее мелатонин-опиоидную систему влияние β -карболинов определяется, по-видимому, свойствами последних как агонистов опиоидных рецепторов [3] и общим с мелатонином нейрехимическим путем синтеза гарманов в ЦНС [14].

Таблица 2
Влияние гармана и соединения С-383 на содержание мелатонина в эпифизе (пг/мг ткани) интактных и подвергнутых шоковому воздействию крыс ($M \pm m$)

| Серии экспериментов | Число опытов | Гарман | Число опытов | С-383 |
|-----------------------------------|--------------|--------------------|--------------|----------------------|
| Интактные + изотонический раствор | 9 | 1700 \pm 52,0 | 7 | 2978,6 \pm 284,1 |
| Интактные + препарат | 10 | 15200 \pm 55,0* | 12 | 3933,0 \pm 440,2* |
| Шок | 7 | 2300 \pm 430,4* | 8 | 3318,1 \pm 220,8* |
| Шок + препарат | 10 | 4700 \pm 276,3** | 9 | 3395,3 \pm 192,4** |

Примечание. *Различия статистически достоверны с контролем ($p < 0,05$); **различия статистически значимы в сравнении с шоком ($p < 0,01$).

Известно, что универсальный механизм регуляции высвобождения медиаторов, нейромодуляторов и других биологически активных веществ осуществляется при участии циклических нуклеотидов [15]. В табл.3 представлены данные специальной серии опытов, характеризующие влияние 3,4-тетраметилгармана (С-383) на содержание циклических нуклеотидов (сАМР, сGMP) в гомогенатах надпочечников и гипоталамуса интактных и подвергнутых тяжелому стрессовому воздействию крыс. Результаты исследований показали, что травматическое воздействие не влияло на содержание сАМР и сGMP в гипоталамусе по сравнению с контролем, но снижало его в надпочечниках. Предварительное введение животным С-383 (30 мг/кг) способствовало повышению уровня сАМР в гипоталамусе и надпочечниках, одновременно повышая содержание сGMP в гомогенатах гипоталамуса и понижая его в надпочечниках. Еще более выраженные изменения уровня сАМР проявлялись у животных, которым 3,4-тетраметилгарман вводили за 10 мин до снятия компрессии.

Таким образом, изменение уровня опиоидных пептидов в плазме крови и мелатонина в ткани эпифиза, обусловленное гарманом, сопровождается изменением содержания циклических нуклеотидов, что подтверждает ранее полученные данные [3].

Таблица 3

Влияние 3,4-тетраметилгармана (С-383) на содержание циклических нуклеотидов в гомогенатах гипоталамуса и надпочечников интактных и подвергнутых травматическому воздействию крыс ($M \pm m$)

| Серия экспериментов | Число опытов | Содержание сАМР (пм/г) | | Содержание сГМР (пм/г) | |
|-----------------------------------|--------------|------------------------|----------------|------------------------|---------------|
| | | гипоталамус | надпочечники | гипоталамус | надпочечники |
| Интактные + изотонический раствор | 7 | 155,14 ± 25,84 | 50,97 ± 7,36 | 0,657 ± 0,130 | 0,12 ± 0,18 |
| Интактные + С-383 | 10 | 182,10 ± 4,60* | 65,84 ± 5,20* | 0,864 ± 0,150* | 0,69 ± 0,20* |
| Шок | 7 | 152,83 ± 28,74 | 31,70 ± 4,37 | 0,695 ± 0,120 | 0,57 ± 0,09 |
| Шок + С-383 | 7 | 247,50 ± 2,50** | 77,08 ± 6,18** | 1,540 ± 0,330** | 0,31 ± 0,06** |

Примечание. *Статистически значимые различия с контролем при $p=0,05$; **различия статистически достоверны в сравнении с шоком ($p<0,001$).

Сопоставление полученных в этой работе материалов с имеющимися данными приводит к заключению, что при развитии экспериментального травматического шока происходит изменение функционального состояния мелатонин-опиоидной системы, функция которой модулируется гарманом, предполагаемым эндогенным лигандом бензодиазепиновых рецепторов.

HARMANE MODULATES THE FUNCTION OF MELATONIN-OPIOID BRAIN SYSTEM WHICH PARTICIPATES IN TRAUMATIC SHOCK DEVELOPMENT

Samsonenko R.A., Dolzhenco A.T., Yelsky V.N.,
Titievsky A.V.

Medical Institute, Donetsk

Experiments with albino Wistar rats under normal conditions and after traumatic shock have demonstrated that beta-carbolines (harmane, 3,4-tetramethylenharmane and С-383) at doses of 10 and 30 mg/kg modulate the secretion of opioid peptides (leu-enkephalin and beta-endorphin) to blood plasma. In intact animals beta-carbolines increase the opioids peptide level in blood plasma, whereas they greatly reduce the opioid level after traumatic shock. Concomitantly harmanes increase the level of melatonin in the pineal tissue of intact and shocked rats. Participation of cyclic nucleotides (сАМР and сГМР) in the modulating effect of beta-carbolines on the melatonin- opioid system of rat brain is discussed.

ЛИТЕРАТУРА

1. Braestrup C., Nielson M., Olson S.-E. Proc.Nat.Acad.Sci.USA, Biol.Sci., v.77, p.2288—2292, 1980.
2. Rommelpacher H., Nanz C., Borbe H. Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmak., Bd.314.

S.97—100, 1980.

3. Airaksinen M.M., Mikkonen E. Med. Biol., v.58, p.341—344, 1980.
4. Rommelspacher H., Straus S., Lindemann J. FEBS Lett., v.109, p.209—212, 1980.
5. Долженко А.Т., Комиссаров И.В. Тезисы докл. всесоюз. конф. «Химия, биохимия и фармакология индола», с.163, Тбилиси, 1981.
6. Долженко А.Т., Дуленко В.И., Зиньковская Л.Я., Комиссаров И.В. Хим.-фармацевт. журн., N 12, с.66—68, 1982.
7. Комиссаров И.В., Абрамян И.И. Бюл.эксперим.биол. и мед., N 10, с.61—63, 1983.
8. Долженко А.Т., Комиссаров И.В. Бюл.эксперим.биол. и мед., N 10, с.446—448, 1984.
9. Арушанян Э.Б., Ованесов К.Б. Фармакология и токсикология, N 2, с.38—42, 1988.
10. Maestroni G.J.M., Pierpaoli W. Neuroendocrinol.Lett., v.9, p.285, 1987.
11. Niels L.P., Pickering D.S., Arciszewski M.A.J. Neural. Transmiss., v.70, p.117—124, 1987.
12. Комиссаров И.В., Дуленко В.И., Долженко А.Т., Зиньковская Л.Я., Николюкин Ю.А., Нижарадзе М.Э., Образцова О.Г., Кибальный А.В. Хим.-фармацевт.журн., N3, с.172—176, 1985.
13. Borbe H.O., Wollert U., Muller W.E., Fehske K.J., Nanz C., Rommelspacher H. Pharm. Biochem. and Behav., v.14, p.693—699, 1981.
14. Meizler D.E. Biochemistry. The chemical reaction of living cells. New York, San Francisco, London, Academic Press, 1977.
15. Глебов Р.Н., Крыжановский Г.Н. Функциональная биохимия синапсов, М., Медицина, 1978.

Поступила 26. 02. 1988

УДК 577.175.852

СООТНОШЕНИЕ ЭНКЕФАЛИНОВОГО И АНГИОТЕНЗИНОВОГО ПЕПТИДНЫХ ЗВЕНЬЕВ В РЕГУЛЯЦИИ АГРЕССИВНОГО ПОВЕДЕНИЯ КРЫС

Гомазков О.А., Ростовцев А.П.,
Панфилов А.Д.

НИИ медицинской энзимологии АМН СССР,
Москва

Исследовано участие энкефалиновой системы в реализации агрессивного (мурицидного) поведения крыс в сравнении с эффектами ангиотензина II. Активность энкефалинообразующей карбоксипептидазы, определяемая в зонах мозга, гипофизе и надпочечниках нормальных и мурицидных крыс с помощью дансил-Phe-Ala-Arg, была увеличена в стриатуме мурицидных крыс и составляла 0,83 нмоль дансил-Phe-Ala/мин · мг белка против 0,62 нмоль дансил-Phe-Ala/мин · мг белка у нормальных крыс. Мурицидная реакция тормозилась антителами к Leu-энкефалину, введенных в боковой желудочек мозга. Одновременное интрацеребральное введение антител к Leu-энкефалину и внутрибрюшинное введение ангиотензина II приводило к меньшему ингибированию мурицидности по сравнению с эффектами веществ, вводимых по отдельности. Можно предположить существование некоего третьего звена, участвующего в регуляции мурицидности, при этом ангиотензиновая и энкефалиновая пептидергические системы выступают в качестве функциональных антиподов, модулирующих действенность этого третьего звена.

* * *

Принято считать, что иерархически выстроенное соотношение определенных систем является одним из ведущих механизмов регуляции функциональных систем организма [1]. Этим обстоятельством в значительной мере может быть объяснен феномен «полифункциональности», когда одни и те же пептиды участвуют в регуляции казалось бы не сопряженных физиологических реакций организма. Для ангиотензина II, например, обнаружено участие в регуляции гемодинамики, питьевой мотивации, содержания Na^+ , наконец, как было установлено совсем недавно, в регуляции мурицидности — особой формы агрессивного поведения крыс [2—4].

На модели мурицидности может быть рассмотрена еще одна особенность регуляторной функции нейропептидов — сопряженность с системами других пептидов или с «классическими» медиаторами. Предыдущими исследованиями установлена причастность ангиотензина II к регуляции мурицидного поведения. Об этом свидетельствовали: а) пониженная активность ангиотензинпревращающего фермента в ряде отделов мозга у мурицидных животных; б) торможение мурицидного поведения крыс при

интрацеребральном или внутривнутрибрюшинном введении ангиотензина II; в) восстановление мурицидности при введении крысам антисыворотки к этому пептиду [4].

Несмотря на отсутствие информации о непосредственных биохимических звеньях ангиотензиновой и энкефалиновой пептидных систем, множество фактов указывает на их участие в регуляции одних и тех же физиологических актов. Это относится к реализации сердечно-сосудистых ответов, регуляции пищевой и алкогольной мотиваций, стрессобусловленных реакций организма и др. [5]. В данной работе анализируется участие энкефалиновой системы в реализации мурицидного поведения крыс в сравнении с эффектами ангиотензина II.

Материалы и методы

Работа выполнена на крысах-самцах массой 180—200 г. Крыс помещали в индивидуальные клетки и содержали на стандартной виварийной диете *ad libitum*. Из общей группы животных при регулярном тестировании производили отбор агрессивных крыс: животное признавалось мурицидным, если в течение 3 мин оно атаковало подсаженную белую мышь, убивая ее укусами в переднюю часть тела. Тестирование и отбор крыс производили в течение 4—5 недель до получения стабильных показателей мурицидности для каждого животного. Критериями агрессивного поведения считали факт мурицидности и латентный период до атаки на мышь с момента ее подсадки.

На мурицидных и контрольных крысах были осуществлены четыре серии экспериментов. В первой серии определяли активность энкефалинообразующей карбоксипептидазы (ЭОК; КФ 3.4.17.10) в гипофизе, ряде зон мозга и надпочечниках. Выделение зон мозга проводили по методу Glovinsky, Iversen [6]. Ферментативную активность определяли в тканевых гомогенатах с использованием флуорогенного субстрата дансил-Phe-Ala-Arg по методу Fricker, Snider [7] в модификации Ростовцева и соавт. [8].

Во второй серии исследовали влияние специфичных антител к Leu-энкефалину на мурицидное поведение крыс. Фракцию IgG получали аффинной хроматографией на колонке с Protein A-сефарозой из сыворотки крови кролика, иммунизированного конъюгатом Leu-энкефалин-бензохинон-БСА. Антисыворотку и IgG тестировали методом иммуноферментного анализа. Специфичные IgG и IgG, выделенные из нормальной сыворотки крови кролика, вводили в область боковых желудочков мозга с помощью микрошприца (5 мкг белка в 10 мкл физиологического раствора).

В третьей серии исследовали эффект одновременного введения антител к Leu-энкефалину и ангиотензина II. Ангиотензин II вводили внутривнутрибрюшинно в дозе, определенной ранее [4].

Четвертая серия была проведена на крысах, утративших мурицидность или с ослабленной мурицидной реакцией. Животным интрацеребраль-

но вводили [D-Ala²,Leu⁵] энкефалин с целью выявления возможной «триггерной» роли пептида в регуляции агрессивного поведения крыс [3].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия Стьюдента и t-критерия Уилкоксона. Для оценки латентного периода до атаки, значительно варьиовавшего по величине у животных с разной степенью агрессивности, использовали критерий знаков.

В работе использованы: ангиотензин II амид (Экспериментальный завод Института органического синтеза АН ЛатвССР), дансил-Phe-Ala-Arg, синтезированный проф. В.Н.Незавибатько (Институт молекулярной генетики АН СССР), [D-Ala²,Leu⁵] энкефалин, любезно предоставленный проф. М.И.Титовым (ВКНЦ АМН СССР), Protein А-сефароза («Pharmacia», Швеция); остальные реактивы отечественного производства категории х.ч. Все растворы приготавливали на деионизованной воде (Milli Q, Millipore).

Результаты исследований

Из данных, представленных на рис.1, видно, что в различных тканях и областях мозга величина У.А. ЭОК не одинакова—максимальная активность характерна для гипофиза, минимальная—для надпочечников. Среди исследованных зон мозга наибольшая активность ЭОК отмечена в полосатом теле—0,62 нмоль дансил-Phe-Ala/мин· мг белка. Именно в этой области мозга было обнаружено значительное и достоверное различие между величинами У.А. ЭОК у нормальных и агрессивных крыс: у последних эта величина составляла 0,83 нмоль дансил-Phe-Ala/мин· мг белка (+34%). Можно полагать, что у мурицидных крыс в стриатуме увеличено образование энкефалина. Из этого следует, что изменение концентрации пептида за счет экзогенного введения или связывания антителами может явиться фактором, модулирующим проявление мурицидности.

При интрацеребральном введении мурицидности крысам специфичных антител, полученных из анти-Leu-энкефалиновой антисыворотки, удалось затормозить проявление агрессивной реакции, что выражалось в «отказе» части животных от мурицидности и в увеличении латентного периода до атаки на жертву у остальных крыс (таблица). При интрацеребральном введении таким же мурицидным крысам физиологического раствора или IgG, выделенных из нормальной сыворотки крови, достоверных изменений латентного периода не было обнаружено. Это указывает на специфичность тормозящего мурицидность влияния анти-Leu-энкефалиновых антител.

Поскольку в предыдущей работе [4] было продемонстрировано тормозящее мурицидность влияние ангиотензина II, проявлявшееся как при центральном, так и при внутрибрюшинном введении пептида, в третьей серии данного исследования изучали эффект сочетанного введения ангио-

тензина II и антител к Leu-энкефалину. При такой постановке экспе-

Таблица

Торможение активной реакции крыс под влиянием антител к Leu энкефалину

| Группы животных | Время после введения | | | | |
|--------------------------------------|----------------------|------------|------------|------------|---------|
| | 2 | 4 | 6 | 24 | 48 |
| Физиологический раствор (n=14) | 0/6,7 | 0/8,0 | 6,6/3,3 | 0/2,0 | 0/2,0 |
| Нормальные IgG (n=16) | 25,0/25,5* | 25,0/24,1 | 0/4,0 | 6,3/4,7 | 0/2,7 |
| Анти-Leu-энкефалиновые IgG (n=16) | 43,8/58,3* | 68,8/92,5* | 50,0/61,0* | 37,5/45,6* | 6,3/3,3 |

Примечание. В таблице представлены: % животных, утерявших мурицидность (изменение латентного периода до атаки на мышь). Все вещества вводили интрацеребрально в 10 мкл физиологического раствора на животное. Конечная концентрация IgG составляла 0,5 мг белка/мл. Связывание Leu-энкефалина составляло $\approx 10^{-7}$ моль/мг белка. Исходная величина латентного периода составляла 1—2 с; * $p < 0,05$ по отношению к контролю.

римента ставилась задача определения возможной сопряженности механизмов тормозящего действия двух различных пептидных систем. При этом можно было бы ожидать большего торможения мурицидной реакции (аддитивный эффект) или, наоборот, ее меньшего торможения в случае конкурентных взаимоотношений механизмов, реализующих проявление мурицидности. На рис.2 представлены результаты основного опыта (ангиотензин II внутрибрюшинно + антитела к Leu-энкефалину интрацеребрально) и соответствующих контролей: ангиотензин II (внутрибрюшинно) или IgG, выделенные из антисыворотки или нормальной сыворотки (интрацеребрально), в сочетании с внутрибрюшинным введением физиологического раствора.

Опыт подтвердил закономерность тормозящего действия отдельно вводимых ангиотензина II и антител к Leu-энкефалину, а также показал

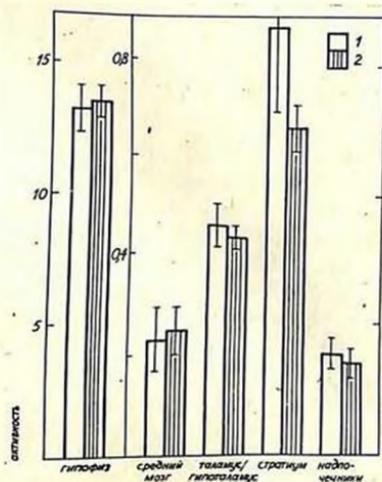


Рис.1. Активность энкефалинообразующей карбоксипептидазы (в нмоль дансил-Phe-Ala/мин/мг белка) в зонах мозга, гипоталамусе и надпочечниках агрессивных (1) и неагрессивных (2) крыс, * $p < 0,05$

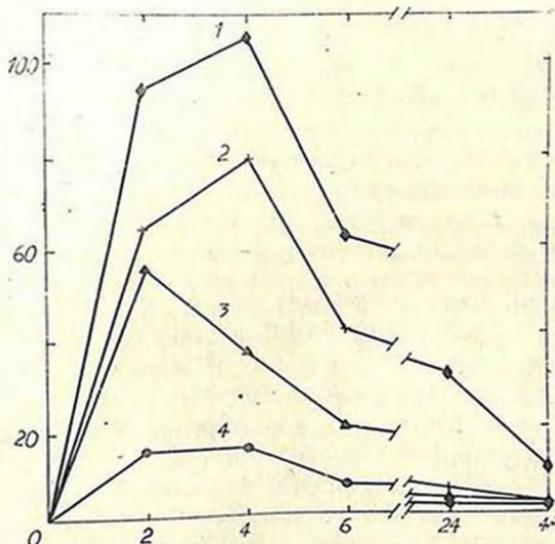


Рис. 2 Торможение агрессивной реакции у мурицидных крыс под действием ангиотензина II и антител к Leu-энкефалину: 1 — ангиотензин II (i.p.), 15 мкг/кг веса в 0,5 мл физиологического раствора (n=7); 2 — IgG, выделенные из антисыворотки к Leu-энкефалину (i.s.v.), 5 мкг белка/животное в 10 мкл физиологического раствора (n=6); 3 — одновременное введение ангиотензина II (i.p.) и специфических IgG (i.s.v.), n=7; 4 — одновременное введение IgG, выделенных из нормальной сыворотки кролика (i.s.v.) и физиологического раствора (i.p.), n=7. По оси абсцисс — время после введения препаратов (ч), по ост ординат — величина латентного периода до атаки на мышь (с)

приводило к восстановлению или усилению мурицидности.

Обсуждение результатов

Описанные серии опытов свидетельствуют о причастности энкефалинергической системы мозга к регуляции агрессивного (мурицидного) поведения крыс. Такой вывод складывается из следующих фактов: повышенной энкефалинообразующей активности в стриатуме; способности интрацеребрально введенных антител к Leu-энкефалину тормозить проявление агрессивной реакции.

Следует отметить, что проявление мурицидности связано не только

снижение ингибирующего мурицидность действия вводимых одновременно ангиотензина II и специфических антител. Ослабление эффекта заметно как по общей продолжительности проявления мурицидной реакции, так и по величинам латентного периода в момент максимального тормозного действия (через 4ч после введения веществ).

С целью продолжить сопоставление энкефалин- и ангиотензинзависимых механизмов мурицидности в особой серии экспериментов было проведено исследование на крысах, утративших мурицидность или с ослабленной агрессивной реакцией. Ранее был обнаружен феномен восстановления мурицидности при введении крысам антисыворотки к ангиотензину II [4]. В настоящей работе интрацеребральное введение [D-Ala²,Leu⁵] энкефалина в дозе 10 мкг/кг не

с пониженным уровнем ангиотензина II в гипоталамусе и среднем мозгу, но и с повышенной выработкой энкефалинов в стриатуме. Увеличение содержания ангиотензина II при экзогенном введении пептида или снижение концентрации Leu-энкефалина при введении соответствующих антител однозначно приводило к угнетению агрессивной реакции мурицидных крыс. Таким образом, можно указать на наличие двух противоположно функционирующих пептидных звеньев, определяющих статус мурицидности: стимулирующего, поддерживающего агрессивность, энкефалинового звена и тормозящего ее—ангиотензинового. Для выявления характера соотношения этих звеньев важным явился эксперимент с одновременным введением мурицидным животным ангиотензина II и антител к Leu-энкефалину. Каждое вещество вводили в дозе, заведомо тормозившей агрессивную реакцию. Как показали эксперименты, отсутствие аддитивности эффекта этих веществ и, наоборот, ослабление тормозящего мурицидность действия каждого из них свидетельствует, на наш взгляд, о конкурентной сопряженности ангиотензиновой и энкефалиновой систем. Тормозящий мурицидность эффект ангиотензина II уменьшен в несколько раз на фоне пониженного под действием специфических антител содержания Leu-энкефалина: вводимого количества IgG достаточно для связывания 10^{-9} моль Leu-энкефалина. И наоборот, ингибирующее действие антител к Leu-энкефалину также выражено меньше на фоне другого ингибитора мурицидности—ангиотензина II.

Исходя из этих построений, можно предположить существование некоего третьего звена (или цепочки звеньев), участвующего в реализации мурицидности как особой формы биологического поведения. Очевидно, ангиотензиновая и энкефалиновая пептидергические системы выступают, согласно приведенным данным, в качестве функциональных антиподов, регулирующих действенность этого третьего звена. При этом соотношение повышенной активности энкефалинового звена и пониженной—ангиотензинового являются функциональной основой статуса мурицидности.

Известны данные об участии ГАМК-ергической, серотониновой и катехоламиновой систем в модулировании мурицидного поведения [9,10]. Учитывая сопряженность центральных физиологических эффектов ангиотензина II и энкефалинов с этими и другими группами медиаторов, можно полагать, что названные пептиды являются элементами целостной регуляторной цепи формирования и поддержки определенных форм агрессивного поведения. Результаты, полученные на модели естественной формы агрессивного поведения, исходящего в своей основе из хищнического поведения, могут представить некоторые общебиологические закономерности нейромимической организации этого состояния. Приведенные результаты подчеркивают также значение уровня активности соответствующих ферментативных систем синтеза и деградации регуляторных пептидов в качестве молекулярной основы регуляции сложных поведенческих актов.

INTERACTION OF ENKEPHALIN AND ANGIOTENZIN PEPTIDE SYSTEMS IN THE REGULATION OF RAT AGGRESSIVE BEHAVIOUR

Gomazkov O.A., Rostovtsev A.P.,
Panfilov A.D.

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

The role of the enkephalin system in the realization of aggressive behaviour in muricidal (mouse-killing) rats was investigated and compared with effects of angiotensin II. The activity of enkephalin-producing carboxypeptidase (EC 3.4.17.10) was assayed in various brain regions, pituitary and adrenals of normal and muricidal rats. The activity was increased in the striatum of muricidal rats. The muricidal reaction was inhibited by intraventricular (*iv*) injection of IgG prepared from the rabbit anti-[Leu]-enkephalin antiserum. Simultaneous injection of the IgG and intraperitoneal injection of angiotensin II diminished the inhibition of muricidal behaviour as compared with the effects of these substances given individually. We postulate the existence of an intermediate link participating in the control of muricidal behaviour. Angiotensin and enkephalin systems act as functionally opposite entities modulating the activity of this link.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ашмарин И.П., Обухова М.Ф. Биохимия, т.51, вып.4, с.531—544, 1986.
2. Gonten D., Lang R., Lehmann E., Unger T. Biochem. Pharmacol., v.33, p.3523—3528, 1984.
3. Гомазков О.А. Вopr.мeд.химии, т.34, N 1, с.12—19, 1988.
4. Панфилов А.Д., Гомазков О.А., Комиссарова Н.В. Нейрохимия, т.6, N3, с.368—375, 1987.
5. Гомазков О.А., Ростовцев А.П., Комиссарова Н.В., Панфилов А.Д., Елистратова И.А., Фомин В.В. Патол.физиология и эксперим.терапия, N5, с.52—57, 1988.
6. Glovinsky I., Iversen L.L. J.Neurochem., v.13, p.655—669, 1966.
7. Fricker L.D., Snyder S.H. J.Biol.Chem., v.258, p.10950—10955, 1983.
8. Ростовцев А.П., Григорьянц О.О., Гомазков О.А. Вopr.мeд.химии, т.34, N1, с.126—129, 1988.
9. Mandel P., Mack G., Kempf E.—In: Psychopharmacology of aggression (ed. M.Sandler), p.95—110, Raven Press, N.Y., 1979.
10. Valzelli L.—In: Psychobiology of aggression and violence, p.123—152, Raven Press, N.Y., 1981.

Поступила 10.11.1988

УДК 615.36:547.964.4.074

СВОЙСТВА КОМПЛЕКСА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПЕПТИДОВ ЭПИФИЗА

Романцев Ф.Е., Тигранян Р.А., Прокопенко Н.П.,
Рябчук Б.А.

*Институт по стандартизации и контролю
лекарственных средств МЗ СССР, Москва*

Исследованы физико-химические и биологические свойства группы пептидов из эпителиально-эпифизарной области головного мозга крупного рогатого скота. С использованием гель-фильтрации на сефадексе G-50 и анионообменной хроматографии на колонке Мопо-Q выделен ряд пептидных фракций, обладающих выраженным антигонадотропным эффектом. Аминокислотный состав и свойства, проявляемые при ИОХ, свидетельствуют об основном характере пептидов, ответственных за биологическую активность.

* * *

Комплекс пептидов эпифиза (КПЭ), составляющий основу лекарственного средства «Эпиталамин», обладает разносторонней биологической активностью. В литературе имеются сведения о регуляторном действии КПЭ на нейроэндокринную систему [1] и о протективном эффекте при действии стрессорных факторов [2]. Отмечена определенная противоопухолевая активность КПЭ, а также его способность стимулировать некоторые реакции клеточного иммунитета [3—6]. В то же время, одной из наиболее характерных черт КПЭ считается выраженное ингибиторное действие на регуляцию половой функции организма [7].

В связи с этим представлялось целесообразным проведение исследования ряда физико-химических свойств группы эпифизарных пептидов с целью выделения фракций, ответственных за биологическую активность, и создания основы для более тонкого разделения КПЭ.

В литературе описано 4-стадийное выделение биологически активной фракции из КПЭ, включающее ультра- и гель-фильтрацию на биогеле Р-2, сефадексе G-25 и Тоуо-Рearl HW-40 [8]; минимальная доза, в которой проявилась активность очищенной фракции, составляла 10,7 мг/кг массы мыши. Нам представлялось более оптимальным использование 2-стадийной схемы выделения фракций, поскольку она позволяет избежать трех однотипных этапов гель-фильтрации и приводит к получению фракции со значительно большей биологической активностью.

Материалы и методы

Биологическую активность фракций определяли по разработанному нами антигонадотропному тесту с использованием беспородных неполовозрелых самок крыс [9].

Гель-фильтрацию КПЭ проводили на сефадексе G-50 в 5%-ной CH_3COOH на колонке $1,5 \times 50$ см, регистрируя поглощение при 280 нм. Скорость элюции составляла 1 мл/мин.

Аминокислотный состав КПЭ определяли на аминокислотном анализаторе Liquimat III («Laborgon», ФРГ). Гидролиз КПЭ и его фракций проводили в 6 н. хлористоводородной кислоте в течение 24 ч при 110° в запаянных ампулах в атмосфере азота.

Аналитическую и полупрепаративную ИОХ КПЭ и его фракций выполняли на программируемом хроматографе FPLC («Pharmacia», Швеция) с использованием колонки Mono-Q HR 5/5. Регистрацию вели одновременно при двух длинах волн—280 и 206 нм с помощью последовательно соединенных Optical Unit и Uvicord S. Скорость элюции составляла 0,5 мл/мин.

Полученные данные обрабатывали статистически с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Проведение гель-фильтрации на сефадексе G-50 позволило разделить КПЭ на две фракции: высокомолекулярную (I ФР) и низкомолекулярную (II ФР) (рис.1). Высокомолекулярная фракция, выходящая с колонки с фронтом элюата, имела M_r около 30 кД. После лиофилизации I ФР и II ФР они составляли по массе 1/10 и 9/10 соответственно от массы исходного препарата.

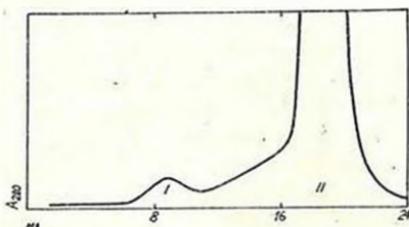


Рис.1. Разделение комплекса пептидов эпифиза на сефадексе G-50

Разделение на G-50 существенно отразилось на биологической актив-

Таблица 1

Аминокислотный состав пептидных фракций из эпифиза

| Аминокислота | Исходный препарат (КПЭ) | | Низкомолекулярная фракция (I ФР) | | Высокомолекулярная фракция (II ФР) | |
|---------------------------------|-------------------------|-------|----------------------------------|-------|------------------------------------|-------|
| | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 |
| | Lys | 3,4 | 7,04 | 7,4 | 17,7 | 2,8 |
| His | 1,1 | 2,28 | 1,3 | 3,11 | 1,7 | 3,59 |
| Arg | 1,8 | 3,73 | 6,5 | 15,55 | 3,5 | 3,5 |
| Asp | 1,1 | 2,28 | 2,1 | 5,02 | 3,2 | 6,75 |
| Thr | 1,6 | 3,31 | 0,3 | 0,72 | 2,6 | 5,49 |
| Ser | 2,1 | 4,34 | 2,8 | 6,7 | 3,3 | 6,96 |
| Glu | 3,4 | 7,04 | 5,0 | 11,96 | 8,3 | 17,51 |
| Pro | 2,8 | 5,8 | 0,4 | 0,96 | 2,1 | 4,43 |
| Gly | 18 | 37,27 | 3,3 | 7,89 | 6,0 | 12,66 |
| Ala | 3,8 | 7,87 | 3,8 | 9,09 | 4,2 | 8,86 |
| Cys | | | | | | |
| Val | 3,9 | 8,07 | 2,1 | 5,02 | 0,1 | 0,21 |
| Met | 0,3 | 0,62 | 0,4 | 0,96 | 0,3 | 0,63 |
| Ile | 0,3 | 0,62 | 0,4 | 0,96 | 2,1 | 4,43 |
| Leu | 0,6 | 1,24 | 0,8 | 1,91 | 3,8 | 8,02 |
| Tyr | 0,3 | 0,62 | 0,6 | 1,44 | 0,8 | 1,69 |
| Phe | 1,6 | 3,31 | 0,6 | 1,44 | 0,5 | 1,05 |
| Trp | | | | | | |
| α -аминомасляная кислота | 2,2 | 4,55 | 4,0 | 9,57 | 2,1 | 4,43 |

Примечание. В таблице представлены средние результаты трех опытов. 1 — содержание аминокислот представлено в г/100г сухого веса. 2 — содержание аминокислот представлено в % от общего количества аминокислот.

ности. В то время как исходный КПЭ в дозе 37 мг/кг массы крысы достоверно ингибировал на 20—40% действие хорионического гонадотропина (ХГ), II ФР обладала таким же действием в дозе, меньшей в 100 раз. Таким образом, освобождение исходного препарата от высокомолекулярных примесей способно повысить его активность на два порядка. Не меньший интерес представляет и тот факт, что высокомолекулярная фракция в дозе 37 мг/кг потенцировала (на $25 \pm 5\%$) действие ХГ, в то время как исходный препарат и II ФР обладали противоположным эффектом.

Аминокислотный анализ (табл.1) позволил выявить характерные свойства КПЭ, а также составляющих его фракций. Оказалось, что одной из наиболее характерных черт является существенное преобладание основных аминокислот над кислыми. Следует отметить, что такое соотношение характерно лишь для препаратов, обладающих антигонадотропной активностью, а именно, для исходного КПЭ (основные/кислые=1,4) и для

низкомолекулярной фракции (основные/кислые=2,14). Поскольку П ФР значительно более активна, чем исходный КПЭ, есть основания считать, что ее биологическая активность обусловлена наличием специфического положительно заряженного пептида или группы пептидов.

Программа изменения состава элюента при ИОХ на Моно Q. Таблица 2

| Время, мин. | Содержание буфера «В» в элюенте, % |
|-------------|------------------------------------|
| 0 | 0 |
| 82 | 0 |
| 90 | 1 |
| 116 | 1 |
| 124 | 2 |
| 146 | 2 |
| 154 | 4 |
| 176 | 4 |
| 184 | 6 |
| 206 | 6 |
| 214 | 10 |
| 236 | 10 |
| 244 | 14 |
| 268 | 14 |
| 276 | 30 |
| 296 | 30 |
| 304 | 60 |
| 326 | 60 |
| 334 | 100 |
| 360 | 100 |

Дополнительное подтверждение этого вывода получено в экспериментах по ИОХ, выполненных на программируемом хроматографе FPLC. Разделение проводили на сильном анионообменнике, имеющем структуру заряженных групп: $-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$. Основанием для выбора подобного сорбента для хроматографии послужили литературные данные об успешном применении Моно-Q для разделения сложных смесей пептидов и белковых гидролизатов [10]. Исходным буфером служил 15 мМ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, pH 9,12. Разделение проходило при градиентной элюции буфером «В», представляющем собой 1,5 М $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, pH 9,02. Программа, согласно которой проходило изменение концентрации буфера «В», представлена в табл. 2. Исходный препарат и его низкомолекулярная фракция были разделены в идентичных условиях на 10 фракций (IФ—XФ)

(рис.2), каждая из которых была проверена на наличие антигонадотропной активности.

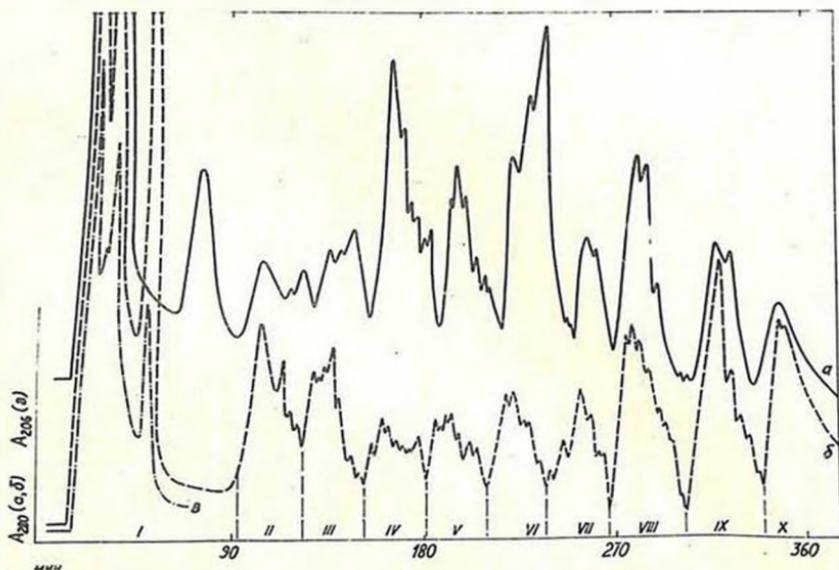


Рис.2. Разделение на анионообменнике комплекса пептидов эпифиза: а — исходный препарат, б — низкомолекулярная фракция II ФР, в — профиль элюции I ф при 206 нм

Поскольку в аминокислотном составе исходного КПЭ и его низкомолекулярной фракции в значительном количестве присутствуют ароматические аминокислоты, а также, учитывая тот факт, что растворы исходного препарата имели высокое поглощение при 280 нм, представляло интерес провести хроматографическое разделение при одновременной непрерывной регистрации поглощения не только при 280 нм, но и при 206 нм, что могло предоставить информацию о содержании пептидных связей. Однако при использовании ацетата аммония в качестве элюента регистрация поглощения при 206 нм возможна лишь при невысоких концентрациях ацетата, вследствие его собственного поглощения. Тем не менее, данный подход позволил зафиксировать при 206 нм профиль элюции I фракции (I ф), единственной из 10 фракций, которая обладала выраженной антигонадотропной активностью в дозе 0,185 мг/кг.

Таким образом, было получено новое доказательство того, что биологическая активность КПЭ связана с наличием в нем положительно заряженных пептидов, практически не задерживающихся на анионообменнике при щелочном рН.

Хроматографическое разделение на колонке Моно-Q позволило четко установить, что отделение (на сефадексе) высокомолекулярной фракции

от низкомолекулярной приводило к значительному уменьшению содержания в профиле исходного препарата неактивных (балластных) фракций IY ф, Y ф, YI ф (рис.2). Поэтому гель-фильтрацию в определенном смысле можно считать стадией, обогащающей низкомолекулярную фракцию по содержанию в ней фракции I ф, в которой и сосредоточена биологическая активность.

Полученные данные свидетельствуют о наличии в КПЭ высокоактивной фракции, определяющей его специфический антигонадотропный эффект.

PROPERTIES OF A PINEAL PEPTIDE COMPLEX POSSESSING BIOLOGICAL ACTIVITY

Romantsev F.E., Tigranyan R.A., Prokopenko N.P.,
Ryabchuk V.A.

Institute for Standardization and Control of Drugs, Moscow

Physico-chemical and biological properties of a group of peptides from epithalamo-pineal region of cattle brain were investigated. Several peptide fractions having pronounced antigonadotropic effect were isolated by Sephadex G-50 gel-filtration and anion-exchange chromatography on Mono-Q. Aminoacid composition and behaviour during ion exchange chromatography demonstrate that peptides responsible for biological activity are basic.

ЛИТЕРАТУРА

1. Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. Эксперим.хирургия, N 1, с.34—38, 1974.
2. Анисимов В.Н. Успехи соврем. биол., т.92, вып.3(6), с.455—472, 1981.
3. Dilman V.M., Anisimov V.N., Ostroumova M.N., Morosov V.G., Khavinson V.Kh., Azarova M.A. Oncology, v.36, p.247—280, 1979.
4. Анисимов В.Н., Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. Докл.АН СССР, т.263, №3, с.742—745, 1982.
5. Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. Докл.АН СССР, т.240, N 4, с.1004—1010, 1978.
6. Филев Л.В., Возжик И.В., Коцюбинский Н.Н., Изгачев В.А., Мазуров В.И., Шейпак Л.Н. — В кн.: Роль пептидных биорегуляторов (цитомединов) в регуляции гомеостаза, с.97, Л., ВМА им.С.И. Кирова, 1987.
7. Reiss M., Davis R.H., Sideman M.B., Mauzer I., Plichta E.S. J.Endocrin., v.27, p.107—118, 1963.
8. Васьюковский Б.В., Михалева И.И., Анисимов В.Н. — В кн.: Роль пептидных биорегуляторов (цитомединов) в регуляции гомеостаза, с.97, Л., ВМА им.С.И.Кирова, 1987.
9. Прокопенко Н.П., Тигранян Р.А., Муратова Г.Л., Анисимов В.Н. — В кн.: Роль пептидных биорегуляторов (цитомединов) в регуляции гомеостаза, с.84, Л., ВМА им.С.М.Кирова, 1987.
10. Källman I. — In: 4th International Symposium of HPLC of Proteins, Peptides and Polynucleotides, p.421, Baltimore, USA, 1984.

Поступила 14. 12. 1988

УДК 616-018.82:616.447

К МЕХАНИЗМУ ДЕЙСТВИЯ ПАРАТИРЕОИДНОГО ГОРМОНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕРВНЫХ КЛЕТОК

Худавердян Д.Н., Тер-Маркосян А.С.,
Саргсян А.Р.

Ереванский государственный медицинский институт

Радиоиммунным методом, модифицированным нами, изучен процесс связывания паратиреоидного гормона (ПТГ) с синапсосомами коры головного мозга крыс и ганглиями улитки *Helix* в условиях *in vitro*. Установлено, что синапсосомы в присутствии эффективных доз (тест на транспорт Ca^{2+}) в инкубационной среде способны связать $279,62 \pm 43,92$ пг/мг белка ПТГ. У ганглиев эта способность ниже и составляет $49,67 \pm 4,22$ пг/мг белка. Обнаружен эффект «down»-регуляции ПТГ в ганглиях. Определено содержание ПТГ, общего и ионизированного кальция, ионизированного калия и натрия в крови и СМЖ животных.

* * *

По классическим представлениям, органами-мишенями ПТГ являются кости, почки и кишечник. Однако в последние годы все больше появляется данных об участии околотитовидных желез в регуляции функциональной активности ЦНС [1—3], гипоталамо-гипофизарно-надпочечникового комплекса [4], сердечно-сосудистой системы [5,6]. В основе действия ПТГ на клетки, не являющиеся для него мишенью, лежит его способность активировать поступление Ca^{2+} -вторичного внутриклеточного посредника, запускающего, подобно циклическим нуклеотидам, каскад ферментативных реакций, ведущий к изменению функционального состояния клетки. Предполагается [6], что для осуществления эффекта на миоциты ПТГ комплексируется с белками примембранного слоя. При этом косвенно указывается на изменение содержания сАМР в миоцитах.

В предыдущих наших исследованиях [7,8] был выявлен феномен активации входа Ca^{2+} в синапсосомы коры мозга крыс физиологическими дозами ПТГ (10^{-11} — 10^{-9} М). Чтобы определить, возможна ли паратиреоидная регуляция функциональной активности нервной клетки, необходимо выяснить наличие ПТГ в СМЖ и пределы колебания его содержания. Учитывая способность ПТГ регулировать минеральный обмен, важно исследовать содержание общего, ионизированного кальция, а также ионизированного калия и натрия в крови и СМЖ и выяснение корреляции между этими показателями. В то же время для объяснения механизма действия

ПТГ на нервную ткань представляется интересным изучение хеморецептивных свойств мембран синапсом коры мозга крыс и ганглиев, что дает возможность сравнить хеморецептивную способность мембран нервной клетки к ПТГ в эволюционном аспекте.

Материалы и методы

Объектом исследования служили белые беспородные крысы-самцы массой 160—180 г, кролики массой 2,5—3 кг и улитки *Helix*.

СМЖ и сыворотку крови получали у кроликов. Содержание общего кальция в сыворотке крови и СМЖ определяли спектрофотометрически с использованием набора «Сhemapol» (ЧССР), а ионизированного кальция, калия и натрия—на приборе «Microlith» («Cone», Финляндия). Содержание ПТГ определяли радиоиммунным методом при помощи набора фирмы «Oris» (Франция).

Синапсомы выделяли из коры головного мозга крыс методом Hajos [9]. Исследование процесса связывания ПТГ с мембраной синапсом проводили радиоизотопным методом с применением набора фирмы «Ogis» (Франция), предназначенного для радиоиммунного определения содержания ПТГ в крови. Принцип метода заключается в конкурентном связывании меченого (^{125}I -ПТГ) и немеченого определяемого гормона (в зависимости от концентрации) с антителами гормона. Для решения поставленной перед нами задачи методика исследования была несколько модифицирована. В данном случае в качестве антител для ПТГ служили возможные белки-рецепторы на мембране, и метод основывался на конкурентном связывании меченого гормона и гормона, находящегося в среде инкубации. Синапсомы в количестве 250 мкг белка/мл инкубировали в среде, содержащей (в мМ): NaCl —145, KCl —5, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ —1,5, MgCl_2 —1,3, CaCl_2 —0,02, глюкозу—10, трис- HCl —20, pH 7,4 при 37°. ПТГ в виде паратиреоидной субстанции («Sigma», США) добавляли в среду инкубации в концентрации 10^{-9} М. При этой концентрации наблюдается максимальный эффект влияния ПТГ на вход Ca^{2+} в синапсомы [7,8]. Меченый гормон набора (разбавленный в 5 раз вместо 100 по методике) добавляли в среду инкубации в количестве 0,1 мл на 1 мл среды инкубации. Параллельно ставили контрольные пробы, в которых синапсомы инкубировали только с изотопом. После инкубации (20 мин) пробы переносили на фильтры «Супрог» (ЧССР, N10) и трижды промывали 3 мл среды инкубации, содержащей $2 \cdot 10^{-9}$ М ПТГ. Радиоактивность фильтров измеряли на счетчике Gamma Comp-1190 (Канада). Рассчитывали отношение результатов опытных проб к контрольным, выражали в процентах и дальнейший расчет проводили по калибровочной кривой. Калибровку проводили при помощи стандартных растворов, находящихся в наборе, используя при этом те же концентрации ^{125}I -ПТГ, что и в опыте.

Исследование связывания ПТГ с ганглиями проводили аналогичным способом. Инкубационная среда для ганглиев содержала (в мМ): NaCl—85, KCl—4, CaCl₂—7, MgCl₂—14, глюкозу—10, трис-HCl—10, pH 7,6 при 18°. В этой серии экспериментов был использован ПТГ в концентрации 10⁻¹⁰ М и 10⁻⁸ М, что также было обусловлено результатами наших предыдущих исследований [10] по изучению действия ПТГ на Ca²⁺-аккумулирующую способность ганглиев. После соответствующей инкубации ганглии промывали трижды в 3-кратном объеме среды инкубации, содержащей 2 · 10⁻¹⁰ или 2 · 10⁻⁸ М ПТГ в зависимости от его исходной концентрации в окружающей ганглии среде.

Количество связанного ПТГ с синапсосомами и ганглиями выражали в пг/мг белка. Содержание белка в пробах определяли по Lowry и соавт. [11].

Результаты и обсуждение

Результаты по определению содержания ПТГ, общего кальция, Ca²⁺, K⁺ и Na⁺ в сыворотке крови и СМЖ приводятся в табл.1, из которой следует, что в СМЖ ПТГ определяется, хотя и составляет 1/3 гормона, содержащегося в крови. Общий кальций и K⁺ также превышают уровень соответствующих элементов в СМЖ, в то время как концентрация Ca²⁺ и Na⁺ в обеих биологических жидкостях одинакова. На основании обнаруженного нами факта наличия ПТГ в СМЖ можно предположить, что он участвует в регуляции функциональной активности ЦНС, и не исключено, что эта регуляция осуществляется путем изменения содержания Ca²⁺ на уровне нервной клетки.

Таблица 1
Содержание паратиреоидного гормона (ПТГ; в нг/мл), общего кальция, Ca²⁺, K⁺, Na⁺ (в мМ) в сыворотке крови и СМЖ кроликов

| Объект исследования | ПТГ | Общий кальций | Ca ²⁺ | K ⁺ | Na ⁺ |
|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|
| Кровь n=3 | 1,60±0,20 | 3,53±0,13 | 1,15±0,10 | 4,89±0,23 | 142,47±1,46 |
| СМЖ n=3 | 0,47±0,16 t=4,13 | 1,90±0,19 t=7,00 | 1,16±0,05 t=0,09 | 2,94±0,20 t=6,50 | 143,77±5,62 t=0,22 |

Результаты исследования хеморецептивных свойств нейрональной мембраны к ПТГ обобщены в табл.2, из которой видно, что при наличии в среде инкубации 10⁻⁹ М ПТГ синапсосомы способны связать 279,62±43,92 пг/мг белка гормона.

В серии экспериментов, проведенных на ганглиях, были использованы

две различные концентрации гормона: 10^{-10} и 10^{-8} М, что, как уже отмечалось, обосновано нашими данными относительно Ca^{2+} -аккумулирующей способности ганглиев под действием указанных концентраций ПТГ [10]. Максимальные сдвиги в содержании Ca^{2+} в ганглиях во временном интервале 0—0,5 мин были вызваны ПТГ в концентрации 10^{-10} М. Тот факт, что максимум изменений наблюдается именно в таком маленьком промежутке времени от начала инкубации ганглиев с ПТГ и $^{45}\text{Ca}^{2+}$, свидетельствует, по-видимому, об активации потенциалзависимого Ca^{2+} -канала мембраны. ПТГ в концентрации 10^{-8} М в этом промежутке времени не оказывал существенного действия и лишь спустя 15—30 мин инкубации приводил к стимуляции транспорта $^{45}\text{Ca}^{2+}$ в ганглии. Результаты данной серии экспериментов показывают, что в случае присутствия в инкубационной среде 10^{-10} М ПТГ ганглиями связывается $49,67 \pm 4,22$ пг/мг белка гормона. Хеморецептивные свойства ганглиев резко подавляются, если концентрация ПТГ увеличивается до 10^{-8} М и составляет $0,69 \pm 0,08$ пг/мг белка.

Таблица 2

Хеморецептивная способность синапсом коры головного мозга крыс и ганглиев улитки *Helix* к паратиреоидному гормону (ПТГ; в пг/мг белка)

| Объект исследования | Концентрация ПТГ. М | | |
|---------------------|---------------------|--------------------|-----------------|
| | 10^{-10} | 10^{-8} | 10^{-6} |
| Синапсомы n=5 | — | $279,62 \pm 43,92$ | — |
| Ганглии n=5 | $49,67 \pm 4,22$ | — | $0,69 \pm 0,08$ |

Таким образом, с повышением концентрации гормона степень его связывания с ганглиями уменьшается. По данным литературы [12], большие дозы ПТГ уменьшают число рецепторов в плазматических мембранах органов-мишеней, в частности почек, то есть имеет место ауторегуляторный феномен, называемый «down»-регуляция. Можно предположить, что обнаруженный нами факт есть следствие вышеописанного ауторегуляторного феномена.

Сравнивая количества связанного гормона с мембраной синапсом и ганглиями, можно заметить, что хеморецептивная способность синапсом к ПТГ намного выше, чем у ганглиев. Это, по-видимому, объясняется наличием околотитовидных желез и соответствующих специфических рецепторов к ПТГ у крыс. У улиток эти рецепторы менее чувствительны к гормону. Несмотря на это, эффект действия ПТГ на вход Ca^{2+} в ганглии больше (54,70%) [10], чем в синапсомы (31,74%) [7,8], что указывает на возможность действия ПТГ на мембрану нервной клетки не только по классическому механизму, присущему пептидным гормонам, но и в результате воздействия непосредственно на структурную целостность мембраны,

например, путем активации различных фосфолипаз (A_1, A_2, C), приводящих в конечном итоге к повышению внутриклеточного Ca^{2+} . В пользу этого предположения свидетельствуют данные литературы [13] о возможной активации ПТГ фосфолипазы A_2 в мембранах митохондрий, приводящей к разобщению окислительного фосфорилирования. Как известно, в плане регуляции кальциевого метаболизма на клеточном уровне наибольший интерес представляет фосфолипаза C , являющаяся регулятором фосфоинозитольного цикла [14].

Таким образом, мембрана нервной клетки способна связывать ПТГ. На такую возможность указывают также предположения некоторых авторов [15,16] о существовании рецепторов для ПТГ на мембране нервной клетки. Вышеизложенное дает основание рассматривать нервную ткань в качестве мишени для ПТГ и соответственно пересмотреть круг тканей, рецептирующих ПТГ.

ON THE MECHANISM OF PARATHYROID HORMONE EFFECT ON FUNCTIONAL ACTIVITY OF NERVE CELLS

Khudaverdyan D. N., Ter-Marcosyan A. S.,
Sargsyan A. R.

State Medical Institute, Yerevan

Binding of parathyroid hormone (PTH) with rat cerebral cortex synaptosomes and *Helix pomatia* ganglia was studied *in vitro* by a modified radioimmunological technique. In the presence of effective doses of PTH in the reaction medium (Ca^{2+} transport test) synaptosomes bound 279.62 ± 43.92 pg PTH per milligram of synaptosomal protein. The binding capacity of ganglia was lower (49.67 ± 4.22 pg/mg). «Down»-regulation by PTH was observed in ganglia. We also determined concentrations of PTH, total and ionized calcium, ionized potassium and sodium in blood and cerebrospinal fluid of animals.

ЛИТЕРАТУРА

1. Худавердян Д.Н. Докт. дисс., Ереван, 1984.
2. Худавердян Д.Н., Мхехян Э.Э.-В кн.: II Всесоюзный съезд эндокринологов, с.330—331, Л., 1980.
3. Школовой В.В., Глебов Р.Н. Бюл. эксперим. биол. и мед., N12, с.1434—1436, 1976.
4. Довлатян Р.А. Канд. дисс., Тбилиси, 1986.
5. Strickland M.L., Moore P.L. Pang P.K.T., Crass M.F. J. Comp. Physiol., B147, s.101—106 1982.
6. Барабанова В.В. Автореф. докт. дисс., Л., 1981.
7. Худавердян Д.Н., Крыжановский Г.Н., Тер-Маркосян А.С., Луценко В.К. Тезисы докл. II Конференции по физико-химической биологии и биотехнологии в медицине, с.61, Ереван, 1986.

8. Луценко Б.К., Тер-Маркосян А.С., Хлебникова Н.Н., Худавердян Д.Н. Бюл. эксперим. биол. и мед., N8, с.146—149, 1987.
9. Hajos F. *Brain Res.*, v.93, p.485—489, 1975.
10. Худавердян Д.Н., Тер-Маркосян А.С., Айрапетян С.Н.- В кн.: Кальцийрегулирующая система в норме и патологии (под ред. Д.Н.Худавердяна), с.21—26, Ереван, Айастан, 1988.
11. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. *J. Biol. Chem.*, v.193, N1, p.265 - 275, 1951.
12. Forte L.K., Langelutting S.G., Poelling R.E., Thomas M.L. *Amer. J. Physiol.*, v.242, N3, p.485—489, 1975.
13. Сороковой В.И., Владимиров Ю.А. - В кн.: Итоги науки и техники. Сер. Биофизика (под ред. Ю.А.Владимирова), т.5, с.12—55, М., ВИНТИ, 1975.
14. Beride M.J., Dawson R.M.C., Downes C.P. *Biochem. J.*, v.212, N2, p.473—482, 1983.
15. Држевецкая И.А., Држевецкий Ю.М. Гормональная регуляция обмена кальция и секреторные процессы. Итоги науки и техники. Сер. Физиология человека и животных, т.27, М., 1983.
16. Држевецкая И.А. Эндокринная система растущего организма, М., Высшая школа, 1987.

Поступила 12. 09. 1988

A. Gorio, J.R. Perez-Polo, J. De Vellis, B. Haber Neural Development and Regeneration. Cellular and Molecular Aspects. (NATO ASI Series, v.H.22), Springer, Berlin, 711 p., 1988.

Развитие и регенерация нервов. Клеточные и молекулярные аспекты.

В этом томе представлены данные о соответствующих аспектах роста и дифференциации нервных клеток. Регуляция экспрессии, хранения и высвобождения факторов роста нервов, регуляция рецепторов и клеточные реакции на факторы роста — таков перечень обсуждаемых в книге проблем. Уделено также внимание влиянию различных нейротрансмиттеров на морфогенез нервов и новым результатам о взаимодействии клеток и медиаторов иммунной, эндокринной и нервной систем. Подробно рассмотрены факторы, регулирующие регенерацию и распространение нервов после повреждения нервной ткани.

УДК 577.153

ИЗОФОРМЫ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ Na^+, K^+ -АТРАЗЫ МОЗГА И ИХ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К УБАИНУ

Капля А.А., Кравцов А.В., Кравцова В.В.,
Горишняк В.П.

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

По данным электрофореза, в ПААГ в присутствии ДДС-Na препаратов фермента мозга крысы и быка Na^+, K^+ -АТРаза представлена двумя изоформами каталитической субъединицы (α^+ и α^-). Однако только для фермента мозга крысы кинетика ингибирования активности Na^+, K^+ -АТРаза убаином является двухфазным ($K_{0.5} = 4 \times 10^{-7}$ и 10^{-4} М для первой и второй фаз соответственно). В то же время для фермента мозга быка наблюдается сходство с ферментом почек свиньи в характере ингибирования убаином (кинетика однофазная, оба одинаково высокочувствительны к убаину, $K_{0.5} = 3 \times 10^{-7}$ М), хотя последний представлен только одной α^- изоформой.

Ауторадиографией гелей показано, что в препаратах мозга крыс при концентрации убаина $> 5 \times 10^{-7}$ М наблюдается полное блокирование каталитического фосфорилирования [γ - ^{32}P] АТФ α^+ -субъединицы Na^+, K^+ -АТРаза, в то время как даже при концентрации убаина 10^{-3} М не происходит полного ингибирования α^- формы. Вместе с тем, в случае с ферментом мозга быка не выявлено различий в чувствительности к ингибитору обеих изоформ.

Следовательно, гетерогенность средства изоформ Na^+, K^+ -АТРаза к убаину имеет видовую специфичность. При этом гликозидчувствительная и гликозидустойчивая формы фермента не абсолютно тождественны α^- и α^+ изоформам Na^+, K^+ -АТРаза.

* * *

Na^+, K^+ -АТРаза (АТФ: фосфогидролаза, КФ 3.6.1.37) представляет собой интегральный белок плазматических мембран, осуществляющий активный транспорт Na^+ и K^+ в клетках животных. В мозгу этот фермент присутствует в высокой концентрации, где он участвует в обеспечении процессов возбуждения, поддерживая необходимые трансмембранные ионные градиенты.

Специфическими ингибиторами Na^+, K^+ -АТРаза являются сердечные гликозиды, центры связывания которых локализованы на внеклеточной поверхности α^- субъединицы фермента и пространственно обособлены от ее внутриклеточного каталитического участка липидным бислоем [1,2].

Этот факт, наряду с многочисленными экспериментальными данными о существовании в организме животных эндогенных убаинподобных

веществ-регуляторов активности Na^+, K^+ -АТФазы [3], позволил обосновать особую рецепторную функцию фермента, тесно связанную с его транспортно-гидролитической функцией [4].

Наличие видовых и тканевых различий сродства Na^+, K^+ -АТФазы к убаину свидетельствует о существовании неиндуцируемых лигандами гликозидчувствительной и гликозидустойчивой форм фермента [4—7].

Действительно, в мозгу млекопитающих, скелетных мышцах и жировой ткани крысы, миокарде собаки наряду с обычной молекулярной формой фермента почечного типа (α -форма) обнаружен изофермент с каталитической субъединицей большей величины M_r (α^+ -форма) [6,8—10]. Чувствительность последнего к убаину в мозгу крыс на два порядка выше, чем α -формы [8,9].

Однако к настоящему времени не получен однозначный ответ на вопрос о том, наблюдается ли абсолютное соответствие убаинчувствительной и убаинустойчивой форм Na^+, K^+ -АТФазы α^+ и α -изоформам фермента [4—10].

Целью настоящей работы явилось сравнительное определение чувствительности к сердечным гликозидам двух изоформ Na^+, K^+ -АТФазы в препаратах фермента из мозга крыс и быка на основании исследования ингибирования убаином Na^+, K^+ -АТФазной активности в гетерогенных по изоферментному составу препаратах фермента мозга и каталитического фосфорилирования [γ - ^{32}P] АТФ индивидуальных изоформ.

Материалы и методы

Частично очищенные мембраносвязанные препараты Na^+, K^+ -АТФазы выделяли из серого вещества головного мозга быка и крыс по методу Sweadner [11] с некоторыми модификациями.

Мозг быка сразу после забоя животных на мясокомбинате на льду доставляли в лабораторию. Мозг белых беспородных разнополых крыс (200—250 г), умерщвленных декапитацией, немедленно охлаждали в среде гомогенизации (320 мМ сахара, 1 мМ трис-ЭДТА, рН 7,2).

Микросомную фракцию, полученную по Sweadner [11], инкубировали 30 мин, 20° в среде: 50 мМ имидазол (рН 7,4), 1 мМ ЭДТА, 3 мМ трис-АТФ, 5 мкг/мл белка микросом, 1,2 мг/мл ДДС- Na . Смесь (5 мл) наслаивали на ступенчатый градиент концентраций сахарозы: 15, 25, 30% (вес/об., по 8 мл) с 5 мМ имидазолом (рН 7,4), 0,1 мМ ЭДТА. Центрифугировали в бакет-роторе 4 ч, 110000 г. Отбирали белковую зону на границе 15—25% сахарозы, разводили 2-кратно 5 мМ имидазолом (рН 7,4), 0,1 мМ ЭДТА и осаждали центрифугированием при 105000 г, 2 ч. Осадки суспендировали в среде: 25 мМ имидазол (рН 7,4), 10%-ная сахароза, 0,1—0,5 мМ ЭДТА и использовали в качестве конечного мембраносвязанного препарата Na^+, K^+ -АТФазы мозга.

Высокоочищенный мембраносвязанный препарат фермента из наружного мозгового слоя почек свиньи получали по методу Jorgensen [12]. Активность препаратов составляла в мозгу быка 2,5—3, крысы—5—6, почках свиньи—18—20 мкмоль P_i /мг белка в мин. Препараты хранили до 2-х месяцев при -20° без потери активности.

Na^+, K^+ -АТФазную активность определяли по ранее описанному методу [13], Mg^{2+} -АТФазную активность—в присутствии $10^{-3}M$ (фермент мозга быка и почек свиньи) и $3 \cdot 10^{-3}M$ (фермент мозга крыс) уабаина.

Концентрацию белка [14] подбирали таким образом, чтобы за время инкубации гидролизовалось не более 10% АТФ. АТФ- Na_2 (дважды перекристаллизованная, «Reanal», Венгрия) переводили в трис-форму с помощью смолы Dowex 50w \times 8.

Электрофорез белков проводили по Laemmli [15] в вертикально расположенных пластинках ПААГ (120 \times 120 \times 1 мм) на отечественном приборе для вертикального гель-электрофореза фирмы «Хийу Калур» (ЭССР). Гели обрабатывали по Кондратьеву и соавт. [16].

При изучении ингибирования сердечными гликозидами каталитического фосфорилирования [γ - ^{32}P] АТФ фермента 30—40 мкг белка препаратов Na^+, K^+ -АТФазы инкубировали в объеме 40 мкл 1 ч, 37° в среде: 20 мМ имидазол (рН 7,25), 5 мМ H_3PO_4 (нейтрализована трисом), 5 мМ $MgCl_2$, уабаин в диапазоне исследуемых концентраций. Затем пробы охлаждали на льду несколько минут и аликвоты (35 мкл) переносили в пробирки с 5 мкл смеси: 1,04 М NaCl, 4 мМ [γ - ^{32}P] АТФ (20—25 мкКи в пробе). Инкубировали на льду 20 с. Реакцию фосфорилирования останавливали добавлением 13 мкл 4-кратного солибилизирующего буфера: 200 мМ трис-HCl (рН 6,8 при 20°), 8% ДДС-Na, 4% 2-меркаптоэтанол, 8 мМ ЭДТА, 40% глицерин, 0,004% бромфеноловый синий. Образцы выдерживали 20 мин при комнатной температуре и подвергали электрофорезу. Ауторадиографию гелей проводили на рентгеновской пленке РМ-1, экспозиция — 5—10 дней при -20°).

Результаты и обсуждение

Ингибирование Na^+, K^+ -АТФазы уабаином изучали в процессе АТФазной реакции, то есть ингибитор в исследуемом диапазоне концентраций ($0-3 \times 10^{-3} M$) присутствовал в инкубационной среде совместно с Mg^{2+} , АТФ, Na^+ и K^+ . Для достижения стационарного уровня ингибирования АТФазную реакцию проводили в течение 30 мин.

Как видно из рис.1, препараты фермента существенно различаются по характеру ингибирования сердечным гликозидом. Для Na^+, K^+ -АТФазы мозга крыс в отличие от фермента из мозга быка кривая ингибирования

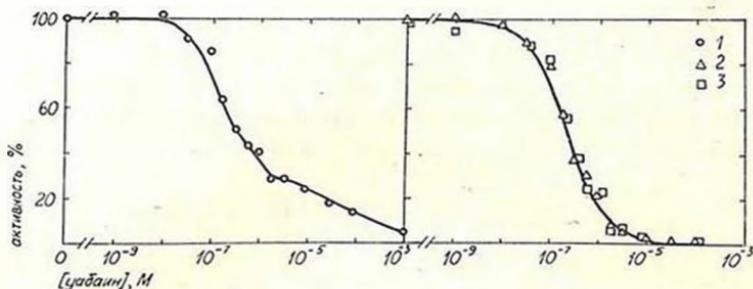


Рис.1. Ингибирование Na^+, K^+ -АТФазы мозга крыс (1), быка (2) и почек свиньи (3) уабаином

имеет более сложную форму, чем в случае подчинения закономерностям классической кинетики связывания ингибитора, и характеризуется наличием двух четко выраженных компонент ингибирования ($K_{0,5}$ ингибирования уабаином составляет 4×10^{-7} и 10^{-4} М).

В то же время наблюдается значительное сходство по характеру зависимости активности Na^+, K^+ -АТФазы от концентрации ингибитора и сродству к гликолизу между ферментами мозга быка и почек свиньи ($K_{0,5}$ ингибирования гликозидом соответствует значению этой константы для высокочувствительной к уабаину компоненты ингибирования фермента мозга крыс: 3×10^{-7} М).

Кроме того, для фермента мозга быка, как и почек свиньи, практически полное ингибирование Na^+, K^+ -АТФазной активности наступает при концентрации уабаина 10^{-4} М, в то время как у Na^+, K^+ -АТФазы мозга крыс некоторая остаточная активность сохраняется даже при высоких концентрациях гликозида (10^{-3} М).

Следовательно, Na^+, K^+ -АТФазы мозга быка и почек свиньи являются собой пример уабаинчувствительной формы фермента, а Na^+, K^+ -АТФазы мозга крысы обладает также свойствами резистентной к гликозиду формы.

Согласно данным литературы [6, 8], двухфазность кривых ингибирования Na^+, K^+ -АТФазы сердечными гликозидами предполагает наличие в мозгу двух популяций фермента с разным сродством к ингибитору.

Действительно, гель-электрофорез препаратов Na^+, K^+ -АТФазы мозга [15], в отличие от почек, выявляет две белковые полосы в области каталитической субъединицы фермента с M_r 90 кД (рис.2, а).

Согласно терминологии Sweadner [8], они обозначены α и α^+ (соответственно для полипептида с меньшей и большей величиной M_r), соответствуют каталитическим субъединицам двух различных молекулярных форм фермента и могут быть идентифицированы по Na^+ -зависимому, K^+ -чувствительному фосфорилированию [γ - ^{32}P]АТФ (рис.2, б).

Видовые различия фермента из мозга коровы и крысы заключаются

в относительном содержании и близости миграции при гель-электрофоре α - и α^+ -форм каталитической субъединицы Na^+, K^+ -АТФазы.

По данным сканирования окрашенных Кумаси ярко-голубым R-250 гелей, содержание α^+ -формы для препаратов фермента мозга быка и крысы составляет 50—60 и 75—80% соответственно.

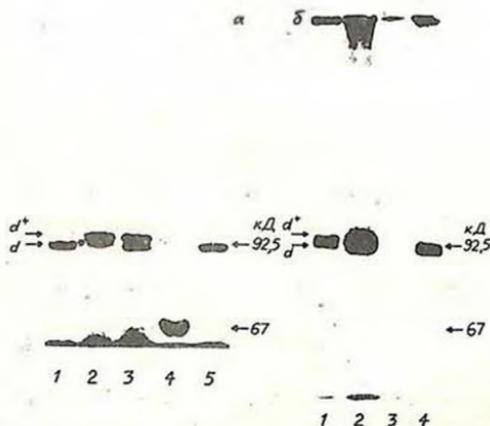


Рис.2а -электрофореграмма препаратов Na^+, K^+ -АТФазы (5,6%-ПААГ): почка свиньи (1,5), мозга крысы (2)и быка (3). Белки-маркеры (4): фосфорилаза b, 92,5 кД; БСА, 67 кД. Положение белков-маркеров и изоформ каталитической субъединицы Na^+, K^+ -АТФазы отмечено стрелками на полях, * — α -форма мозга крысы. б-ауторадиографическая идентификация каталитической субъединицы Na^+, K^+ -АТФазы после электрофореза в 6%-ном ПААГ. Препараты фермента мозга быка (1,2) и почки свиньи (3,4) фосфорилировали 20 с на льду в среде:30 мМ трис-НСI (рН 7,25-4 °), 5 мМ MgCl_2 , 1 мкМ [γ - ^{32}P] АТФ (5 мкКи в пробе), 130 мМ NaCl (2,4) и 20 мМ KCl (1,3).

На электрофореграммах α -изоформа каталитической субъединицы Na^+, K^+ -АТФазы мозга крысы при электрофорезе в 5,6%-ном ПААГ занимает промежуточное положение между α^+ -субъединицей препаратов фермента мозга быка и крысы и α -субъединицей мозга быка и почек свиньи (рис.2, а).

Однако, несмотря на то, что оба исследуемых препарата Na^+, K^+ -АТФазы мозга содержат две изоформы каталитической субъединицы α^+ и α (рис.2,а), двухфазность ингибирования убабином, как отмечалось выше, выявляется только для фермента мозга крысы, что свидетельствует о наличии двух различающихся по средству к ингибитору типов центров связывания гликозида.

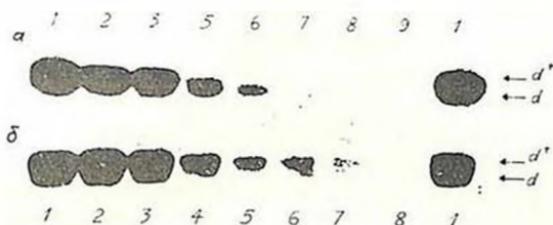


Рис.3. Каталитическое фосфорилирование Na^+, K^+ -АТФазы мозга крыс (а) и быка (б) $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$. Ауторадиограмма гелей (приведена область каталитической субъединицы фермента). Концентрация ПААГ при электрофорезе: 5% (а) и 5,6% (б). Препараты преинкубировали (см. «Материалы и методы») в присутствии различных концентраций убаина (в М): 0 (1), 10^{-8} (2), 10^{-7} (3), $2,5 \cdot 10^{-7}$ (4), $5 \cdot 10^{-7}$ (5), 10^{-6} (6), 10^{-5} (7), 10^{-4} (8), 10^{-3} (9).

Таким образом, гетерогенность средства изоформ Na^+, K^+ -АТФазы к убаину не абсолютна и имеет четкую видовую специфичность.

Для подтверждения этого предположения исследовали ингибирование убаином каталитического фосфорилирования двух изоформ фермента. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в случае препаратов Na^+, K^+ -АТФазы мозга крысы α^+ -форма каталитической субъединицы более чувствительна к ингибитору, чем α -форма (рис.3, а).

При концентрациях убаина более 5×10^{-7} М наблюдается полное блокирование внутримолекулярного фосфорилирования α^+ -формы, в то время как даже при концентрации гликозида равной 10^{-3} М не наступает полного ингибирования для α -формы.

Следовательно, двухфазность кривой ингибирования Na^+, K^+ -АТФазы мозга крыс убаином (рис.1) объясняется разной чувствительностью к нему двух изоформ фермента, а кинетические параметры кривой ингибирования характеризуют средство к ингибитору α^+ и α -форм каталитической субъединицы Na^+, K^+ -АТФазы мозга крыс (различия составляют более чем два порядка).

Относительное содержание двух изоформ фермента можно рассчитать на основании данных рис.1. Так, содержание малочувствительной к убаину α -формы Na^+, K^+ -АТФазы, ответственной за компоненту низкого средства к ингибитору на кривой ингибирования при концентрациях убаина $> 5 \cdot 10^{-6}$ М, составляет около 30%, что хорошо согласуется с данными сканирования гелей.

В то же время, в случае с ферментом мозга быка не выявлено различий в чувствительности к ингибитору обеих изоформ Na^+, K^+ -АТФазы

(рис.3, б): при концентрации уабаина $>10^{-7}$ М наблюдается параллельное ингибирование включения 32 P как в α^+ - , так и α -форму каталитической субъединицы фермента, что полностью соответствует характеру зависимости Na^+, K^+ -АТРазной активности от концентрации ингибитора (рис.1).

Следовательно, обе формы каталитической субъединицы Na^+, K^+ -АТРазы мозга быка имеют сходное сродство к ингибитору.

Различия в чувствительности к кардиоактивным стероидам, выявленные для изоформ Na^+, K^+ -АТРазы мозга, адипоцитов и скелетных мышц крысы [8—10], были признаны универсальным свойством, характеризующим α^+ - и α -формы фермента. Действительно, последние имеют четкие структурно-функциональные различия: α^+ -форма каталитической субъединицы имеет добавочный 2 кД компонент, большее число реакционноспособных и функционально активных сульфгидрильных групп и более резистентна к трипсинолизу [6, 8], обладает большей чувствительностью к ингибитору пиритиамину [6], а в адипоцитах и скелетных мышцах специфически активируется инсулином [10]; обе формы, наконец, характеризуются различными антигенными детерминантами [17] и имеют отличия в N-концевой аминокислотной последовательности [18].

Поскольку изоформы Na^+, K^+ -АТРазы имеют различную тканевую локализацию (в случае с ферментом из мозга α^+ специфичны для аксолеммы, а α — для глиальных клеток, астроцитов [8,9]), то различная их чувствительность к сердечным гликозидам и, следовательно, к потенциальным эндогенным уабаинподобным веществам, по-видимому, свидетельствует в пользу гипотезы о различной функциональной роли этих изоформ.

Однако наши результаты и данные литературы [4,6,7] показывают, что было бы упрощением отождествлять α^+ - и α -изоформы с уабаинчувствительной и уабаинустойчивой формами фермента. Такое соотношение чувствительности к гликозиду изоформ Na^+, K^+ -АТРазы реализуется по крайней мере в тканях крыс и других грызунов (наши и литературные данные [6, 8—10]), для α -изоформ Na^+, K^+ -АТРазы которых установлены специфические особенности белковой структуры по сравнению с другими млекопитающими [17,19], обуславливающие, очевидно, и специфику ее функциональных свойств—резистентность к уабаину.

Следовательно, представление о молекулярных формах фермента недостаточно для полного объяснения видовых различий в чувствительности к уабаину Na^+, K^+ -АТРазы.

В наших исследованиях α^+ -форма мозга крысы и быка, как α -форма мозга быка и почек свиньи, характеризовались одинаково высоким сродством к ингибитору в сравнении с резистентной к гликозид α -формой мозга крысы.

Можно предположить, что специфичность к ингибитору реализуется на уровне уабаинсвязывающих участков каталитической субъединицы фермента.

ISOFORMS OF THE CATALYTIC
SUBUNIT OF BRAIN Na^+, K^+ -ATPase AND THEIR
OUABAIN SENSITIVITIES

Kaplya A.A., Kravtsov A.V., Kravtsova V.V., Gorishnyak V.P.

*Palladin Institute of Biochemistry, Ukrainian SSR Academy of
Sciences, Kiev*

Two forms of Na^+, K^+ -ATPase catalytic subunit in enzyme preparations from the rat and bovine brain were detected by SDS-PAGE electrophoresis. However, only the rat brain enzyme has biphasic curve of ouabain inhibition with $K_{0.5} = 4 \cdot 10^{-7}$ and 10^{-4} respectively. Bovine brain enzyme resembles ATPase from pig renal medulla in ouabain inhibition pattern as they both have similar sensitivity to ouabain with $K_{0.5}$ of inhibition equal to $3 \cdot 10^{-7}$, although the pig renal ATPase has only the α -type of catalytic subunits. Autoradiography of the gels showed that catalytic phosphorylation of the α^+ -subunit by $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ was blocked in the rat brain preparations by $5 \cdot 10^{-7}\text{M}$ ouabain, but even 10^{-3} ouabain did not completely inhibit phosphorylation of the α -form. Contrary to rat brain enzyme, bovine brain Na^+, K^+ -ATPase isozymes show no differences in their sensitivities to the inhibitor. Hence, the affinity of the Na^+, K^+ -ATPase isozymes to ouabain is species-specific; the glycoside-sensitive and glycoside-insensitive forms are not fully identical to α^+ - and α -subunit forms of Na^+, K^+ -ATPase.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Cantleu L.C.-In: Current topics in bioenergetics (ed. D.R.Sanadi), v.11, p.201—237, New York, Acad. Press, 1981.
2. Болдырева А.А., Мельгунов В.И. Транспортные АТФазы. Итоги науки и техники, сер. Биофизика, т.17, М., ВИНТИ, 1985.
3. Лопина О.Д., Таласова С.Ю., Стецюк Н.У., Коглобай А.А., Болдырев А.А. Укр. биохим. журн., т.58, №6, с.74—84, 1986.
4. Anner В.М. Biochem. J., v.227, №1, p.1—11, 1985.
5. Urayama O., Nakao M. J. Biochem., v.86, №5, p.1371—1381, 1979.
6. Matsuda T., Iwata T., Cooper J.R. J. Biol. Chem., v.259, №6, p.3858—3863, 1984.
7. Feige G., Leutert Th., De Pover A.-In: 5-th Int. Conf. Na, K-ATPase, Aarhus, 14—19 June, 1987, Abstr. and Progr., p.103, Aarhus, 1987.
8. Sweadner K.J. J. Biol. Chem., v.254, №13, p.6060—6067, 1979.
9. Sweadner K.J. J. Biol. Chem., v.260, №21, p.11508—11513, 1985.
10. Lutton J., Lin J.C., Guidotti G. J. Biol. Chem., v.260, №2, p.1177—1184, 1985.
11. Sweadner K.J., Biochim. et biophys. acta, v.508, №3, p.486—499, 1978.
12. Jorgensen P.L. Biochim. et biophys. acta, v.356, №1, p.36—52, 1974.
13. Капля А.А., Крацов А.Б., Крацова В.В., Слуцкая Н.П., Гориняк В.П. Укр. биохим. журн., т.60, №2, с.40—47, 1988.
14. Cadman E., Bostwick J.R., Eichberg J. Anal. Biochem., v.96, №1, p.21—23, 1979.
15. Laemmli U.K. Nature, v.227, №5259, p.680—685, 1970.
16. Кондратьев В.Е., Щупакина Т.Г., Лазарев А.В., Буданцев А.Ю. Укр. биохим. журн., т.56, №5, с.483—487, 1984.
17. Sweadner K.J., Gilkenson R.C. J. Biol. Chem., v.260, №15, p.9016—9022, 1985.
18. Lytton J. Biochem. Biophys. Res. Commun., v.132, №2, p.764—769, 1985.
19. Nara Y., Urayama O., Kawakami K., Nojima H., Nagamune N., Kojima T., Ohta T., Nagano K., Nakao M. J. Biochem., v.102, №1, p.43—58, 1987.

Поступила 5.12.1988

УДК 577.352.:577.152.3

ЭНДОГЕННЫЙ ИНГИБИТОР СПЕЦИФИЧЕСКОГО СВЯЗЫВАНИЯ [³H]УАБАИНА С Na⁺, K⁺-АТФазой ИЗ МОЗГА БЫКА

*Корнеев А.Я., Левицкий Ю.А.,
Брусованик В.И.

*НИИ фармакологии АМН СССР
МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва

Радиорецепторным методом исследовано АТФ/фосфатзависимое связывание [³H]уабаина с Na⁺, K⁺-АТФазы мозга быка. В присутствии фосфата участки специфического связывания [³H]уабаина характеризуются K_d=5,1 нМ и V_{max}=2120 пМ/г ткани. Эндогенный ингибитор специфического связывания уабаина с величиной M_r 500—1000 Д частично очищен из мозга быка при помощи кислотно-метанольной экстракции и гель-хроматографии.

Градиент концентрации натрия и калия между клеткой и внеклеточной средой поддерживается при участии Na⁺, K⁺-АТФазы. Особенно велика роль этого фермента в деятельности возбудимых тканей: мышц, сердца, нервной ткани, где мембранный потенциал подвержен постоянным и сильным изменениям [1-3].

Ингибиторами Na⁺, K⁺-АТФазы являются сердечные гликозиды группы строфантина: уабаин, дигоксин, дигитоксин и другие. Эти соединения способны с высоким сродством и избирательностью связываться с регуляторным центром, локализованным на внешнем по отношению к клетке участке α-субъединицы фермента, что приводит к подавлению его активности [1,3]. Вместе с тем, в ряде работ показано, что сродство сердечных гликозидов к центрам специфического связывания уабаина и их способность ингибировать Na⁺, K⁺-АТФазу не коррелируют между собой [4]. Одно из возможных объяснений этих данных основано на предположении о существовании в организме соединений, способных модулировать активность Na⁺, K⁺-АТФазы и/или конкурировать с гликозидами за места специфического связывания. В последнее время появились сообщения о выявлении таких соединений (в основном в плазме крови человека), однако их структура и способность в физиологических концентрациях действовать на Na⁺, K⁺-АТФазу остаются неизвестными [5,7,13,16]. В настоящей работе изучены параметры специфического связывания [³H]уабаина и [³H]дигоксина в коре мозга быка и свойства

присутствующего в мозгу ингибитора связывания [^3H]уабаина, который, возможно, является одним из соединений, регулирующих активность Na^+ , K^+ -АТФазы в организме.

Материалы и методы

Специфическое связывание [^3H]уабаина и [^3H]дигоксина (соответственно 15,5 и 16 Ки мМ, «Amersham», Англия) с 4-кратно отмытым в 30 объемах ледяного 50 мМ трис-НСI буфера (рН 7,2) мембранами [8] мозга быка определяли, как описано ранее [3], с модификациями. Использовали два инкубационных буфера—буфер А: 20 мМ НЕРЕS, 2,5 мМ MgCl_2 , 150 мМ NaCl , 1 мМ аскорбат, 3 мМ АТФ (аскорбат и АТФ вносили перед началом инкубации), NaOH до рН 7,2 при 20°; буфер Р: 50 мМ имидазол, 2,5 мМ MgCl_2 , ортофосфорная кислота до рН 7,2 при 20°.

Суспензию мембран в конечном объеме 1 мл соответствующего буфера инкубировали при 37° в течение 90 мин с радиоактивным лигандом и добавками исследуемых веществ, после чего фильтровали под вакуумом через стекловолокнистые фильтры GF/B (2,4 см, «Whatman», Англия) и промывали 15 мл ледяного 50 мМ трис-НСI буфера. Определяли радиоактивность, задержанную фильтрами.

Для оценки неспецифического связывания в инкубационную смесь добавляли уабаин до концентрации 5 мкМ. Общее связывание определяли в 3 параллельных пробах, неспецифическое—в двух и вычитали из первых значений вторые, чтобы получить величину специфического связывания. Специфическое связывание [^3H]уабаина (1 нМ) и [^3H]дигоксина (1 нМ) характеризуется насыщаемостью (выход на плато через 90 и 70 мин для буферов А и Р соответственно), обратимостью и пропорционально концентрации ткани в пробе содержит до 20 мг/мл для буфера А и до 4 мг/мл для буфера Р. Неспецифическое связывание для [^3H]уабаина составляло 2—4% и для [^3H]дигоксина до 18% от общего связывания. Кипячение мембран в течение 5 мин устраняло специфическое связывание обоих лигандов. Таким образом, описанные условия позволяют выявить центры специфического связывания сердечных гликозидов на мембранах нервных клеток.

Результаты и обсуждение

Специфическое связывание [^3H]уабаина и [^3H]дигоксина в буфере Р было в 4—6 раз больше, чем при использовании буфера А. Необходимо отметить, что специфическое связывание в буфере А является обратимым только в присутствии аскорбата. В отсутствие АТФ (буфер А) или фосфата (буфер Р) специфическое связывание не выявляется. Внесение в буфер Р NaCl в концентрациях 15 и 150 мМ (характерных для внутри- и внеклеточной среды) ингибирует специфическое связыва-

ние [^3H] убаина (1 нМ) на 40 и 95% соответственно. Аналогичным образом «К»Cl в концентрациях 150 и 4 мМ (внутри- и внеклеточная среда) ингибировал специфическое связывание [^3H] убаина на 96 и 90%.

Для оценки величины K_d и концентрации мест связывания (B_{max}) [^3H] убаина определяли специфическое связывание при 5—6 разных концентрациях лиганда в диапазоне 1—40 нМ. Полученные данные представляли в координатах Скотчарда и обсчитывали методом линейной регрессии. При использовании буфера Р и концентрации ткани в пробе 0,5 мг/мл на мембранах клеток мозга быка были выявлены высокоаффинные места связывания [^3H] убаина с $K_d = 5,4 \pm 1,1$ нМ и $B_{max} = 2120 \pm 320$ пМ/г исходной ткани (коэффициент корреляции 0,93, рис.1). Обращает на себя внимание исключительно высокая плотность мест связывания убаина в коре мозга как по сравнению с концентрацией рецепторов нейромедиаторов в мозгу (обычно до 200—300 пМ/г ткани), так и по сравнению с содержанием мест связывания убаина в других органах, например, в сердце (300 пМ/г ткани) [3].

При инкубации мембран мозга в буфере А не было выявлено насыщения центров специфического связывания убаина (снижение отношения величины специфического связывания к концентрации лиганда) в концентрациях до 40 нМ. Таким образом, сродство центров связывания убаина в буфере А значительно (на 1—2 порядка) ниже, чем в буфере Р. Причиной данного различия мог бы быть гидролиз АТФ при инкубации мембран в условиях буфера А, например, под действием Mg-АТФазы. Однако в контрольных экспериментах показано, что внесение АТФ в инкубационную среду тремя порциями, каждая до конечной концентрации 1 мМ, на 0, 30, 70 мин опыта, а также повторное внесение АТФ на 60 мин до конечной концентрации 6 мМ не влияют на величину специфичес-

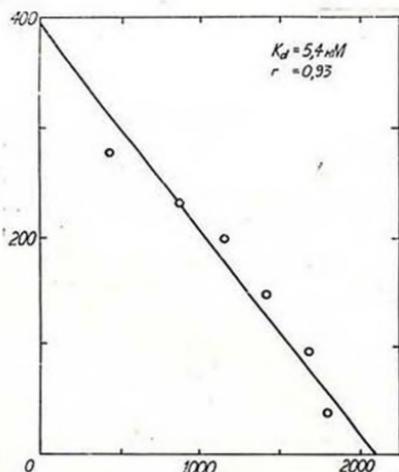


Рис.1. Сатурационный анализ специфического связывания [^3H] убаина с мембранами мозга быка. Данные получены при концентрации ткани в пробе 0,5 мг/мл для диапазона концентраций [^3H] убаина 1—40 нМ в буфере Р. По оси абсцисс—величина специфического связывания (SB) [^3H] убаина в пМ/г исходного веса ткани, по оси ординат—отношение величины специфического связывания (SB) и пМ/г ткани к концентрации свободного лиганда в инкубационной среде в нМ (С)

кого связывания [^3H]уабаина в буфере А. Другими причинами снижения сродства участков связывания [^3H]уабаина в условиях буфера А по сравнению с буфером Р может быть влияние ионов натрия (данные настоящей работы, [3]), а также аскорбата [3].

В предварительных экспериментах было показано, что водные экстракты из печени, почек, селезенки, сердца и мозга быка, приготовленные как описано ранее [9], ингибируют специфическое связывание [^3H]уабаина (1 нМ) на 80% и более в дозах, соответствующих 50—100 мг исходной ткани. При этом кипячение экстракта снижало ингибиторную активность не более чем на 20%. Однако такие экстракты содержат ряд высокомолекулярных соединений, способных сорбировать как уабаин, так и эндогенный ингибитор и в значительной степени ингибируют неспецифическое связывание [^3H]уабаина. Для очистки эндогенного ингибитора связывания уабаина (ИСУ) навеску ткани коры мозга быка гомогенизировали в 10 объемах 2 М уксусной кислоты, кипятили 10 мин, центрифугировали 15 мин при 10000 г, осадок отбрасывали, супернатант выпаривали под вакуумом. Полученный сухой остаток растворяли в минимальном количестве 20 мМ НEPES-NaOH (pH 7,2) и наносили на колонку Biogel P6-DG («Biorad», США) размером 2,5×15 см. Колонку элюировали тем же буфером со скоростью 10 мл (рис.2). Фракции, содержащие ИСУ, объединяли, лиофилизировали, растворяли в минимальном количестве воды и наносили на колонку Sephadex G-15 («Pharmacia», Швеция) размером 1,5×50 см, которую элюировали водой со скоростью 20 мл. Фракции, содержащие ИСУ (рис.3), объединяли. Выделенный описанным выше образом ИСУ ингибирует специфическое связывание [^3H]уабаина и [^3H]дигоксина с мембранами мозга быка в обоих типах использованных буферов, однако не влияет на специфическое связывание [^3H]флуни-разепама (1 нМ), которое определяли, как описано ранее [8,9].

Для оценки величины M_r ингибитора использовали метод ультрафильтрации, при этом ИСУ свободно проходил через ультрафильтры с пропускной способностью 1000 Д и выше. Вместе с тем, ультрафильтр UM-0,5 («Amicon», США) с границей пропускания 500 Д задерживал ИСУ на 80±20%. Эти данные свидетельствуют, что M_r ингибитора находится в диапазоне 500—1000 Д и указывают на его возможную гетерогенность (присутствие низкомолекулярного компонента), что подтверждается результатами, полученными при гель-хроматографии (рис.3).

Интересно отметить, что описанный в работе Akagawa и соавт. [10] ингибитор Na^+ , K^+ -АТФазы и связывания уабаина был, как и ИСУ, не гомогенен: по данным ТСХ ингибирующая активность выявлялась, как минимум, в двух фракциях. Ингибитор был устойчив к действию трипсина и лейцинаминопептидазы, однако обработка карбоксипептидазой А вызывала значительную потерю активности, что позволило авторам отнести его к соединениям пептидной природы [10]. Вместе с тем, другой

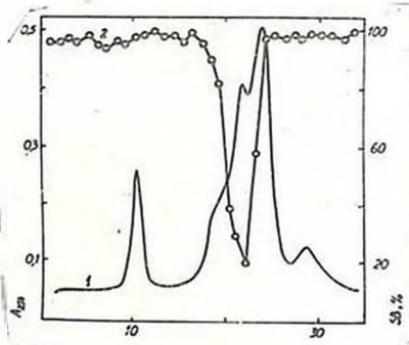


Рис.2. Гель-хроматография кислотно-метанольного экстракта коры мозга быка на колонке 2,5×15 Biogel P6-DG. По оси абсцисс—номер фракции, по оси ординат: 1—поглощение при 254 нм, 2—специфическое связывание (SB) $[^3\text{H}]$ уабана (1 нМ) в буфере А в присутствии аликвоты элюата из данной фракции, в % от контроля

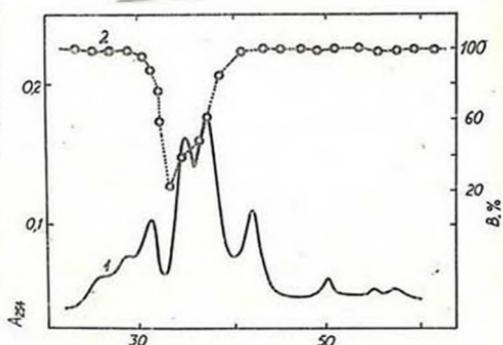


Рис.3. Гель-хроматография на колонке 1,5×50 см Sephadex G-15 ингибитора связывания уабина из мозга быка. По оси абсцисс—номер фракции, по оси ординат: 1—поглощение при 254 нм, 2—специфическое связывание (SB) $[^3\text{H}]$ уабина (1нМ) в буфере Р в присутствии аликвоты элюата из данной фракции, в % от контроля

фактор, ингибирующий активность Na^+, K^+ -АТФазы и связывание уабина, также выделенный из гипоталамуса быка [11,14], по-видимому, не является пептидом, так как устойчив к 24-часовому гидролизу в 6 М HCl при 110° . Вопрос об идентичности описанного в настоящей работе ИСУ с ингибирующим фактором [11,14] в настоящее время остается открытым. Можно отметить, что предварительные данные свидетельствуют об устойчивости ИСУ к обработке протеиназой К (500 ЕД/мл, 37° , 1 ч). В то же время ингибитор Na^+, K^+ -АТФазы и связывания уабина, описанный Akagawa, как можно предположить на основании сравнения результатов хроматографии на Sephadex G-15, не идентичен ИСУ. Пик активности данного ингибитора соответствует мертвому объему колонки (элюируется одновременно с KCl) [10], в то время как ИСУ выходит в значительно более «ранних» фракциях (рис.3).

Рассмотренные результаты свидетельствуют о наличии в мозговой ткани нескольких соединений, способных ингибировать специфическое связывание уабина. К их числу можно отнести также некоторые ненасыщенные жирные кислоты (арахидоновая, эйкозопентаеновая и др.) и такие двухвалентные катионы, как $\text{Hg}^{2+}, \text{Cu}^{2+}, \text{Zn}^{2+}$ [12,15].

Выяснение роли каждого из них в регуляции активности Na^+, K^+ -АТФазы *in vitro* является задачей дальнейших исследований.

ENDOGENOUS INHIBITOR OF THE SPECIFIC [³H]-OUABAIN BINDING WITH BOVINE BRAIN

Na⁺ . K⁺ -ATPase

*Korneyev A.Ya., Levitsky Yu.A.,
Brusovanik V.I.

*Institute of Pharmacology, Academy of Medical
Sciences, Moscow*

We used the radioreceptor technique to study the ATP/phosphate-dependent binding of the [³H]-ouabain to Na,K-ATPase from the bovine brain. In the presence of phosphate specific binding sites for [³H]-ouabain have K_d 5,1 nM and B_{max} 2120 pmoles/g tissue. An endogenous inhibitor of the specific [³H]-ouabain binding (molecular weight 500—1000 D) was isolated from the bovine brain and partially purified by acid/methanol extraction and gel-chromatography.

ЛИТЕРАТУРА

1. Болдырев А.А. Биологические мембраны и транспорт ионов, М., МГУ, 1985.
2. Болдырев А.А., Мельгунов В.И.—В кн.: Na⁺,K⁺-АТРаза -АТРаза и ее биологическое значение. Итоги науки и техники, сер.Биофизика, т.17, с.5—120, М., ВИНТИ, 1985.
3. Erdman E. Handbook of Experimental Pharmacology, v.56, N1, p.337—380, Berlin, Springer Verlag, 1981.
4. Deth R., Smart J., Lynch C., Walsh R. Eur.J.Pharmacol., v.99, p.44—45, 1984.
5. Valdes R. Clin.Chem., v.31, N9, p.1525—1532, 1985.
6. Wilkins M.R. Trends Pharmacol.Sci., v.6, p.286—288, 1985.
7. La Bella F.S. Federat.Proc., v.44, p.2780—2781, 1985.
8. Korneyev A.Ya., Belonogoff O.B., Zuzin V.N. Neurosci.Lett., v.61, p.279—284, 1985.
9. Кorneyев А.Я., Фактор М.И. Бюлэксперим.биол. и мед., N7, с.64—65, 1984.
10. Akagawa K., Hara N., Ksukada Y. Neurochem., v.42, p.775—780, 1984.
11. Carilli C.T., Berne M., Cantley L.C., Hauptert G.T. J.Biol.Chem., v.260, p.1027—1031, 1985.
12. Bidard J.N., Rossi B., Renaud J.F., Lazduski M. Biochim.et biophys.acta, v.769, p.245—252, 1984.
13. Лопина О.Д., Стецюк Н.У., Коглобай А.А. Укр.биохим.журн., т.58, с.74—85, 1986.
14. Hauptert G.T. Hypertension, v.10, N5/2, p.161—167, 1987.
15. Cloix J.-F. Hipertension, v.10, N5/2, p.167—171, 1987.
16. Kelly R.A. Hypertension, v.10, N5/2, p.187—193, 1987.

Поступила 25.02.1988

УДК 547.963

ВЫДЕЛЕНИЕ И СВОЙСТВА ЯДЕРНОЙ Ca²⁺-КАЛЬМОДУЛИНЗАВИСИМОЙ ПРОТЕИНКИНАЗЫ II ИЗ МОЗГА КРЫС

Каландадзе И.В., Дзнеладзе Д.Т., Микеладзе Д.Г.

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

Ca²⁺-кальмодулинзависимая протеинкиназа II была выделена из нуклеоплазмы мозга крыс. С помощью хроматографирования ядерного экстракта на ионообменных колонках ДЭАЭ-ц и Моно-Q, аффинной хроматографии на кальмодулин-сефарозе и гель-фильтрации на ультрагеле АсА-34 был получен высокоочищенный препарат Ca²⁺-кальмодулинзависимой протеинкиназы II. По сравнению с ядерным экстрактом получена 600-кратная очистка приблизительно с 7%-ным выходом и с активностью 0,5 мкмоль в мин/мг белка.

Гель-фильтрационный анализ показал, что фермент является олигомером с M, 480000, тогда как электрофоретический анализ этого белка выявил, что фермент состоит из 2 субъединиц с 62 и 53 кД соответственно.

Была изучена субстратная специфичность Ca²⁺-кальмодулинзависимой протеинкиназы. Показано, что фермент с высокой скоростью фосфорилирует как кислые, так и основные белки. Хорошими субстратами являются гистоны, тубулин, основной белок миелина и др. Было также выяснено, что по сравнению с кальмодулином другие регуляторы (спермидин, сАМР, фосфатидилсерин и т.д.) не влияют на активность этой протеинкиназы.

* * *

Ионы кальция играют ведущую роль в функциональной активности нервной ткани. В нейронах они выполняют функцию внутриклеточного посредника и контролируют важнейшие процессы [1] посредством мультифункционального белка кальмодулина [2]. Множество из этих эффектов Ca²⁺-кальмодулиновый комплекс осуществляет через фосфорилирование [3]. В разных лабораториях мира были идентифицированы различные типы Ca²⁺-кальмодулинзависимых протеинкиназ: киназа легкой цепи миозина [4], киназа фосфорилазы [5], NAD-киназа [6], Ca²⁺-кальмодулинзависимых протеинкиназа I, фосфорилирующая синапсин I [7], Ca²⁺-кальмодулинзависимая протеинкиназа III, специфически фосфорилирующая белок с M, 100 кД [8] и Ca²⁺-кальмодулинзависимой протеинкиназа II (Ca²⁺-CaM-зависимая ПК II). Последняя фосфорилирует синапсин, MAP-2, тубулин и другие белки [9,10]. Фермент существует как в связанной с мембранами, так и в растворимой форме. В последнее время в литературе появились данные, свидетельствующие о том, что растворимая Ca²⁺-CaM-зависимой ПК может либо связаться с тубулином

и включаться в цитоскелетный комплекс, либо находится в свободной форме [11].

Ранее нами было показано существование Ca^{2+} -CaM-зависимой ПК в ядрах нервной клетки, фосфорилирующей гистоны и имеющую большую величину M_r [12]. В настоящей работе описывается очистка этого фермента и показана его идентичность с Ca^{2+} -CaM-зависимой ПК.

Материалы и методы

Ядра выделяли по методу Chauveau и соавт. [13]. Тубулин выделяли по методу Jilson и соавт. [14], основной белок миеллина по методу Chau и соавт. [15], а легкую цепь миозина по методу Matsuda и соавт. [16]. Кальмодулин получали с помощью аффинной колонки трифторперазин-сефарозы по методу Lin и соавт. [17], трифторперазин-сефарозу синтезировали по методу Charbonneau и Cormier [18], кальмодулин связывали с сефарозой 4В по методу Niggly [19]. Белок определяли по методу Bradford [20].

Протеинкиназную активность определяли в 200 мл среды, содержащей 50 мМ трис-НСl, рН 7,5, 10 мкМ CaCl_2 , 2 мМ MgCl_2 , 25 мк $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ($2\text{--}5 \cdot 10^6$ имп/мин в пробе), 0,6 мг/мл суммарного гистона (или других субстратов), 2—5 мкг кальмодулина (или других активаторов), 0,5—20 мкг белка.

Инкубацию проводили при 30° в течение 15 мин в водяной бане при непрерывном встряхивании. Реакцию начинали добавлением фермента и останавливали добавлением ТХУ (конечная концентрация ТХУ 25%). Смесь выстаивали в течение 10 мин и фильтровали на фильтрах Whatman 3 ММ (диаметр 24 мм) и промывали 15 мл 5%-ным раствором ТХУ, содержащим 5 мМ $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 5 мМ NaH_2PO_4 , 5 мМ Na_2WO_4 , после этого 1 мл этанола. Радиоактивность считали в толуольном сцинтиллаторе на жидкостно-сцинтилляционном счетчике SL-4000 «Interteknik» (Франция). За единицу активности принимали количество ^{32}P , включенного в субстрат за 15 мин в стандартных условиях определения фосфотрансферной реакции.

В работе были использованы следующие реактивы: трис, АТФ, сАМР и сGMP («Reanal», Венгрия), казеин, спермидин, фосфатидилсерин и фосфатидилхолин («Serva», ФРГ), суммарный гистон («Ciech», Польша), ФМСФ (фенилметилсульфотрифтормид), фракции гистонов Н1, Н2а, Н2в, Н3 («Sigma», США), гель-фильтрационную колонку калибровали набором стандартных белков MS-II («Serva», ФРГ).

Результаты и обсуждение

Экстракция ядерной протеинкиназы. Мозг животных (1,2 г каждый) выделяли, немедленно гомогенизировали в тefлоновом гомогенизаторе Поттера со скоростью 900 об/мин в 4 объемах 2,1 М сахарозы, 3 мМ $MgCl_2$, 0,2 мМ ФМСФ. После фильтрования через марлю ядра осаждали на 20000g в течение 40 мин. Изолированные ядра суспендировали в 0,3 М сахарозе, 3 мМ $MgCl_2$, 0,2 мМ ФМСФ, 20 трис-НСl, рН 7,5 и затем добавляли 1/4 объема 1,7 М NaCl, 15 мМ $MgCl_2$, 100 мМ трис-НСl рН 7,5, 25 мМ 2-меркаптоэтанол, 1 мМ ФМСФ до конечной концентрации NaCl, равной 0,35 М. После перемешивания в течение 30 мин при 4° смесь центрифугировали при 60000 g 30 мин и супернатант диализовали против 10 мМ трис-НСl, рН 7,5, 0,2 мМ ФМСФ, 0,05 мМ ЭГТА (буфер А).

Хроматография на ДЭАЭ-ц. Ядерный экстракт наносили на колонку (1,2×30 см), предварительно уравновешенную буфером А. Колонку промывали одним объемом буфера А и создавали линейный градиент 0-0,4М NaCl в буфере А. Фракцию, содержащую Ca^{2+} -СаМ-зависимую ПК активность, собирали и диализовали против 10 мМ Na^+ -ацетатного буфера рН 6,5 (буфер Б) в течение ночи.

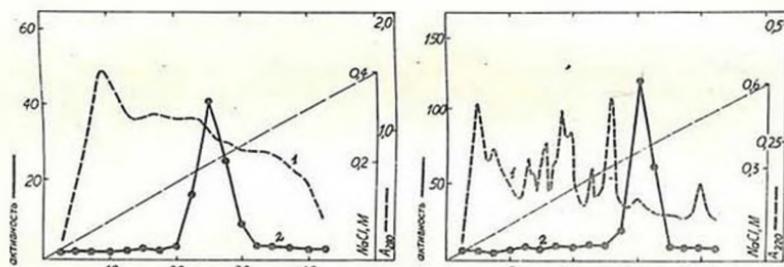


Рис.1. Хроматографирование белков 0,4 М NaCl-ядерного экстракта на ДЭАЭ-ц. 1—поглощение при 280 нм, 2—протеинкиназная активность (нмоль/мин/мл)

Рис.2. Хроматография высокого давления белков, полученных после ДЭАЭ-целлюлозной колонки на Моно-Q. 1—поглощение при 220 нм, 2—протеинкиназная активность (пмоль ^{32}P /мин/ мл)

На рис.1 дана типичная картина разделения белков на ДЭАЭ-ц. Фракцию, содержащую Ca^{2+} -СаМ-зависимую ПК активность, элюировали при концентрации NaCl 0,15—0,20 М, что соответствует данным, полученным другими авторами при очистке цитозольной формы фермента [21].

Хроматография высокого разрешения на Моно-Q. Диализат наносили на колонку Моно-Q («Pharmacia», Швеция) с помощью 10 мл суперпетли. Колонка предварительно была уравновешена буфером Б. Колонку

промывали 5 мл буфера Б и элюировали 20 мл линейного градиента 0—0,6 М NaCl в буфере Б со скоростью 1 мл в мин. Фракцию, содержащую протеинкиназную активность, собирали и диализировали против буфера, содержащего 0,2 мМ CaCl₂, 50 мМ NaCl, 1 мМ MgCl₂, 40 мМ трис-НCl, рН 7,5 (буфер С), с 2-кратной его заменой.

На рис.2 дан профиль элюции с колонки Моно-Q. Элюирование Ca²⁺-СаМ-зависимой ПК с колонки происходило при концентрации NaCl 0,3—0,35 М.

Аффинная хроматография на СаМ-сефарозе. Элюаты с Моно-Q, содержащие фосфотрансферазную активность, для дальнейшей очистки наносили на аффинную колонку кальмодулин-сефарозы (1×2 см), уравновешенную буфером С. Затем колонку промывали до тех пор, пока поглощение при 220 нм не опускалось до базовой линии. Ферментативно активную фракцию элюировали с колонки 1 мМ ЭГТА, 200 мМ NaCl, 1 мМ MgCl₂, 40 мМ трис-НCl, рН 7,5, собирали и концентрировали на ультрафильтрационной ячейке «Атисоп» (США) с использованием фильтра РМ-10 (рис.3).

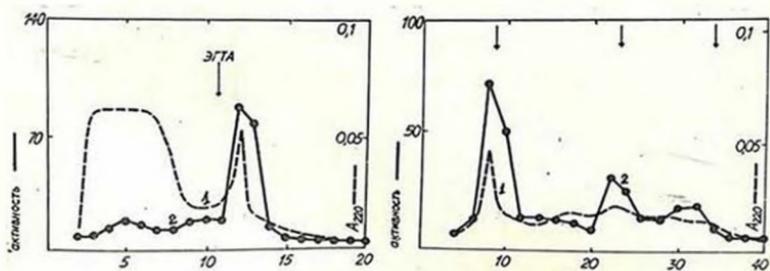


Рис.3. Хроматографирование Ca²⁺-кальмодулинзависимой протеинкиназы на колонке кальмодулин-сефарозы. 1—поглощение при 220 нм, 2—протеинкиназная активность (пмоль ³²Р/мин/мл)

Рис.4. Гель-фильтрация кальмодулинсвязывающих белков на Ультрагеле АсА-34. 1—поглощение при 220 нм, 2—протеинкиназная активность

Klee, Newton выдвинули предположение о возможной взаимосвязи кальмодулинсвязывающих белков [22]. Эти белки в больших количествах присутствуют в мозгу и взаимодействуют друг с другом, образуя сложные мультиферментативные комплексы, которые совместно очищаются на ионообменных колонках и СаМ-сефарозе. Исходя из вышесказанного, дальнейшую очистку Ca²⁺-СаМ-зависимой ПК проводили на гель-фильтрационной колонке Ультрагеля АсА-34. Для этого очищенную на СаМ-сефарозе фракцию наносили на колонку Ультрагеля АсА-34 (0,9×30 см) «LKB» (Швеция), уравновешенную 50 мМ NaCl, 50 мМ трис-НCl, рН 7,5. Элюирование проводили тем же буфером со скоростью 4 мл в ч. Колонку

стандартизировали набором MS-11. В элюатах измеряли Ca^{2+} -зависимую ПК активность.

Следует отметить, что на всех стадиях очистки Ca^{2+} -СаМ-зависимой ПК сопутствовала и сАМР-зависимая протеинкиназная активность. Эти ферменты элюировали вместе с ДЭАЭ-целлюлозной колонки, с колонки Моно-Q и аффинной колонки СаМ-сефарозы, и лишь после экспозиции этого мультиферментного комплекса с ЭГТА отдельные ферменты разделяли по величине М, с помощью гель-фильтрации на Ультрагеле АсА-34. Как видно из рис.4, протеинкиназная активность выходит в виде двух пиков. Первый из них соответствует белку с М, 480 кД, а второй—180 кД. Чувствительность к кальмодулину проявляла лишь первая фракция протеинкиназы, а вторая активировалась сАМР.

Электрофорез 480 кД белка в ДДС-На ПААГ показал наличие двух фракций с М, 63 кД и 52 кД (рис.5).

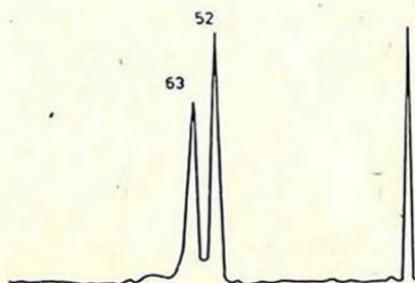


Рис.5. Электрофореграмма и денситограмма 480 кД белка в ДДС-На ПААГ

В последнее время Ca^{2+} -СаМ-зависимая ПК выделена из мозга разными исследователями [23—25]; показано, что величина М, холофермента колеблется от 460 до 650 кД и содержит по два белка с М, 50 и 60 кД. Полученный нами препарат фермента как по величине М, так и по субъединичному составу идентичен препаратам, полученным другими авторами.

Полученная с Ультрагеля АсА-34 Ca^{2+} -СаМ-зависимая ПК была очищена по сравнению с ядерным экстрактом в 600 раз с общим выходом 7% (табл.1). Очищенный фермент имел активность в пределах 0,5 мкмоль в мин/мг белка. Полученные результаты свидетельствуют, что этот фермент в мозгу, в частности в ядрах клеток мозга, имеется в большом количестве, поскольку лишь 500—600-кратная очистка необходима для получения его в гомогенном состоянии.

Таблица 1

Суммирующая таблица очистки ядерной Ca^{2+} -кальмодулинзависимой протеникиназы

| Стадии очистки | Общий белок (мг) | Общая активность (нмоль в мин) | У. А. (нмоль в мин на мг белка) | Степень очистки | Выход (%) |
|--|------------------|--------------------------------|---------------------------------|-----------------|-----------|
| 1. 0,35 М NaCl ядерный экстракт | 55 | 51,2 | 0,93 | 1 | 100 |
| 2. Хроматографирование на ДЭАЭ-ц | 3,5 | 11,5 | 3,28 | 3,5 | 23 |
| 3. Хроматографирование на Моно-Q | 0,055 | 8,36 | 152 | 163 | 16 |
| 4. Хроматографирование на кальмодулин-сефарозе | 0,022 | 6,0 | 273 | 293 | 11 |
| 5. Гель-фильтрация на Ультрагеле АсА-34 | 0,007 | 3,64 | 520 | 559 | 7 |

Примечание. Очистку проводили из 60-70 г мозга крыс.

Таблица 2

Субстратная специфичность Ca^{2+} -кальмодулинзависимой протеникиназы

| Субстраты | Протеникиназная активность (%) |
|---|--------------------------------|
| 1. Тотальный гистон | 100 |
| 2. Гистон H1 | 142 |
| 3. Гистон H3 | 112 |
| 4. Основной белок миелина | 223 |
| 5. Тубулин | 194 |
| 6. Регулярная субъединица сАМР-зависимой ПК | 214 |
| 7. Казеин | 85 |
| 8. Легкая цепь миозина | 75 |
| 9. Протамин | 95 |
| 10. Контроль | 21 |

Примечание. В опытах использовали субстратные белки в концентрации 100 мкг/мл.

Выше было отмечено, что препараты Ca - CaM -зависимой ПК, полученные разными авторами, состоят из двух субъединиц с M_r 60 и 50 кД. Несмотря на то, что эти ферменты являются идентичными и представляют собой семейство одной протеникиназы, они проявляют разную субстратную специфичность и фосфорилируют множество разнообразных белков. Нами была изучена субстратная специфичность выделенного фермента (табл.2). Наиболее высокую активность фермент проявляет к тубулину, основному белку миеллина, к гистонам. Кроме того, он хорошо фосфорилирует казеин,

легкую цепь миозина, протамина. Фермент не активируется ни сАМР, ни сGMP, ни полиаминами, ни фосфолипидами. На скорость реакции не влияют РНК и ДНК (табл.3).

Таблица 3

Зависимость Ca^{2+} -кальмодулинзависимой активности от различных регуляторов

| Добавки | Протеинкиназная активность (%) |
|---------------------------|--------------------------------|
| контроль | 28 |
| + 250 нМ кальмодулина | 100 |
| + 10 мкМ спермидина | 25 |
| + 10 мкМ сАМР | 32 |
| + 10 мкМ сGMP | 29 |
| + 10 мкМ фосфатидилхолина | 42 |
| + 10 мкМ фосфатидилсерина | 38 |
| + 25 мкг/мл ДНК | 20 |
| + 25 мкг/мл РНК | 24 |

Примечание. За 100% активности принимали включение [^{32}P] в 10 мкг тотального гистона, катализировавшегося ферментом в присутствии 250 нМ кальмодулина — 475 нмоль/мин/мг.

Таким образом, из нуклеоплазмы нейронов мозга выделена свободная от цитоскелетных белков Ca^{2+} -CaM-зависимая ПК, близкая по своим каталитическим и физико-химическим свойствам цитоплазматическому ферменту. Учитывая, что Ca^{2+} -CaM-зависимая ПК обнаруживается также и в ядерном матриксе [26], можно предположить, что в ядрах, так же как и в цитоплазме, существуют две формы этого фермента: связанная с цитоскелетом и свободная.

ISOLATION AND PROPERTIES OF NUKLEAR Ca^{2+} -KALMODULIN-DEPENDENT PROTEINKINASE II FROM RAT BRAIN

Kalandadze I.V., Dzneladze D.T., Mikeladze D.G.

*Bertashvili Institute of Physiology,
Academy of Sciences of the Georgian SSR, Tbilisi*

Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase II was isolated from the soluble fraction of rat brain nuclei. Purification was achieved by chromatography of the nuclear extract on DEAE-cellulose and Mono-Q columns, affinity chromatography on Calmodulin-Sepharose and gel-filtration on an Ultrogel ACA-34 column. The enzyme was purified 600-fold as compared with the crude nuclear extract, the yield being equal to 7%. The activity of the final preparation was 0,5 μ moles/min per milligram protein.

Gel-filtration of the purified material has shown that the enzyme is an oligomer with molecular weight of 480 kDa containing two subunits with molecular weights of 62 kDa and 53 kDa as shown by gel electrophoresis.

The enzyme intensively phosphorylates acidic as well as basic proteins. Histones, tubulin and myelin basic protein serve as good substrates. Spermine, cAMP and phosphatidylserine do not affect the enzyme activity.

Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase II appears to play an important role in the nerve cell chromatin.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cohen., Aitken A., Damuni Z., Nemmings B.A., Ingebritsen T.S., Parcer P.J., Picton C., Resink T., Steward A.A., Tonks N.K., Woodgett J. — In: Posttranslational covalent modification of proteins (ed. B.C. Johnson), p.19—38, Acad. Press, N-Y, 1983.
2. Means A.R., Dedman J.R. Mol. and Cell. Endocrin., v.19, p.215—227, 1980.
3. Schulman H., Greengard P. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci., v.75, p.5432—5436, 1978.
4. Dabrowski R., Sherry J.M.F., Aromatorio D.K., Hartshorne D.J. Biochemistry, v.17; p.253—258; 1978.
5. Cohen P., Burchell A., Foulkes J.G., Cohen P.T.W., Vanaman T.C., Nairn A.C. FEBS Lett., v.92, p.287—293, 1978.
6. Anderson J.M., Cormier M.J. Biochem. Biophys. Res. Commun., v.84, p.595—602, 1978.
7. Hutner W.B., Schiebler W., Greengard P., De Camilli P., J. Cell. Biol., v.96, p.1374—1381, 1983.
8. Nairn A.C., Bhagat B., Palfrey H.C. Proc. Nat. Acad. Sci. USA., Biol. Sci., v.82, p.7939—7943, 1985.
9. Fukunaga K., Yamamoto H., Matsui K., Higashi K., Miyamoto E. J. Neurochem., v.39, p.1607—1617, 1982.
10. Yamauchi I., Fujisawa H. Eur. J. Biochem., v.132, p.15—21, 1983.
11. Le Vine III H., Sahyoun N.E. Brain Res., v.439, p.47—55, 1988.
12. Калайдадзе И.В., Михеладзе Д.Г., Фрайкина Т.Я. Известия АН ГССР, т.10, N 1, с.44—48, 1984.
13. Chaveau J., Moule Y., Rouller Exp. Cell Res., v.11, p.317—321, 1956.
14. Jilson J., Creswell K., Chin D. J. Biochem., v.14, p.5586—5592, 1975.
15. Chau F.S., Chou J., Shapita R., Kibles R.F. J. Biol. Chem., v.251, p.2671—2679, 1976.
16. Matsuda G., Suzuyama Y., Maita T., Umegane T. FEBS Lett., v.19, p.215—227, 1977.
17. Lin Y.M., Liu Y.P., Cheung W.Y. J. Biol. Chem., v.249, p.4943—4952, 1974.
18. Charbonneau H., Cormier M.J. Biochem. Biophys. Res. Commun., v.90, p.1039—1047, 1979.
19. Niggli V., Pennison J.T., Carafoli E.J. J. Biol. Chem., v.254, p.9955—9958, 1979.
20. Bradford M.M. Anal. Biochem., v.72, p.248—254, 1976.
21. Miyamoto E., Fukunaga K., Matsui K., Iwasa Y. J. Neurochem., v.37, N 5, p.1324—1330, 1981.
22. Klee C.W., Newton D.L. — In: Posttranslational covalent modifications of proteins (ed. B.C. Johnson), p.61—83, Acad. Press, N—Y, 1983.
23. Bennet M.K., Eroni N.F., Kennedi M.B. J. Biol. Chem., v.258, p.12735—12741, 1983.
24. Lou L.L., Lloyd S.J., Schulman H. Proc. Nat. Acad. Sci., USA, Biol. Sci., v.83, p.9497—9501, 1986.
25. Kuret C.W., Schulman H. Biochemistry, v.23, p.5495—5504, 1984.
26. Sahyoun N., Le Vine III H., Cuatrecasas P. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci., v.81, p.4311—4315, 1984.

Поступила 20.01.1989

УДК 577.152.311+547.937.577.112.823

ВЛИЯНИЕ БИЛИРУБИНА И СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА НА АКТИВНОСТЬ АХЭ В СИНАПСОСМНОЙ МЕМБРАНЕ

Ткаченко А.В.

Институт биологической физики АН СССР, Пуцзино

Спектр поглощения света, характерный для находящегося в водной среде свободного билирубина с единственным максимумом при 440 нм и плечом в области 410—420 нм, при связывании пигмента синапсомной мембраной *in vitro* преобразуется в спектр с двумя последовательно возникающими в ходе спектрофотометрического титрования максимумами в области 460 и 500 нм. Обнаружили два типа центров связывания билирубина в мембранных частицах, отличающихся друг от друга величиной константы ассоциации (для центров этих двух типов константа ассоциации составляет соответственно $0,6 \cdot 10^5$ и $0,2 \cdot 10^5 \text{M}^{-1}$) и максимальным количеством связываемого ими билидиена (в расчете на общее количество мембранных белков соответственно 5,0 и 7,0 нмоль/мг). Возникновение максимума в области 460 нм какими-либо изменениями У.А. мембранной АХЭ не сопровождается. Возникновение максимума в области 500 нм сопровождается небольшим уменьшением активности фермента. Уменьшение активности АХЭ при инкубации частиц синапсомной мембраны в присутствии билирубина в темноте (рН 7,2 при 10°) происходит в течение 2—2,5 ч. Более быстрое и более значительное понижение У.А. мембранной эстеразы вызывает облучение суспензии мембранных частиц синим светом (λ_{max} 450—460 нм) в присутствии билирубина (рН 7,2 при 10°). Существенное влияние на изменение активности синапсомной АХЭ при указанном облучении оказывает добавление сывороточного альбумина в инкубационную среду. Интенсивность и направленность этого влияния зависят от некоторых особенностей химического состава используемого препарата сывороточного белка и от водородного показателя среды.

* * *

Билирубиновая энцефалопатия при желтухе недоношенных новорожденных детей связана с накоплением билирубина (БР) в головном мозгу, в частности в его базальных ганглиях, содержащих сравнительно высокую концентрацию АХ [1] и обладающих сравнительно высокой активностью АХЭ [2]. Накопление билидиена в мозгу сопровождается повреждением нервных клеток. Применяемая при желтухе недоношенных новорожденных фототерапия [3] нередко оказывается причиной возникновения у детей серьезных осложнений [4], некоторые из которых свидетельствуют о происходящих при фотолечении функциональных нарушениях в НС, охватывающих, в частности, холинергические механизмы внешней секреции. В связи с этим задача данного исследования заключалась в изучении активности АХЭ в синапсомной мембране (СМ) при связывании БР плазматической мембраной изолированных нервных окончаний и при

имитации фототерапевтического воздействия *in vitro* облучением видимым светом содержащих желчный пигмент мембранных частиц. Кроме того, изучали влияние на активность АХЭ в содержащей билидиен нейрональной мембране сывороточного альбумина, который *in vivo* служит основным транспортером БР в системе циркуляции, причем связывание БР альбумином так же, как и связывание пигмента частицами СМ *in vitro*, зависит от водородного показателя среды [5].

Материалы и методы

В опытах использовали крыс-самцов линии *Wistar* массой 180—200 г. Методы получения фракции СМ из гомогената головного мозга животных в 0,32 М сахарозе, определения общего содержания мембранных белков в получаемых препаратах, количественного определения сывороточного альбумина, контроля за чистотой использованных препаратов БР («Реахим», СССР или «Reanal», Венгрия), выделения нужного для работ IX α -изомера желчного пигмента и приготовления водных растворов этого изомера, а также методы спектрофотометрического титрования растворов БР суспензией мембранных частиц в видимой области спектра и получения препаратов СМ, содержащей связанный ею БР, описаны ранее [5]. Сывороточный альбумин человека (САЧ), полученный в Центральном институте гематологии и переливания крови МЗ СССР (Москва), очищали от связанных им высших жирных кислот и прочих органотфильных лигандов [6]. Контрольные определения, проводимые экстракционным методом [7], колориметрическим методом [8] и методом ТСХ [9] на пластинах «Silufol» («Cavalier», ЧССР) с проявлением хроматограмм 0,25%-ным спиртовым раствором родамина 6G (50—60°) показали, что общее содержание жирных кислот в исходном препарате САЧ (неочищенного) составляло 3,8 в расчете на массу белка, а после указанной очистки не превышало 0,002 моль/моль (в эквивалентах пальмитиновой кислоты). Мономерный белок из неочищенного или очищенного САЧ получали либо химическим методом [10], либо препаративным электрофорезом в ПААГ, используя разработанную в ИБФ АН СССР модификацию камеры для вертикального фореза.

Активность АХЭ или холинэстеразы (ХЭ) в препаратах СМ определяли по гидролизу АХ, ацетил- β -метилхолина (мехолила) или бутирилхолина при инкубации мембранных частиц в растворах перечисленных соединений. Инкубационная смесь (3 мл) представляла собой $(1-3) \cdot 10^{-3}$ М йодид АХ, йодид мехолила или йодид бутирилхолина («Serva», ФРГ) в 0,05М трис-НСI буфере (рН 7,2 при 37°). В этот раствор вводили порцию суспензии частиц СМ, содержащую 600—800 мкг мембранных белков. Затем смесь инкубировали в темноте в течение 30 мин при 37°. По завершении инкубации в смесь добавляли 1 мл 25%-ного раствора ТХУ и центрифугировали (10⁵g, 30 мин, 0°). В надосадочной жидкости до и после инкубации определяли содержание АХ, мехолила или бутирилхолина

колориметрическим методом [11]. Как правило, активность ХЭ, специфическим субстратом которой в данном случае служил бутирилхолин, в препаратах СМ практически отсутствовала. Препараты мембранных частиц, в которых активность ХЭ оказывалась ощутимой, подвергали предварительной обработке 0,1 мМ диизопропилфторфосфатом в течение 5—10 мин для практически полного избирательного подавления активности этого фермента [12]. У.А. АХЭ выражали количеством (мкмоль) АХ или мехолила, служившего специфическим субстратом для данного фермента, гидролизованых в течение 1 мин инкубации в расчете на 1 мг мембранных белков.

Для имитации фототерапевтического воздействия *in vitro* в стеклянную термостатированную при $10 \pm 2^\circ$ ячейку диаметром 40 мм и объемом 5 мл отмеривали 3 мл суспензии мембранных частиц (общая концентрация мембранных белков 2,8—3,0 мг/мл) в 0,9%-ном растворе NaCl на 0,1М трис-HCl буфере (рН 7,2 при 10°). Высота столба суспензии в ячейке составляла 3—4 мм. В ячейку через закрываемое отверстие в крышке диаметром 2 мм добавляли 1 мл 10^{-4} М БР в 0,9%-ном растворе NaCl на 0,1 М трис-HCl буфере (рН 7,2 при 10°). Через 30 мин преинкубации постоянно перемешиваемой суспензии частиц СМ в темноте при 10° (для выравнивания температуры и связывания БР мембранными частицами) ячейку, плотно закрытую крышкой, устанавливали на алюминиевую фольгу, покрывавшую рабочую поверхность магнитной мешалки. Через отверстие в крышке отбирали порции суспензии для определения исходной активности мембранного фермента, после чего приступали к облучению постоянно перемешиваемого содержимого термостатированной ячейки. Для облучения использовали люминесцентную лампу ЛГ-40 с максимумом излучения в области 450—460 нм. Облучаемую ячейку устанавливали на расстоянии 10—15 см от источника света в постоянном потоке воздуха от вентилятора. Общая продолжительность непрерывного облучения составляла 1,5—2 ч. Через каждые 15 мин облучения из ячейки отбирали по 300—400 мкл для определения активности АХЭ, смешивая отобранные порции с упомянутой инкубационной средой.

В другой серии опытов после 30-минутной темновой преинкубации суспензии частиц СМ в присутствии БР непосредственно перед началом облучения в нее добавляли раствор САЧ в 0,9%-ном растворе NaCl на 0,1М трис-HCl буфере (рН 7,2 при 10°) до конечной концентрации 10^{-5} М. В контрольных опытах активность АХЭ в мембранных частицах определяли после 30-минутной темновой преинкубации и при последующей 2-часовой инкубации в темноте (10°) без добавления БР, после добавления БР, после добавления САЧ к интактным или к содержащим БР частицам СМ. Кроме того, в контрольных опытах определяли активность мембранной эстеразы при облучении (после 30-минутной темновой преинкубации) частиц СМ без добавления БР или после добавления САЧ без БР. Активность фермента определяли также в суспензии содержащих БР мембранных частиц после барботирования ее аргоном в течение 2 ч

в темноте.

В основной серии опытов водородный показатель инкубационной среды в ячейке составлял 7,2 (10°). В дополнительных сериях опытов перед началом облучения среду подкисляли до pH 6,8 при 10° или, напротив, подщелачивали до pH 7,8 при 10° .

Спектры поглощения измеряли на регистрирующих спектрофотометрах «Specord» (ГДР) и «Perkin-Elmer», модель 575 (США). Спектры флуоресценции измеряли на скорректированном регистрирующем спектрофлуорометре «Perkin-Elmer MPF-44B» (США). Для центрифугирования использовали угловой ротор центрифуги ЦЛР-1 (СССР) и бакет-ротор препаративной ультрацентрифуги «VAC-60» (ГДР).

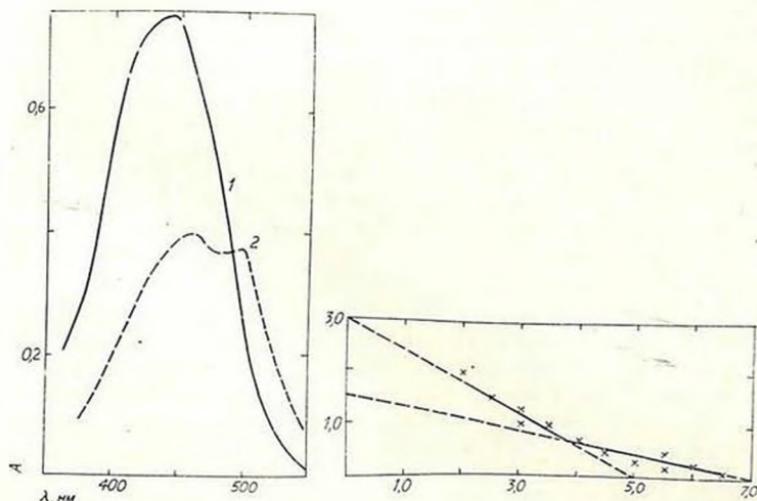


Рис. 1. Спектры поглощения света свободными (1) и связанными частицами синапсомембранной мембраны (2) билирубином в 0,9%-ном растворе NaCl на 0,1 М трис-HCl буфере (pH 7,2 при 20°). По оси абсцисс — длина волны, по оси ординат — оптическая плотность

Рис. 2. Результаты спектрометрического титрования суспензии частиц синапсомембранной мембраны раствором билирубина ($4 \cdot 10^{-5}$ М, pH 7,2 при 20°). По оси абсцисс — связанный БР (нмоль/мг белка), по оси ординат — связанный БР (нмоль/мг белка)/свободный БР $\cdot 10^{-5}$ М

Результаты экспериментов обрабатывали статистически, оценивая достоверность разницы сравниваемых средних арифметических величин с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Связывание БР частицами СМ при спектрофотометрическом титровании в видимой области спектра суспензией мембранных частиц раствора желчного пигмента в 0,9%-ном растворе NaCl на 0,1 М трис-HCl буфера (рН 7,2 при 20°) сопровождается преобразованием спектра поглощения света с единственным максимумом при 440 нм и плечом в области 410—420 нм, характерного для свободного БР в водной среде, в спектр с двумя максимумами в области 460 и 500 нм, характерный, как установлено в данном исследовании, для БР, связанного СМ (рис.1). При выражении результатов титрования (изменение весового соотношения БР и общего содержания мембранных белков в пределах от 0,02 до 1,0 при 20°, рН 7,2) в представленных на рис.2 координатах Скетчарда [13] удалось выявить 2 типа центров связывания БР. На рис.2 видно, что в центрах одного типа максимальное связывание БР мембранными частицами составляет 5,0, а в центрах второго типа—7,0 нмоль на 1 мг общего содержания мембранных белков. Величина K_d составляет соответственно $0,6 \cdot 10^5$ и $0,2 \cdot 10^5 M^{-1}$.

Связывание БР частицами СМ сопровождается небольшим усилением возбуждаемой при 430 нм флуоресценции пигмента (рис.3) с максимумом в области 530—540 нм (рН 7,2, 10°). Флуоресценция свободного БР в водной среде в указанных условиях ничтожна. При добавлении к суспензии хранившихся в течение 12—24 ч при 18—20° или при 0—7° под защитой от дневного света окрашенных билидиеном частиц СМ избытка САЧ спектр поглощения связанного мембранными частицами БР преобразуется в характерный для связанного с САЧ пигмента спектр с исчезновением упомянутого максимума в области 500 нм с сохранением максимума в области 460 нм (оптическая плотность в этой области значительно возрастает) и с небольшим плечом в области 430 нм. Интенсивность флуоресценции пигмента, «снятого» САЧ с частиц СМ значительно повышается с максимумом в области 520 нм (возбуждение флуоресценции при 430 нм). Результаты этих экспериментов позволяют считать, что связывание БР частицами СМ и хранение содержащих билидиен мембранных частиц в указанном режиме, по-видимому, не сопровождается заметными изменениями химической природы желчного пигмента.

В свежих интактных частицах СМ величина У.А. АХЭ составляла $10,1 \pm 0,3$ (по АХ) или $2,8 \pm 0,1$ (по мехолилу). После инкубации мембранных частиц без каких-либо добавок или в присутствии САЧ ($3 \cdot 10^{-5} M$) в течение 2,5 ч в темноте (рН 7,2, 10°) величина У.А. АХЭ составляла соответственно $9,7 \pm 0,4$ (по АХ) или $2,9 \pm 0,1$ (по мехолилу).

В ходе спектрофотометрического титрования при постепенном формировании упомянутого максимума в области 460 нм У.А. АХЭ в частицах СМ оставалась практически без изменений. При последующем формировании второго максимума в области 500 нм (рис.3) У.А. мембранного фермента понижалась в среднем на 1,8—2,5% ($p < 0,05$) в сравнении

с ферментной активностью в свежих интактных частицах СМ.

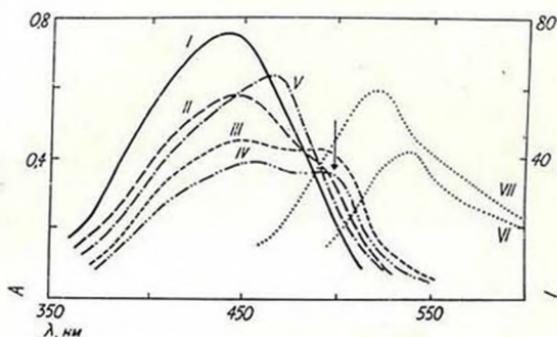


Рис.3.Спектры поглощения света и флуоресценции БР при титровании раствора билирубина суспензией частиц синапсомембраны. I-спектр поглощения $1,4 \cdot 10^{-5} \text{M}$ билирубином в 0,9%-ном растворе NaCl на 0,1 М фосфат-цитратном буфере (рН 7,2, 20°); II—IV - то же (2 мл) после добавления суспензии мембранных частиц до конечной концентрации мембранных белков в пробе соответственно 18, 45 и 315 мкг/мл (максимальное разбавление пробы в 1,05 раза); V - спектр поглощения IV после добавления 100 мкл $7 \cdot 10^{-4} \text{M}$ сывороточного альбумина человека (рН 7,2, 20°); VI - спектр флуоресценции билирубина, связанного мембранными частицами (рН 7,2, 20°); VII - то же после добавления избытка сывороточного альбумина человека. Стрелкой указан момент начала уменьшения величины У.А. АХЭ в ходе спектрофотометрического титрования. По оси абсцисс — длина волны (нм), по оси ординат слева — оптическая плотность, справа — интенсивность флуоресценции (отн.ед.)

Величина У.А. АХЭ практически не отличалась от активности фермента в свежих интактных мембранных частицах после 30 мин темновой преинкубации частиц СМ (рН 7,2, 10°), содержащих БРЗ $\cdot 10^{-5} \text{M}$). Аналогичный результат получили при 30-минутной преинкубации содержащих БР частиц СМ в присутствии САЧ ($3 \cdot 10^{-5} \text{M}$). Через 2 ч темновой инкубации содержащих билидиен мембранных частиц У.А. АХЭ оказывалась пониженной в среднем на 6—8% ($p < 0,05$). При подщелачивании среды до рН 7,2, 10° перед началом темновой инкубации в течение 2 ч (после 30-минутной преинкубации содержащих БР частиц СМ) У.А. АХЭ по завершении инкубации оказывалась пониженной в среднем на 4% ($p < 0,01$) в сравнении с ферментной активностью в свежих интактных мембранных частицах.

После облучения интактных частиц СМ без каких-либо добавок или в присутствии САЧ ($3 \cdot 10^{-5} \text{M}$) в течение 2 ч после 30-минутной темновой преинкубации У.А. АХЭ практически не отличалась от ферментной активности в свежих интактных мембранных частицах. При облучении суспен-

зии содержащих БР частиц СМ (рН 7,2, 10°) У.А. АХ в течение первых 30 мин оставалась практически без изменений, но затем понижалась и через 120 мин оказывалась пониженной в среднем на 67% ($p < 0,01$) в сравнении с ферментной активностью в свежих интактных частицах СМ (рис.4). При подщелачивании среды до рН 7,8, 10° перед началом облучения У.А. АХЭ в течение первых 30 мин также оставалась без изменений, но через 120 мин облучения оказывалась пониженной в среднем на 48—52% ($p < 0,01$). У.А. АХЭ в содержащих БР частицах СМ через 2 ч облучения после барботирования суспензии мембранных частиц (рН 7,2, 10°) аргоном составляла $9,3 \pm 0,80$ (по АХ), то есть практически не отличалась от активности этого фермента, находимой после 30-минутной преинкубации суспензии содержащих билидген частиц СМ в темноте без предварительного барботирования и без последующего облучения.

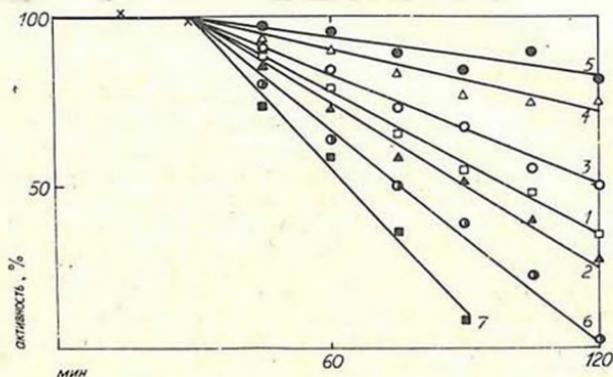


Рис.4. Изменения У.А. АХЭ в содержащих билирубин частицах синапсомной мембраны при облучении их синим светом. 1 — облучение без добавления сывороточного альбумина (рН 7,2, 10°); 2 — облучение в присутствии мономерного неочищенного сывороточного альбумина (рН 7,2, 10°); 3 — облучение без добавления сывороточного альбумина при рН 7,8 10°; 4 — облучение в присутствии мономерного неочищенного сывороточного альбумина при рН 7,8, 10°; 5 — облучение в присутствии мономерного очищенного сывороточного альбумина при рН 7,8, 10°; 6 — облучение без добавления сывороточного альбумина при рН 6,8, 10°; 7 — облучение в присутствии мономерного неочищенного сывороточного альбумина при рН 6,8, 10°. Каждая точка на графике представляет собой среднюю арифметическую величину для результатов 5—6 опытов. За 100% принята ферментная активность в свежих интактных частицах синапсомной мембраны. По оси абсцисс — время облучения (мин), по оси ординат — остаточная активность АХЭ (%)

На рис.4 видно, что падение У.А. АХЭ, вызываемое облучением содержащих БР мембранных частиц при рН 7,2, 10° в присутствии мономерного неочищенного САЧ происходило быстрее, чем это имело место при облучении без добавления САЧ. После защелачивания суспензии

содержащих желчный пигмент частиц СМ до рН 7,8, 10° (перед облучением) падение У.А. АХЭ, вызываемое облучением, в присутствии САЧ, напротив, существенно замедлялось: через 2 ч облучения при рН 7,8 в присутствии САЧ величина У.А. АХЭ составляла $7,0 \pm 0,01$ (по АХ) или $2,0 \pm 0,01$ (по мексолиду), то есть оказывалась пониженной в среднем на 25—30% ($p < 0,01$). При использовании же мономерного очищенного САЧ наблюдали более значительное, чем это имело место при использовании мономерного неочищенного САЧ, замедление вызываемого облучением содержащих БР мембранных частиц, если водородный показатель среды составлял 7,8 (10°). При рН 7,2 разница эффектов, связанная с указанной особенностью химического состава препарата сывороточного белка, также имела место, но была менее значительной, чем при рН 7,8.

Наиболее быстрое уменьшение У.А. АХЭ в содержащих билидиен частицах СМ, вызываемое облучением их синим светом, наблюдали после закисления среды (до начала облучения) до рН 6,8 (10°). В этих же условиях отмечали наиболее сильный потенцирующий эффект добавления мономерного неочищенного САЧ в отношении вызываемого падения активности мембранной эстеразы действия облучения (рис.4).

Обнаруженный при взаимодействии БР с СМ сдвиг максимума поглощения света пигментом в область 460 нм обусловлен, вероятно, внедрением билидиена в гидрофобные (возможно, липидные) участки мембраны [14—16], тогда как формирование максимума в области 500 нм обусловлено, по-видимому, димеризацией и агрегацией молекул пигмента на мембранных частицах [17].

Обнаруженное понижение активности АХЭ при этом обусловлено, быть может, накоплением билидиена в гидрофобном окружении активных центров фермента, которое, как полагают [18], представляет собой не сплошное обрамление, а отдельные включения на каталитической поверхности фермента. Не исключено, что именно этим объясняется то обстоятельство, что для заметного понижения активности АХЭ оказывается необходимым достаточно большое накопление БР, димеризация и агрегация его молекул в мембранных частицах, сопровождающиеся формированием максимума поглощения света билидиеном в области 500 нм, или достаточно продолжительная инкубация последних в присутствии желчного пигмента. Понижение активности АХЭ при взаимодействии СМ с БР в какой-то мере может быть обусловлено способностью билидиена прочно связывать такие металлы, как Mg^{2+} и Ca^{2+} , оказывающие стимулирующее влияние на активность этого фермента [19].

Добавление САЧ в инкубационную среду при темновой инкубации содержащих БР частиц СМ не устраняло подавляющего активность АХЭ действия БР, несмотря на весьма высокое сродство этого сывороточного белка к желчному пигменту (константа ассоциации 10^8 — $10^{11} M^{-1}$). Это обусловлено, возможно, тем, что полное извлечение билидиена сывороточным альбумином из частиц происходит очень медленно (в течение 1,5—2 ч)

вне зависимости от указанного высокого значения константы ассоциации [5], найденного при взаимодействии альбумина и БР в гомогенных водных растворах. Приходится, кроме того, считаться с принципиально возможным взаимодействием сывороточного альбумина с мембранными ганглиозидами [20].

Более значительное и быстрое уменьшение У.А. АХЭ, вызываемое облучением синим светом суспензии содержащих БР частиц СМ, обусловлено, вероятно, фотодинамической активностью связанного с частицами клеточной мембраны БР [4], образованием продуктов сопряженного с фотодинамической активностью желчного пигмента пероксидирования ненасыщенных мембранных липидов. Такие продукты (например, альдегиды) способны оказывать повреждающее действие на клеточную мембрану [21]. Такому толкованию полученных результатов соответствует обнаруженное в данной работе противодействие вызываемому облучением содержащих БР частиц СМ понижению активности АХЭ барботированием суспензии мембранных частиц аргоном перед началом облучения, создававшим определенный дефицит кислорода в инкубационной среде. Происходящее при фотодинамической активности БР фотоокисление пигмента представляет собой самовозбуждающийся процесс, для осуществления которого необходимо присутствие синглетного кислорода [22]. В условиях же относительного дефицита кислорода БР может функционировать в качестве антиоксиданта [23].

Оптимальный для связывания БР частицами СМ (10°) водородный показатель среды составляет 6,8—7,2 [5]. Замедление вызываемого облучением мембранных частиц, содержащих желчный пигмент, уменьшения активности АХЭ при рН 7,8, 10° (в сравнении с тем, что имело место при рН 7,2) обусловлено, возможно, высвобождением БР из мембранных частиц в окружающую их водную среду [5]. Фотодинамический эффект БР может оказывать лишь при связывании пигмента либо молекулами биополимеров, либо клеточной мембраной, тогда как свободный билидин в водной среде фотодинамического действия не оказывает [4].

Более сильное замедление падения активности АХЭ, вызываемое облучением содержащих БР частиц СМ, при добавлении мономерного очищенного САЧ или (в меньшей мере) мономерного неочищенного САЧ в суспензию мембранных частиц, подщелоченную перед началом облучения до рН 7,8 при 10° обусловлено, по-видимому, тем, что при данном водородном показателе среды высвобождение билидина из частиц СМ стимулировалось связыванием высвобождающегося пигмента добавляемым альбумином. В этих условиях, кроме того, происходило, вероятно, энергичное связывание альбумином не только БР, но и альдегидов, образующихся при упомянутом пероксидировании ненасыщенных мембранных липидов. При рН 7,8 имеет место достаточная степень депротонирования ϵ -NH₂-групп некоторых лизиновых остатков в составе САЧ, вступающих во взаимодействие с альдегидами [24]. При рН 7,2 и тем более при 6,8 степень

депротонирования таких групп оказывалась, по-видимому, недостаточной для ощутимого связывания ими продуктов перекисидирования. Поэтому, видимо, замедляющий вызываемое облучением падение активности АХЭ в содержащих БР частицах СМ эффект добавления мономерного очищения САЧ оказывался сравнительно слабым при рН 7,2 и еще более слабым при рН 6,8. Добавление мономерного неочищенного САЧ в суспензию содержащих билирубин мембранных частиц при рН 7,2 или при 6,8 даже потенцировало вызываемое облучением понижение активности АХЭ. Такой неожиданный эффект, помимо всего прочего, обусловлен, возможно, дополнительным к происходившему при облучении перекисидированию мембранных липидов перекисидированием ненасыщенных жирных кислот в составе извлекавшего какое-то количество БР из мембранных частиц неочищенного сывороточного альбумина [25] и, следовательно, более интенсивным накоплением повреждающих клеточную мембрану продуктов перекисидирования.

INFLUENCE OF BILIRUBIN AND SERUM ALBUMIN ON ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY IN SYNAPTOSOMAL MEMBRANE

Тkachenco A.V.

*Institute of Biophysics, USSR Academy of
Sciences, Pushchino, Moscow Region*

Absorption spectrum of bilirubin (BR) aqueous solution with a single maximum at 440 nm and shoulder in the 410—420 nm spectral region is transformed into a spectrum with two maxima in the 460 and 500 nm region (sequentially appearing in the process of spectrophotometric titration), when the pigment binds with synaptosomal membranes (SM) *in vitro*. Two types of BR binding centres were detected in membrane particles, which differ in K_a ($0,6 \times 10^5$ and $0,2 \times 10^5 M^{-1}$) and in binding capacity (0,5 and 0,7 nmoles per mg of total membrane protein). The appearance of maximum at 460 nm is not accompanied by any alterations of AChE specific activity, appearance of the maximum at 500 nm leads to a slight decrease in the enzyme activity. When SM particles are incubated with BR in the dark (pH₁₀ 7,2) AChE specific activity decreases during 2,0—2,5 hours. Blue light illumination of BR-containing aqueous suspension of membrane particles (λ_{max} 450—460 nm) results in a more prominent decrease in the enzyme activity. The addition of serum albumin to the incubation medium significantly affects BR-related changes in AChE activity of synaptosomes. Extent and direction of these effects depend on pH and presence of minor ligands bound to the molecule of serum albumin.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Bachelard H.S.* Brain biochemistry, p.33, Chapman and Hall, London, New York, 1981.
2. *Butcher L.L., Wolf N.J.* — In: Handbook of Chemical neuroanatomy (ed. A. Bjorklind, T. Hokfelt, M.J. Kuhar), v.3, p.33—34, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984.
3. *Далецкий С.Я., Гаариюшов В.В., Матвеев М.Ш., Аюпян В.Г., Рошаль Л.М.* Диагностика и лечение неотложных состояний у детей, М., Медицина, 1977.
4. *Мышкин А.Е., Сахаров В.Н.* Успехи химии, т.51, вып.1, с.72—91, 1982.
5. *Ткаченко А.В.* *Вопр.мед.химии*, т.33, N 6, с.74—78, 1987.
6. *Ткаченко А.В., Емельяненко В.И.* Способ очистки альбумина плазмы крови. Авторское свидетельство N 1312947 (не публ., Б.И. N19, 1987)
7. *Ткаченко А.В., Горин В.П.* Экстракт. Авторское свидетельство N 1281280.
8. *Weigel W.* Die Pharmazie, N 12, S.786—791, 1956.
9. *Moreau R.A., Huang A.H.S.* Arch. Biochem. Biophys., v.194, N2, p.422—430, 1979.
10. *Ткаченко А.В.* Способ получения мономерного альбумина плазмы крови. Авторское свидетельство № 1250301.
11. *Hestrin Sh.* J. Biol. Chem., v.180, N1, p.249—261, 1949.
12. *Brzin M., Sketilj J., Klinar W.* — In: Handbook of neurochemistry (ed. A. Lajtha), v.4, p.252, 260, 263, Plenum Press, New York, London, 1983.
13. *Frezza M., Tiribelli C., Panfili E., Sandri G.* FEBS Lett., v.38, N 2, p.125—128, 1974.
14. *Nagaoka Sh., Cowerer M.L.* J. Biol. Chem., v.253, N 6, p.2005—2011, 1978.
15. *Kashiwamata Sh., Asai M., Semba R.K.* J. Neurochem., v.36, № 3, p.826—829, 1981
16. *Nemat-Gorgani M., Meisami E.* J. Neurochem., v.32, N 3, p.1027—1032, 1979.
17. *Wolkoff A.W., Chowdhary J.R., Arias Ir.M.* — In: The metabolic basis of inherited disease (ed. J. B. Stanbury, J. B. Wyngaarden, J. L. Goldstein, M. S. Brown), p.1389, McGraw-Hill Book Company, New York, 1983.
18. *Садыков А.С., Розенгарт Е.В., Абдувахов А.А., Асланов Х.А.* — В кн.: Холинэстеразы. Активный центр и механизмы действия, с.146—147, ФАН, Ташкент, 1976.
19. *Dowson R.M., Crone H.D.* J. Neurochem., v.21, № 1, p.247—249, 1973.
20. *Tomasi M., Roda G., Ausiello C., D Agnolo G., Venerado B., Ghidoni R., Sonnio S., Tettamanti G.* Eur. J. Biochem., v.111, № 2, p.315—324, 1980.
21. *Girotti A.W.* Biochemistry, v.14, N 15, p.3377—3383, 1975.
22. *McDonagh A.F.* Biochem. Biophys. Res. Commun., v.44, N 6, p.1306—1311, 1971.
23. *Stocker R., Yamamoto Y., McDonagh A.F., Glazer A.N., Ames B.N.* Science, v.235, № 4792, p.1043—1046, 1987.
24. *Lundblad R.L., Noyes C.M.* — In: Chemical reagents for protein modification, p.56, 127, Boca Ration, CRC Press, Florida, 1984.
25. *Tappel A.L.* Federat. Proc., v.32, N 8, p.1870—1874, 1973.

Поступила 2.11.1988

УДК 577.1.:547.953:612.822.1:612.8.015

ИЗМЕНЕНИЯ В СОСТАВЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВАХ ЛИПИДОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА КАК ПРИЧИНА РАЗНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЦНС ЖИВОТНЫХ К РАЗДРАЖАЮЩИМ ФАКТОРАМ

Чернявская Л.И., Архипова Г.В.,

Бурлакова Е.Б.

Институт химической физики АН СССР, Москва

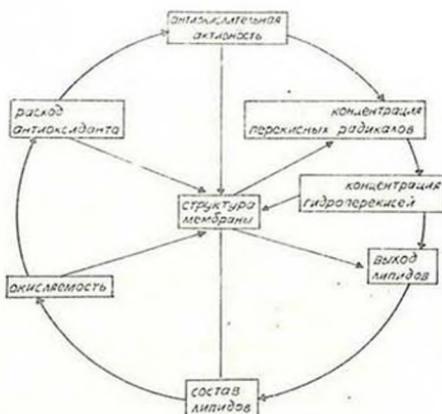
Изучено изменение отдельных параметров регуляторной системы ПОЛ: состава, антиокислительной активности липидов и их окисляемости, а также текучести липидной компоненты мембран для мозга крыс двух линий. Показано, что по указанным характеристикам липидов крысы линии Крушинского-Молодкиной (КМ), имеющие повышенную чувствительность к звуку, отличаются от беспородных животных. Введение антиоксиданта легковозбудимым животным так изменяло параметры регуляторной системы ПОЛ, что они становились похожими на эти показатели у беспородных крыс. В то же время отмечено значительное сходство указанных характеристик липидов мозга крыс линии КМ с аналогичными характеристиками у беспородных животных с введенным антиоксидантом. Сходство и различие в характеристиках липидов мозга подопытных и контрольных крыс линии КМ и беспородных нашли свое отражение в чувствительности этих групп животных к действию раздражающих факторов. При этом восприимчивость к звуковому раздражителю и чувствительность холинергической системы к ареколину у беспородных животных с введенным антиоксидантом были повышены и приближались к этим показателям у легковозбудимых крыс линии КМ. Введение антиоксиданта крысам линии КМ, наоборот, понижало их чувствительность и к звуку, и к холиномиметику. В работе сделан вывод о важной роли физико-химических показателей липидов для чувствительности ЦНС к раздражителям.

* * *

Изучение регуляторных механизмов клетки является актуальным вопросом современной биологии. Нами ранее была предложена, а затем экспериментально подтверждена физико-химическая модель регуляции клеточного метаболизма окислительными реакциями в липидах (см.схему) [1].

Имеются многочисленные экспериментальные данные, которые показывают универсальность работы этой регуляторной системы для прокариотов и эукариотов как для клеточных поверхностных мембран, так и для мембран различных субклеточных органелл [2—4]. Установлено, что в норме данная система, параметрами которой являются состав, физико-химические свойства липидов и структура мембран, поддерживает стационарный уровень окислительных реакций в липидах мембран. При интенсифика-

ции ПОЛ происходит ускорение выхода из мембран наиболее легко окисляющихся фракций липидов, содержащих ненасыщенные жирные кислоты. В результате изменяется относительный состав липидов, которые обогащаются наиболее устойчивыми к окислению фракциями, уменьшается текучесть и окисляемость липидов мембран, следствием чего является уменьшение скорости зарождения радикалов в липидах и возвращение ПОЛ к норме.



Показано, что многие патологические состояния, например, опухолевый рост и поздние стадии ишемической болезни сердца сопровождаются изменениями взаимосвязи между параметрами регуляторной системы [5,6].

В связи с этим представляло интерес рассмотреть работу этой системы регуляции ПОЛ при заболеваниях ЦНС. Одной из моделей патологии ЦНС является разновидность эпилептического состояния— аудиогенная эпилепсия крыс линии КМ (развитие судорожного эпилептиформного припадка в ответ на звуковой раздражитель) [7].

Целью работы было выяснить, изменяется ли поведение регуляторной системы на уровне синапсомембран головного мозга для крыс линий КМ по сравнению с беспородными животными.

В задачу работы входило экспериментальное изучение изменений отдельных параметров системы: состава, антиокислительной активности липидов и их окисляемости, а также текучести липидной компоненты мембран для регуляции ПОЛ крыс двух линий. Для оценки надежности работы регуляторной системы исследовали их изменения под действием антиоксиданта.

Материалы и методы

В работе были использованы крысы линии КМ и беспородные массой 150--200 г, содержащиеся на стандартном рационе. В качестве биологически активного вещества исследовали синтетический антиоксидант из класса экранированных фенолов—фенозан в дозе 40 мг/кг. Ранее было установлено, что эта доза фенозана проявляет защитное противосудорожное действие у крыс линии КМ [8]. Препарат вводили внутривбрюшинно, контрольным животным вводили равный объем физиологического раствора. Декапитацию животных, гомогенизацию ткани и выделение синапсом проводили по методике, предложенной De Robertis [9]. Экстракцию липидов из гомогената мозга проводили по методу Folch, Lees [10], а из синапсом по методике Кейтса [11]. Фракционирование фосфолипидов осуществляли методом восходящей одномерной хроматографии на силикагеле [12] с последующим количественным определением фосфолипидных фракций по P_i [13], а холестерина — по методу Sperry, Webb [14]. Определение антиокислительной активности липидов, адекватной уровню природных антиоксидантов, проводили на метилолеатной модели [15]. Окисляемость липидов определяли по степени их ненасыщенности методом озонирования на анализаторе двойных связей АДС-2, разработанном в Институте химической физики АН СССР [16], а также по жирнокислотному составу липидов, измеренному по методу Штофеля в модификации Верещагина [17]. Текучесть липидов мембран оценивали по времени вращательной корреляции (τ_c) спинного зонда—2,2,6,6-тетраметил-4 каприлоил-1 оксилпиперидин, который встраивается преимущественно в липидную фазу мембраны [18]. Радиоспектрметрические исследования проводили на спектрометре «Вюккер», используя суспензию синапсом с концентрацией белка 10 мг/мл. Определение белка в пробах проводили по методу Lowry и соавт. [19]. Об относительном уровне гидроперекисей липидов судили по накоплению малонового диальдегида, который определяли по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой [20]. Для оценки действия фенозана на состояние ЦНС использовали ареколиновый тест и определяли эффективную дозу (ED_{50}), при которой у 50% животных наблюдали полный тремор спинной мускулатуры. Смещение этого показателя позволяет судить об изменении чувствительности ЦНС на введение того или иного препарата [21]. Чувствительность крыс к звуку определяли по методу Крушинского и соавт. [22].

Результаты и обсуждение

В табл.1 предстарчены значения основных физико-химических показателей липидов головного мозга беспородных крыс. Для исследования характера взаимосвязи этих параметров в регуляторной системе мы

решили изучить изменение каждого из рассматриваемых показателей при воздействии антиоксиданта.

Таблица 1
Изменения физико-химических характеристик мембран синапсом головного мозга крыс через 1 ч и (в скобках) 4,5 ч после внутрибрюшинного введения антиоксиданта

| Характеристики мембран синапсом | Группы животных | Беспородные | Беспородные с фенозаном | Крысы линии КМ | Крысы линии КМ с фенозаном |
|---|-----------------|-------------|-------------------------|----------------|----------------------------|
| Антиокислительная активность липидов (ч · мл/г) | | -675 ± 70 | 150 ± 55 (-625 ± 60) | -500 ± 50 | -475 ± 60 (-250 ± 55) |
| Концентрация малонового диальдегида (в нмоль / мг белка · м) · 10 ⁻³ (инкубация при 37°) | | 0,93 ± 0,09 | 0,36 ± 0,04 | 0,36 ± 0,03 | 0,87 ± 0,07 |
| Сумма легкоокисляемых липидов / сумма трудноокисляемых липидов (S) | | 29,1 ± 3,6 | 44,0 ± 4,1 | 42,8 ± 3,9 | 25,8 ± 3,0 |
| Время вращательной корреляции спинового зонда при 37° (с · 10 ⁻¹⁰) | | 4,27 ± 0,20 | 2,88 ± 0,09 | 2,95 ± 0,1 | 3,38 ± 0,1 |
| Белок в мг/липид в мг | | 2,00 ± 0,15 | 1,63 ± 0,08 | 1,7 ± 0,07 | 1,85 ± 0,07 |
| Холестерин (мкмоль) / фосфолипиды (мкмоль) | | 1,80 ± 0,20 | 0,79 ± 0,08 | 1,44 ± 0,15 | 0,84 ± 0,07 |
| Холестерин в мг/белок в мг | | 3,75 ± 0,36 | 1,63 ± 0,17 | 2,08 ± 0,21 | 1,38 ± 0,11 |
| Сумма ненасыщенных жирных кислот / сумма насыщенных жирных кислот | | 0,76 ± 0,04 | 1,02 ± 0,06 | 1,04 ± 0,05 | 0,94 ± 0,04 |
| Ненасыщенность липидов методом озонирования (моль O ₃ / мг липида) · 10 ⁵ | | 0,09 ± 0,01 | 0,17 ± 0,02 | 0,21 ± 0,02 | 0,15 ± 0,01 |
| Эффективная доза арафалина (мг/кг) | | 12,0 ± 1,2 | 7,5 ± 0,7 | 7,0 ± 0,7 | 9,8 ± 1,0 |
| % животных, подверженных группингу | | 10,0 ± 2,1 | 60,0 ± 3,6 | 96,0 ± 3,5 | 0 |

Примечание. Достоверность различий между опытом и контролем и между разными линиями крыс $p \leq 0,05$.

Как видно из табл.1, внутрибрюшинное введение антиоксиданта беспородным крысам уже через 1 ч привело к значительному увеличению антиокислительной активности (АОА) липидов от $-675 \frac{\text{ч} \cdot \text{мл}}{\text{г}}$ до $150 \frac{\text{ч} \cdot \text{мл}}{\text{г}}$. В более поздние сроки (через 4,5 ч) после введения препарата наблюдалось возвращение АОА липидов к норме. Антиоксидант вызывал уменьшение скорости образования малонового диальдегида (МДА) у беспородных

крыс в 2,5 раза. Таким образом, взаимосвязь между АОА липидов и скоростью образования гидроперекисей функционирует согласно рассматриваемой схеме регуляции.

Одним из основных параметров системы регуляции является состав липидов. В работе было изучено изменение состава фосфолипидов и холестерина синапсомных мембран. Из полученных данных вычисляли величину окисляемости (S) как отношение легко окисляемых фракций фосфолипидов (фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозит, кардиолипин) к сумме трудноокисляемых фракций (сфингомиелин, фосфатидилхолин) с соответствующими коэффициентами [23]. Через 1 ч после введения фенозана величина S возрастала от 29 до 44, так как фенозан вызывал увеличение относительного содержания легкоокисляемых фракций фосфолипидов у беспородных крыс. Взаимосвязанная с составом липидов текучесть липидной компоненты синапсомных мембран также увеличивалась, так как время вращательной корреляции спинного зонда уменьшалось. При этом более жидкому состоянию мембраны соответствовало уменьшение содержания холестерина как в расчете на мг белка, так и на мкмоль фосфолипидов, а также наблюдалось увеличение содержания общих липидов в расчете на мг белка.

Согласно литературным данным [24], степень ненасыщенности липидов является важным фактором, влияющим как на окисляемость, так и на вязкость липидов мембраны. Увеличение текучести липидной компоненты синапсомной мембраны беспородных крыс вследствие введения им антиоксиданта происходило одновременно почти с 2-кратным возрастанием степени ненасыщенности липидов, измеренной как методом озонирования, так и по соотношению суммы ненасыщенных жирных кислот к насыщенным, что также позволяет говорить об увеличении окисляемости.

Таким образом, на основании рассмотрения параметров регуляторной системы (АОА, состав и окисляемость липидов, а также микровязкость липидной компоненты) мы обнаружили, что в мозгу беспородных крыс на увеличение АОА липидов мембрана отвечает уменьшением концентрации гидроперекисей, изменением состава липидов за счет накопления легкоокисляемых фракций (фосфатидилсерина, фосфатидилинозита, фосфатидилэтаноламина, кардиолипина), повышением вследствие этого способности липидов мембран к окислению, что, в свою очередь, вызывает увеличение скорости расходования антиоксиданта и возвращение АОА липидов к нормальному уровню. При этом повышенному уровню АОА липидов соответствовало более «жидкое» состояние липидного бислоя синапсомной мембраны и уменьшение содержания холестерина в ней.

При изучении физико-химических характеристик липидов головного мозга крыс линии КМ, имеющих повышенную возбудимость, было показано их отличие от аналогичных параметров у беспородных животных.

Как видно из табл.2, легковозбудимые животные (крысы КМ) по сравнению с обычными животными (беспородные крысы) имеют повышен-

ный уровень АОА, значительно меньшую скорость образования гидроперекисей, большее содержание легкоокисляемых фракций липидов, в частности фосфатидилсерина и фосфатидилинозита (КМ— $26,1 \pm 2,0\%$; беспородные— $19,2 \pm 1,5\%$), более высокую (в 2 раза) ненасыщенность липидов и, как следствие, менее вязкую, по сравнению с беспородными животными, синапсосомную мембрану, а также значительно меньшее содержание холестерина как на мг белка, так и на мкмоль фосфолипида.

Таким образом, по всем исследованным показателям, липидной фазы мембраны крысы линии КМ отличаются от беспородных. В то же время, при сопоставлении характеристик липидов мембран мозга крыс линии КМ с таковыми у беспородных животных, которым ввели антиоксидант, мы обнаружили их удивительную близость. Единственным отличием между показателями липидов у крыс линии КМ и беспородных с введенным антиоксидантом было содержание холестерина (табл.2).

Таблица 2

Состав фосфолипидов (в % от Р общ.) мембран синапсом головного мозга крыс в норме и через 1 ч после внутрибрюшинного введения животным антиоксиданта

| Группы крыс Фосфолипиды | Беспородные | Беспородные с фенозаном | Крысы линии КМ | Крысы линии КМ с фенозаном |
|--|----------------|----------------------------|------------------|-------------------------------|
| Фосфатидилсерин + фосфатидилинозит | $14,5 \pm 0,8$ | $19,2 \pm 1,1$ * | $26,0 \pm 2,3$ * | $14,0 \pm 0,8$ ** |
| Сфингомиелин | $6,0 \pm 0,3$ | $3,5 \pm 0,2$ * | $4,1 \pm 0,4$ * | $5,9 \pm 0,5$ ** |
| Фосфатидилхолин | $39,9 \pm 2,8$ | $31,8 \pm 2,1$ * | $30,5 \pm 2,5$ * | $44,0 \pm 4,2$ ** |
| Фосфатидилэтаноламин | $36,8 \pm 2,0$ | $40,9 \pm 1,8$ | $37,0 \pm 2,1$ | $35,2 \pm 2,3$ ** |
| Кардиолипин + фосфа- тидная кислота | $3,0 \pm 0,1$ | $4,8 \pm 0,4$ * | $2,0 \pm 0,1$ * | $2,1 \pm 0,2$ |

Примечание. * $p \leq 0,05$ (сравнение с беспородными крысами), ** $p \leq 0,05$ (сравнение с крысами линии КМ).

При сопоставлении ареколиновым тестом функциональной характеристики синапсосомной мембраны крыс линии КМ и беспородных с антиоксидантом также обнаруживаются близкие значения ED_{50} , отличающиеся от ED_{50} для контрольных беспородных крыс. Это свидетельствует о важном значении физико-химических характеристик липидов мембран мозга крыс разных линий для их возбудимости и активности холинергической передачи.

Важно было установить, функционирует ли физико-химическая система регуляции ПОЛ головного мозга крыс КМ так же, как и для беспородных. Введение антиоксиданта крысам линии КМ практически не изменило АОА липидов через 1 ч после введения, однако через 4,5 ч в отличие от беспородных крыс, наблюдалось увеличение АОА липидов почти в 2 раза. В то же время скорость образования МДА не уменьшается, а повышается и приближается к таковой для беспородных крыс. Увеличение скорости образования гидроперекисей повлекло за собой изменение величины S за счет изменения состава фосфолипидов в сторону уменьшения содержания легкоокисляемых фракций, в частности фосфатидилсерина и фосфатидилинозита (от 26,1% до 14%), а также уменьшение содержания общих липидов в расчете на мг белка и увеличение микровязкости (по τ). Следует отметить, что увеличение τ_c у крыс линии КМ с антиоксидантом происходит на фоне уменьшения окисляемости липидов на 66% по индексу ненасыщенности и на 80% по соотношению ненасыщенных жирных кислот к насыщенным.

Рассматривая взаимосвязь найденных нами изменений АОА, состава, микровязкости, окисляемости липидов мы обнаружили, что у крыс линии КМ взаимосвязь параметров регуляторной системы отличается от нормы. При этом первое «искажение» появляется на этапе связи между АОА липидов и концентраций гидроперекисей. В дальнейшем все изменения параметров происходят так, как они должны были бы происходить в ответ не на увеличение АОА липидов, а на повышение концентрации гидроперекисей. Поэтому большинство параметров системы для крыс линии КМ с введенным антиоксидантом близки к беспородным в норме.

Это же проявляется и при определении чувствительности холинергической системы к ареколину: величина ED_{50} для крыс линии КМ с антиоксидантом близка этой величине у беспородных животных.

Если чувствительность ЦНС крыс линии КМ и беспородных определенным образом связана с физико-химической системой регуляции ПОЛ, то из полученных нами данных следует, что беспородные крысы с введенным антиоксидантом должны стать более чувствительными не только к действию холиномиметика, но и к сильному звуковому раздражителю. Проведение экспериментов по той же методике, что и для выявления чувствительности к звуковому раздражителю у крыс линии КМ [22], показало, что у 60% беспородных крыс с введенным феноаном сильный звуковой раздражитель вызывал произвольные движения—груминг (в 10 раз более продолжительный по времени, чем в контроле), свидетельствующий о начале припадка. Однако, в отличие от крыс линии КМ, этот первый этап повышенной чувствительности к звуку не завершился эпилептиформным судорожным припадком. Мы полагаем, что неадекватная реакция в виде эпилептиформных судорог при действии сильного звукового раздражителя у крыс линии КМ в некотором отношении может быть связана с обнаруженными нами «искажениями» в системе регуляции.

Таким образом, мы обнаружили, что по всем характеристикам липидов мембран головного мозга (АОА, состав, окисляемость липидов, вязкость липидной компоненты) крысы линии КМ, отличающиеся повышенной возбудимостью и выдающие в 96% случаев в судорожный эпилептоформный припадок в ответ на действие звука, отличаются от беспородных животных. При этом интересно отметить значительное сходство указанных характеристик липидов мозга крыс линии КМ с аналогичными характеристиками у беспородных животных с введенным антиоксидантом. В то же время введение антиоксиданта легковозбудимым животным (линия КМ) так изменяет параметры системы регуляции ПОЛ, что они становятся похожими на эти показатели у беспородных крыс.

Ответ легковозбудимых животных (КМ) на введение антиоксиданта отличается от ответной реакции у беспородных крыс. При этом у крыс линии КМ «искажения» в ответе регуляторной системы на введение антиоксиданта наблюдаются на самых ранних этапах, а именно на этапе связи АОА липидов и концентрацией гидроперекисей. Все остальные звенья системы отвечали на введение антиоксиданта так же, как и беспородные на усиление ПОЛ.

Сходство и различие в характеристике липидов мозга подопытных и контрольных крыс линии КМ и беспородных находят свое отражение в чувствительности этих животных к действию раздражающих факторов. Чувствительность к звуковому раздражителю, так же как и чувствительность холинергической системы (по ED_{50}) у беспородных животных с введенным антиоксидантом повышена и приближается к чувствительности у легковозбудимых крыс КМ. Введение антиоксиданта крысам линии КМ, наоборот, снижает чувствительность и к звуку, и к холиномиметику. Это связано с изменением в системе регуляции ПОЛ у крыс линии КМ по сравнению с беспородными животными. Если бы система регуляции не была бы искажена, то введением антиоксиданта мы могли бы достичь лишь еще большего увеличения чувствительности.

Таким образом, приведенные данные свидетельствуют о важной роли состава, текучести и окисляемости липидов мембран мозга для чувствительности ЦНС к раздражителям.

CHANGES IN THE COMPOSITION AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF BRAIN LIPIDS AS AN EXPLANATION OF DIFFERENT SENSITIVITY OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM TO STIMULATION

Chernyavskaya L.I., Arkhipova G.V.,
Burlakova E.B.

*Institute of Chemical Physics, USSR
Academy of Sciences, Moscow*

We studied changes in some parameters of the regulatory system of lipid peroxidation (LPO) including composition and antioxidative activity of lipids, their ability to be oxidized fluidity in membranes from the rat brain. In KM rats with high sensitivity to sound these parameters differed from the corresponding characteristics in inbred animals. Administration of antioxidants to easily excitable animals made their LPO characteristics similar to those of inbred rats. At the same time there was a considerable similarity of these characteristics for KM rats brain lipids and those of inbred rats after the administration of antioxidants. The inbred animals receiving the antioxidant had increased sensitivity, to sound stimuli, moreover, their cholinergic system was more sensitive to arecoline being similar in this respect to that of easily excitable KM rats. On the contrary, the administration of the antioxidant to KM rats decreased their sensitivity to the sound and cholinomimetic. It is concluded that physico-chemical parameters of lipids are important for the sensitivity of the CNS to stimulation.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бурлакова Е.Б. — В сб.: Симпозиальные доклады III Всесоюз. Биохимического съезда, с.184—190, Зинатне, Рига, 1971.
2. Burlakova E.B., Molotchkina E.M., Palma N.P. *Adv. Enzyme Regul.*, v.18, p.163, 1980.
3. Богословская О.А. Автореферат канд. дис., М., 1983.
4. Феофилова Е.П., Бурлакова Е.Б., Кузнецов Л.С., Полотебнова М.Б., Розанцев Э.Г. *Прикладная биохимия и микробиол.*, т.22 вып.2, с.248, 1986.
5. Бурлакова Е.Б., Мальцева Е.Л., Пальмина Н.П., Голощапов А.Н. *Биофизика*, т.25, N4, с.3, 1982.
6. Калмыкова В.И., Бурлакова Е.Б. *Сов. медицина*, N4, с.3, 1982.
7. Крушинский Л.В. *Успехи соврем. биол.*, т.28, вып.1 (4), 1949.
8. Архипова Г.В., Бурлакова Е.Б., Семиохина А.Ф., Федотова И.Б., Крушинский Л.В. *Докл. АН СССР*, т.267, N2, с.469—471, 1982.
9. De Robertis E. — In: *Drug Receptor*, p.257—272, London, Plenum Press, 1973.
10. Folch J.J., Lees M.J. *J. Biol. Chem.*, v.226, p.497—502, 1957.
11. Кейтс М. *Техника липидологии*, М., Мир, с.72—77, 1975.
12. Шталь Э. — В кн.: *Хроматография в тонких слоях*, с.44—60, М., Мир, 1965.

13. *Chen P.S., Foribara T.J., Warner N.* Anal. Chem., v.28, N 7, p.1756—1758, 1956.
14. *Sperry W.H., Webb M. J.* Biol. Chem., v.187, p.96—106, 1950.
15. *Бурлакова Е.Б., Дзюба Н.М., Пальмина Н.П., Эмануэль Н.М.* ДоклАН СССР, т.163, N 5, с.278—282, 1965.
16. *Лисицки Д.М., Позняк Т.И., Разумовский С.Д.* Кинетика и катализ, т.17, вып. 4, с.1049—1056, 1976.
17. *Верещакин А.Г., Скаорцова С.В., Исхаков Н.И.* Биохимия, т.28, вып.5, с.868—878, 1963.
18. *Голощанов А.Н., Бурлакова Е.Б.* Биофизика, т.20, с.816—820, 1975.
19. *Lowry O.N., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.* J.Biol.Chem., v.193, N 1, p.423—434, 1951.
20. *Buege J.A.* Aust st.D. Microsomal lipid peroxidation method *Enzymol*, v.52, p.302—310, 1978.
21. *Аничков С.В.* — В кн.: Избирательное действие медиаторных средств, с.224, Л., Медицина, 1974.
22. *Крушинский Л.В., Семиохина А.Ф., Плескачова М.Г.* — В кн.: Эмоции и поведение: системный подход, Советско-американская Павловская конференция памяти П.К. Анохина, с.167—169, М., 1984.
23. *Аристархова С.А., Архипова Г.Б., Бурлакова Е.Б., Гаахария В.О., Глущенко Н.И., Храпова Н.Г.* Докл. АН СССР, т.228, N 1, с.215—219, 1976.
24. *Крепс Е.М.* — В кн.: Липиды клеточных мембран, с.188—193, Л., Наука, 1981.

Поступила 20.11.1988

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 612.815:577.175.823

РЕГИОНАРНЫЕ И СЕЗОННЫЕ РАЗЛИЧИЯ В
СВЯЗЫВАНИИ [³H]СЕРТОНИНА В МОЗГУ КРЫС

Молодцова Г.Ф.

Институт физиологии СО АМН СССР, Новосибирск

Серотонин играет важную роль в регуляции многих физиологических функций. Однако несмотря на то, что большинство аспектов функционирования серотонинергической системы хорошо изучено, роль рецепторных структур, через которые осуществляется действие медиатора на постсинаптическую мембрану, в регуляции физиологических функций остается практически не исследованной.

В настоящее время на основании результатов радиолигандных исследований выделяют два основных типа центральных серотониновых рецепторов: С1 рецепторы, обладающие высоким сродством к [³H]серотонину и низким к его антагонистам, и С2 рецепторы, имеющие высокое сродство к [³H]спиперону или [³H]кетансерину и низкое (микромольное) сродство к самому серотонину [1 — 4]. Функциональная роль С2 рецепторов изучена несколько лучше, так как большинство известных серотонинергических антагонистов связывается именно с этим типом рецепторов и только небольшое число соединений взаимодействует с С1 рецепторами, причем многие из них являются индольными производными с агонистическими свойствами [5 — 7]. В последние годы появились также данные о вовлечении С1 рецепторов в некоторые функции организма: в регуляцию цикла сон—бодрствование и циркадных ритмов [8], в сексуальное поведение у крыс [9], в наступление зимней спячки у сусликов [10]. Однако такие работы немногочисленны и требуются дальнейшие исследования для выяснения роли С1 рецепторов в различных функциональных состояниях.

В данной работе исследовали функциональную активность С1 рецепторов в серотонинергических структурах мозга крыс и особенности их функционирования в разные сезоны года—зима—лето.

В опытах использовали крыс-самцов линии *Wistar* массой 200 - 230 г. Одну группу животных декапитировали летом (июнь - июль), другую— зимой (январь - февраль). На холоде выделяли следующие структуры

мозга: фронтальную кору, гиппокамп, миндалину, центральное серое вещество среднего мозга. Специфическое связывание серотониновых рецепторов первого типа определяли радиолигандным методом [11] по связыванию [^3H]серотонина в мембранной фракции соответствующих структур мозга. Ткань гомогенизировали в 50 объемах 50 мМ трис-НСl буфера, рН 7,4 и центрифугировали при 20000 g в течение 20 мин. Осадок ресуспендировали в том же буфере и инкубировали 10 мин при 37° для удаления эндогенного серотонина, затем вновь центрифугировали при тех же условиях. Конечный осадок ресуспендировали в 50 мМ трис-НСl буфере, рН 7,4, содержащем 4 мМ CaCl_2 , 5,7 мМ аскорбиновую кислоту и 10 мкМ паргилин («Sigma», США; 1 мл суспензии содержал 30 мг сырого веса ткани). В качестве радиолиганда использовали [^3H]серотонин (21,8 Ки/ммоль, «Amersham», Англия). Пробы в объеме 2,1 мл, содержащие 0,5 мл тканевой суспензии, [^3H]серотонин и немеченый серотонин (1 мкМ, «Reanal», Венгрия), инкубировали в течение 10 мин при 37°. Инкубацию останавливали быстрым охлаждением в ледяной воде с последующим центрифугированием. Высушенные осадки заливали сцинтилляционной жидкостью. Связанную радиоактивность измеряли на жидкостном сцинтилляционном счетчике «Delta - 300» с 55%-ной эффективностью. Специфическое связывание меченого лиганда с рецепторами определяли по разнице между общим и неспецифическим связыванием (в присутствии немеченого серотонина) и выражали в фмоль на 1 мг белка. Неспецифическое связывание составляло 40% от общего. Белок в пробах определяли по методу Lowry и соавт. [12].

Обработку экспериментальных данных для количества связывающих участков проводили по одно- и двухцентральной моделям связывания [13]. Критерием выбора между одно- и двухцентральной моделями связывания служила величина суммы квадратов отклонений для этих моделей (F-критерий). Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента.

Данные, полученные при определении связывания [^3H]серотонина с мембранами различных серотонинергических структур мозга крыс представлены в таблице. Обнаружены регионарные различия в распределении связывающих [^3H]серотонин участков в исследованных областях мозга. Наиболее высокое специфическое связывание серотонина наблюдалось в гиппокампе, а наиболее низкое — во фронтальной коре, что соответствует литературным данным [6]. В центральном сером веществе связывание [^3H]серотонина было на таком же высоком уровне, как и в гиппокампе. В миндалине специфическое связывание серотонина было в 1,4 раза ниже, чем в гиппокампе и практически не отличалось от его связывания во фронтальной коре.

Таблица

Специфическое связывание [^3H] серотонина (2,5 нМ) в различных структурах мозга крыс в зависимости от сезона зима-лето (в фмоль/мг белка)

| Группа животных | Гиппокамп | Центральное серос вещество | Миндалина | Фронтальная кора |
|-----------------|------------------------|----------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Лето | 89,7 \pm 6,6 (5) | 90,5 \pm 6,8 (5) | 65,8 \pm 4,0 (9) | 56,3 \pm 3,8 (9) |
| Зима | 52,7 \pm 4,3* (9) | 49,7 \pm 2,9* (7) | 66,5 \pm 2,6 (6) | 58,5 \pm 3,6 (9) |

Примечание. * $p < 0,001$, в скобках — количество определений.

Чтобы выяснить, чем обусловлены различия в функциональной активности С1 рецепторов в исследуемых областях мозга, были проведены эксперименты по определению основных параметров, характеризующих связывание с рецепторами, — K_d и максимального количества связывающих участков (V_{max}). Во фронтальной коре и гиппокампе связывание [^3H] серотонина в координатах Скетчарда было линейным (рис., а), что указывает на один тип участков связывания серотонина. Для фронтальной коры были получены $K_d = 3,8 \pm 0,4$ нМ и $V_{max} = 145 \pm 15$ фмоль/мг белка и для гиппокампа (в летний сезон) соответственно $K_d = 2,7 \pm 0,3$ нМ и $V_{max} = 200 \pm 24$ фмоль/мг белка. Из-за отсутствия статистически значимых различий между K_d и V_{max} для фронтальной коры и соответствующими параметрами для гиппокампа трудно определить, каким именно кинетическим параметром обусловлены различия в функциональной активности С1 рецепторов в этих структурах, так как возможно, что более высокая функциональная активность С1 рецепторов в гиппокампе связана с изменением обоих параметров как большим количеством рецепторов, так и более высоким их сродством к серотонину. По данным Schnellman и соавт. [14], более высокое специфическое связывание серотонина в гиппокампе обусловлено большим количеством связывающих участков.

В отличие от фронтальной коры и гиппокампа в миндалине связывание [^3H] серотонина в координатах Скетчарда отклонялось от линейной зависимости (рис., б). Полученные экспериментальные данные лучше описывались двухцентровой моделью связывания, что указывает на наличие двух участков связывания с $K_{d1} = 0,7 \pm 0,1$ нМ и $V_{max1} = 38 \pm 1,1$ фмоль/мг белка для высокоаффинного связывания и $K_{d2} = 17, \pm 1,0$ нМ и $V_{max2} = 259 \pm 17$ фмоль/мг белка для низкоаффинного связывания.

Известно, что серотонинергическая система мозга вовлекается в регуляцию различных функций организма: сексуального поведения, терморегуляцию, регуляцию сна и других, на которые оказывает влияние сезонный фактор. Обнаружено, что специфическое связывание серотонина

изменяется в зависимости от сезона года—зима-лето (таблица), причем наблюдаются регионарные различия в сезонных изменениях. В гиппокампе и центральном сером веществе связывание серотонина зимой понижалось

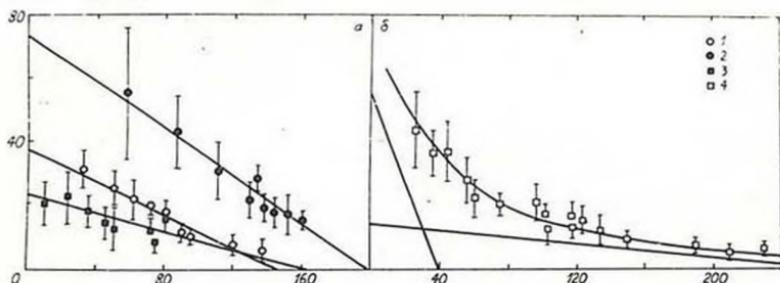


Рис. График Скетчарда связывания $[^3\text{H}]$ серотонина с мембранной фракцией фронтальной коры и гиппокампа (а) и миндалины (б) мозга крыс. 1 - фронтальная кора, 2 - гиппокамп (лето), 3 - гиппокамп (зима), 4 - миндалина. По оси абсцисс—количество связанного лиганда (в фмоль/мг белка), по оси ординат—отношение связанного лиганда к свободному. Использовали следующие концентрации $[^3\text{H}]$ серотонина: от 1,0 до 22 нМ для фронтальной коры, от 0,5 до 10 нМ для гиппокампа и от 0,6 до 43 нМ для миндалины

почти в два раза по сравнению с летом. В других структурах - миндалине и фронтальной коре зависимости связывания $[^3\text{H}]$ серотонина от сезона не отмечалось, что указывает на важность 5-HT_1 рецепторов гиппокампа и центрального серого вещества в сезонных изменениях физиологических функций. Следует отметить, что именно в этих структурах мозга наблюдается и наиболее высокая плотность 5-HT_1 рецепторов.

Определение кинетических параметров связывания серотонина в гиппокампе крыс зимой показало $K_d = 6,9 \pm 1,3$ нМ и $V_{\text{max}} = 160 \pm 25$ фмоль /мг белка (рис.,а), то есть наиболее значительно изменялась (увеличение в 2,6 раза, $p < 0,02$) по сравнению с летом величина K_d . Таким образом, сезонные изменения специфического связывания серотонина обусловлены различиями в сродстве рецепторов к серотонину.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в ответ на воздействие сезонного фактора среды вовлекаются регуляторные механизмы функциональной активности 5-HT_1 рецепторов.

REGIONAL AND FUNCTIONAL CHANGES OF 5-HT₁ RECEPTORS IN RAT BRAIN

Molodtsova G.F.

*Institute of Physiology, USSR Academy of
Medical Sciences, Siberian Division, Novosibirsk*

The functional role of 5-HT₁ receptors located in serotonergic structures of rat brain was studied in different seasons. The specific binding of serotonin was measured in the frontal cortex, hippocampus, amygdala and central grey matter in winter and summer. Regional and seasonal changes in the functional activity of 5-HT₁ receptors were found. The decrease of [³H]5-HT binding in hippocampus and central grey matter was observed in winter. K_d of serotonin binding in hippocampus increased 2,6 times. No seasonal changes were observed in amygdala and frontal cortex. Thus, mechanism controlling the functional activity of 5-HT₁ receptors are associated with seasonal changes of the physiological function of serotonergic structures.

ЛИТЕРАТУРА

1. Peroutka S.J., Snyder S.H. *Mol. Pharmacol.*, v.16, p.687 - 699, 1979.
2. Nelson D.L. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v.6, p.499 - 502, 1982.
3. Leysen J.E. *Neuropharmacol.*, v.23, p.247 - 254, 1984.
4. Bradleu P.B., Engel G., Feniuk W. et al. *Neuropharmacol.*, v.25, p.563 - 576, 1986.
5. Lucki I., Nobler M.S., Frazer A. *J. Pharm. Exp. Ther.*, v.228, p.133 - 139, 1984.
6. Leysen J.E. In: Serotonin and the cardiovascular system (ed. P.M. Vanhoutte), p.43 - 62, Raven Press, N.Y., 1985.
7. Peroutka S.J. *Neuropharmacol.*, v.23, p.1487 - 1492, 1984.
8. Wesemann W., Weiner N., Rotsch M., Schulz E. *J. Neural Transmission*, suppl.18, p.287 - 294, 1983.
9. Mendelson S.D., Gorzalka B.B. *Physiol. Behav.*, 37, p.345 - 351, 1986.
10. Пак Д.Ф., Куликов А.В., Попова Н.К. *Нейрохимия*, т.6, с.186 - 192, 1987.
11. Nelson D.L., Nerbet A., Bourgoin S. et al. *Mol. Pharmacol.*, v.14, p.983 - 995, 1978.
12. Lowry O.H., Rosebrough M.J., Farr A., Randall R.J. *J. Biol. Chem.*, v.193, p.265 - 275, 1951.
13. Feldman H.A. *Anal. Biochem.*, v.48, p.317 - 338, 1972.
14. Schnellman R.G., Waters S.J., Nelson D.L., *J. Neurochem.*, v.42, p.65 - 70, 1984.

Поступила 12.12.1988

УДК 612.821.7; 577.1

МЕТАБОЛИЗМ СЕРОТОНИНА В ОБЛАСТИ ДОРЗАЛЬНОГО ЯДРА ШВА И СИНЕГО ПЯТНА ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫ В УСЛОВИЯХ НЕВРОТИЗАЦИИ

Таранова Н.П., Маликов У.М.

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

Моноаминергические структуры головного мозга, в том числе и серотонинергические, играют значительную роль в механизмах регуляции поведения [1]. Экспериментальные данные свидетельствуют об активном участии как холинергических, так и катехоламинергических систем в механизмах развития неврозов [2]. Однако вклад серотонинергических структур головного мозга в патогенез неврозов до сих пор мало исследован. Одной из главных серотонинергических структур, в которой расположено наибольшее количество серотонинсодержащих нейронов, является дорзальное ядро шва (ДЯШ) [3]. Показано, что введение серотонина в область ДЯШ, деполяризация или механическая стимуляция клеток этого ядра вызывали существенное повышение высвобождения серотонина в различных отделах головного мозга [4]. Нейроны ДЯШ, являясь наряду с некоторыми другими ядрами источником серотонинергической иннервации коры больших полушарий, таламуса, гипоталамуса, лимбической системы и среднего мозга, связаны своими коллатеральными восходящими аксонами с важным норадренергическим ядром головного мозга — синим пятном (СП) [5,6]. При этом серотонин оказывает модулирующее воздействие на активность норадренергических нейронов СП [7]. Поскольку о функциональной активности серотонинергических структур можно судить по интенсивности метаболизма серотонина в этих структурах, задачей настоящей работы было исследование содержания серотонина и продукта его катаболизма — 5-оксииндолуксусной кислоты (5-ОИУК) в области ДЯШ и СП в условиях невротизации.

Работа выполнена на 68 беспородных крысах-самцах массой 200—220 г. У 28 животных в течение 6 дней вырабатывали дискриминационный рефлекс избегания в модифицированной челночной камере [8]. В начале каждого опыта крысу помещали в левую половину камеры. По сигналу тона частотой 200 Гц она должна была переходить в правую половину, по сигналу тона частотой 1000 Гц оставаться на месте 10 с. За ошибки наказывали ударами тока силой 1,5 мА, подаваемого через решетча-

тое покрытие пола камеры. Ежедневно каждой крысе предъявляли 60 раздражителей, чередуемых в случайной последовательности [9]. Изолированное действие условных сигналов продолжалось 5 с, совместное действие условного и безусловного раздражителей — 5 с, интервалы между раздражителями составляли 15 с. На 6-й день невротизации животные проявляли двигательное возбуждение, становились на задние лапы, пытались выпрыгнуть из условнорефлекторной камеры. Возрастала агрессивность по отношению к экспериментатору. Отмечались голосовые реакции и стереотипные формы поведения (подергивание головой, умывание, грызение). Перечисленные изменения свидетельствуют об эмоциональных сдвигах у подопытных крыс, имеют адаптивное значение и характеризуют 1-ую фазу развития невротического состояния «предневроз» [9].

Одновременно другую группу крыс в течение 6 дней подвергали действию неизбежного электрокожного раздражения (группа «активного контроля») в той же камере по 10 мин ежедневно, по 1—2 раза за 1 мин в течение 10 с. На 6-й день, сразу же после окончания экспериментов по невротизации, крыс декапитуировали. Из черепной коробки на холоде быстро извлекали головной мозг, отмывали его от крови в охлажденном физиологическом растворе, освобождали его от крупных сосудов и оболочек, отделяли большие полушария, а ствол замораживали при -20° . На замораживающем микротоме *Cryo-Cut* («American Optical Corporation», США) готовили фронтальные срезы ствола головного мозга. Поиск ДЯШ и СП проводили путем прокрашивания последовательных срезов толщиной 40 мкм толудиновым синим. Топографическую идентификацию этих ядер осуществляли при помощи световой микроскопии по морфологическим таблицам [10]. Для биохимического анализа готовили срезы толщиной 500 мкм с характерным топографическим расположением нейронов в зоне ДЯШ или СП и из этих срезов выделяли блоки. Затем объединяли блоки, полученные от 2-х животных, содержащих соответствующее ядро с небольшим участком окружающей ткани. Содержание серотонина и продукта его катаболизма, 5-ОИУК в гомогенатах определяли спектрофлуорометрическим методом [11] в модификации Узбекова [12], используя для гомогенизации ткани 0,1 н. HCl насыщенный NaCl, а не бутанол. Флуоресценцию проб измеряли на спектрофлуорометре MRF-2A («Hitachi», Япония) при следующих длинах волн: возбуждения—360 нм, флуоресценции—475 нм.

Исследование содержания серотонина и 5-ОИУК показало, что в области ДЯШ контрольных крыс оно составляет соответственно $1,268 \pm 0,069$ и $0,873 \pm 0,085$ мкг/г ткани, а в области СП— $1,057 \pm 0,054$ и $0,857 \pm 0,124$ мкг/г (таблица).

У невротизированных крыс мы не нашли каких-либо изменений в содержании серотонина в обоих исследованных структурах. При этом наблюдалось некоторое увеличение количества 5-ОИУК, но оно оказалось статистически недостоверным из-за значительных индивидуальных колебаний.

Таблица

Содержание серотонина и 5-оксииндолуксусной кислоты в области дорзального ядра шва и синего пятна головного мозга крыс в условиях невротизации (в мкг/г влажной ткани)

| | Серотонин | 5-ОИУК | Коэффициент 5-ОИУК/серотонин |
|-------------------|-----------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| | Дорзальное ядро шва | | |
| Контроль | 1,268 ± 0,069 (12) | 0,873 ± 0,085 (7) | 0,632 ± 0,077 (7) |
| Активный контроль | 1,333 ± 0,093 (10) | 1,492 ± 0,203 (10) <i>p</i> < 0,05 | 1,154 ± 0,146 (10) <i>p</i> < 0,01 |
| Невротизированные | 1,395 ± 0,085 (11) | 1,050 ± 0,188 (8) | 0,737 ± 0,105 (8) |
| | Синее пятно | | |
| Контроль | 1,057 ± 0,054 (13) | 0,857 ± 0,124 (10) | 0,809 ± 0,156 (10) |
| Активный контроль | 1,085 ± 0,109 (10) | 1,057 ± 0,128 (10) | 0,095 ± 0,099 (10) |
| Невротизированные | 1,102 ± 0,124 (11) | 1,116 ± 0,188 (11) | 1,291 ± 0,238 (11) |

Примечание. В скобках указано число проб.

Не найдено изменений в содержании серотонина в исследованных ядрах и у группы крыс, подвергавшихся воздействию только стрессующего фактора—неизбегаемого электрокожного раздражения, приводившего к развитию состояния депрессии (таблица). Эти данные коррелируют с результатами, полученными при иммобилизационном стрессе у крыс, который также не оказывал влияния на содержание серотонина ни в изолированном ДЯШ, ни в СП [13]. В то же время действие электрокожного раздражения вызывало резкое повышение (на 71%) содержания 5-ОИУК в области ДЯШ, и при этом значительно повышалась величина катаболического коэффициента (таблица), что свидетельствует о заметной активизации метаболизма серотонина и повышении функциональной активности этой серотонинергической структуры. В СП также отмечена тенденция к повышению количества 5-ОИУК и величины катаболического коэффициента, но достоверность этих изменений не подтвердилась.

Повышение количества 5-ОИУК в различных отделах головного мозга отмечено и при других стрессорных воздействиях: в среднем мозгу и гипоталамусе—при плавании с грузом [14], в больших полушариях—при иммобилизации [15] и в области варолиева моста—при электрошоке [16]. Полученные нами данные позволяют заключить, что стрессорные воздействия могут активизировать обмен серотонина также и в нейронах ДЯШ, но не оказывают существенного влияния на метаболизм в СП.

Таким образом, использованная модель невротизации, приводившая

к развитию состояния предневроза, не вызывала заметных изменений в метаболизме серотонина исследуемых ядер. Но длительное действие стрессорирующего фактора, неизбежного электрокожного раздражения, сопровождалось развитием значительных нейрохимических сдвигов— резкой активизацией метаболизма серотонина в ДЯШ, причиной которой у крыс группы активного контроля может быть более длительное действие примененного стрессорирующего фактора, поскольку неизбежное электрокожное раздражение, как известно, оказывает более сильное невротизирующее воздействие на организм крыс (судя по показателям вегетативных функций и способности к обучению) по сравнению с аналогичным по силе и длительности электрокожным раздражением, которое можно или избежать, или хотя бы предвидеть момент его появления при наличии условного стимула, предвещающего ток [17—19].

METABOLISM OF SEROTONIN IN THE AREA OF RAT BRAIN N.RAPHE DORSALIS AND LOCUS COERULEUS UNDER EXPERIMENTAL NEUROSIS

Taranova N.P., Malikov U.M.

*Pavlov Institute of Physiology, USSR
Academy of Sciences, Leningrad*

The effect of experimental neurosis and inescapable electric shock on serotonin and 5-hydroxyindolylacetic acid (5-HIAA) content was studied in rat n. raphe dorsalis and locus coeruleus. Neurotization of animals achieved by developing escape discrimination reflex under the conditions of time deficit did not induce changes in serotonin and 5-HIAA concentration in both brain regions. Rats from the active control group exposed to inescapable electric shock had a pronounced increase of 5-HIAA concentration in the area of n. raphe dorsalis.

ЛИТЕРАТУРА

1. Попова Н.К., Науменко Е.В., Колтаков В.Г. Серотонин и поведение, Новосибирск, Наука, 1978.
2. Айрапетьянц М.Г., Веїн А.М. Неврозы в эксперименте и клинике, М., Наука, 1982.
3. Dahlström A., Fuxe K. *Acta physiol. Scand.*, v.62, suppl.232, r.1—55, 1964.
4. Héry F., Ternaux J.P. *J.Physiol.*, v.77, N2/3, p.287—301, 1981.
5. Palkovitz M., Saavedra J.M., Jacobowitz D.M., Kizer J.S., Zabogasky L., Brownstein M.J. *Brain Res.*, v.130, N 1, p.121—134, 1977.
6. Palkovitz M. *Acta morphol. Acad. Sci Hungar.*, v.26, №3-4, p.211-290, 1978.
7. Kostovski W., Samanin R., Bareggi S., Mare V., Gagattini S., Valzelli L. *Brain Res.*, v.82, N1, p.178—182, 1974.
8. Саульская Н.Б. *Журн. высш. нервн. деят.—сти, т.35, вып.3, с.561—564, 1985.*
9. Bureš G., Burešova O., Huston G.H. *Techniques and basic experiments for the study of brain and*

- behavior, Amsterdam, Elsevier, 1967.
10. Курепина М.М. Мозг животных, М., Наука, 1981.
 11. Curson G., Green A. Brit. J. Pharmacol., v.39, p.653—655, 1970.
 12. Узбеков М.Г. Онтогенез, т.12, N 1, с.58—65, 1981.
 13. Culman J., Kissa A., Kvetnansku R. Exp. Clin. Endocrinol., v.83, N 1, p.28—36, 1984.
 14. Чуйко М.П., Каплунова Т.А., Тернов В.И. — В кн.: Восьмая всесоюзная конф. по биохимии нервной системы (под ред. И.А. Булыгина), с.205—205, Минск, Наука и техника, 1980.
 15. Лобачева И.И., Попова Н.К. — В кн.: Восьмая всесоюзная конф. по биохимии нервной системы (под ред. И.А. Булыгина), с.183—184, Минск, Наука и техника, 1980.
 16. Hellhamer D.H., Rea M.A., Bell M., Vcfhien L., Ludvig M. Pharm. Biochem. Behav., v.21, N 4, p.481—485, 1984.
 17. Гехт К., Мехедова А.Я., Тренгов К. Журн. высш. нерв. деят.—сти, т.27, N 2, с.328—331, 1977.
 18. Kelsey J. Anim.Learn.Behav., v.5, N 1, p.83—92, 1977.
 19. Launay M. Ann.psychol., v.84, N3, p.399-410.

Поступила 2.01.1989

УДК 612.82:577.152.12:612.48—001.1

АЛЬДЕГИДОКИСЛЯЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ МОЗГА КРЫС С РАЗЛИЧНОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ МОТИВАЦИЕЙ В УСЛОВИЯХ ОСТРОГО СТРЕССА

Зиматкин С.М., Пронько П.С.,
Тарасов Ю.А.

Институт биохимии АН БССР, Гродно

Острый стресс вызывает ускорение кругооборота катехоламинов, а следовательно, и повышенное образование продуктов окислительного дезаминирования на периферии и в мозгу [1]. Другим источником альдегидов является процесс ПОЛ, который в условиях острого стресса значительно усилен в мозгу и других органах [2]. Можно предполагать усиленное продуцирование альдегидов в процессе общего метаболизма, интенсивность которого на ранних стадиях стресса тоже возрастает [3]. Хотя прямых определений различных типов альдегидов при стрессе не проводили, многократное увеличение в ткани мозга шиффовых оснований косвенно подтверждает накопление в нем этих соединений [2]. Интересно отметить, что неустойчивость к стрессу у крыс специальных линий связывают с повышением в мозгу альдегидных продуктов ПОЛ [4]. Известно также, что крысы с выраженной естественной алкогольной мотивацией отличаются повышенной готовностью к стрессу, низкой конкурентоспособностью и возможностями адаптации [5], пониженным содержанием эндогенного этанола (ЭЭ) в крови [6]. Исходя из этого, представляло интерес изучение влияния острого стресса на альдегидметаболизирующую способность структур мозга с учетом отношения животных к этанолу.

Опыты проведены на беспородных белых крысах-самцах массой 180—220 г, содержавшихся в стандартных условиях вивария. Животных трижды тестировали на предпочтение 5%-ного этанола или воды [7]. Через месяц после этого по 8 крыс, предпочитающих воду (ПВ) или этанол (ПЭ), подвергали острому имобилизованному стрессу фиксацией конечностей в течение 45 мин в вертикальном положении. Животных сразу после указанного воздействия декапитировали. Контролем служили интактные крысы. 11-оксикортикостероиды (11-ОКС) определяли в крови и надпочечниках флуорометрически [8], ЭЭ в крови и мозгу методом газовой хроматографии [9]. Активность основного фермента, окисляющего альдегиды в ЦНС,—альдегиддегидрогеназы (КФ 1.2.1.3; АльДГ) выявляли гистохимически в криостатных срезах мозга [10] (в качестве субстрата исполь-

зовали уксусный и бензойный альдегиды в конечной концентрации 20 мМ). Относительную активность АльДГ, пропорциональную количеству образовавшегося в ходе реакции диформаза, регистрировали с помощью сканирующего микроскопа-фотометра МЦФУ-2МП (ЛОМО) при длине волны 580 нм и диаметре фотометрируемого участка препарата 1,75 мкм и выражали в единицах оптической плотности. Полученные цифровые значения обрабатывали статистически с использованием критерия Стьюдента.

Таблица

Содержание эндогенного этанола (мг/л; мг/кг) в крови и мозгу крыс с различным предпочтением этанола после острого иммобилизационного стресса

| Группы животных | Кровь | Мозг |
|--------------------------------|-------------|-------------------|
| Контроль (интактные животные) | 0,20 ± 0,03 | 0,51 ± 0,06 |
| Стресс у предпочитающих воду | 0,29 ± 0,05 | 0,29 ± 0,04** |
| Стресс у предпочитающих этанол | 0,21 ± 0,04 | 0,19 ± 0,02 ± *** |

Примечание. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ по сравнению с контролем, † $p < 0,05$ по сравнению с предпочитающими воду крысами.

Острый стресс приводил к значительному увеличению содержания 11-ОКС в крови (контроль—16,7 ± 1,2 мкг%; крысы ПВ—25,9 ± 2,8; ПЭ—24,1 ± 1,5; $p < 0,01$) и надпочечниках (контроль—3037,5 ± 150,3 мкг%; ПВ—5926,6 ± 387,3; ПЭ—5505 ± 223,9; $p < 0,01$). Концентрация ЭЭ в крови не изменялась, однако резко понижалась в мозгу, особенно у крыс ПЭ (таблица). Активность АльДГ во многих нейронных и барьерных структурах мозга под действием стресса снижалась также более значительно у крыс ПЭ (рисунок).

Обнаруженное угнетение альдегидокисляющей способности цитоплазмы многих нейронов и нейропиля ЦНС в условиях острого стресса может создавать дополнительные условия для накопления альдегидов, образующихся в самом мозгу. Снижение активности АльДГ в барьерных структурах—в эндотелии капилляров и астроцитах (между кровью и нервной тканью), в эпендимоцитах сосудистого сплетения (между кровью и СМЖ), а также в эпендимоцитах, выстилающих желудочки мозга (между СМЖ и нервной тканью) может способствовать усилению проникновения в мозг альдегидов, в повышенных количествах образующихся на периферии при стрессе. Дополнительным путем устранения («обезвреживания») избытка ацетальдегида в мозгу является восстановление его в этанол с помощью алкогольдегидрогеназы (КФ 1.1.1.1), работающей в этом органе преимущественно по редуцтазному пути [11]. Поэтому обнаруженное нами снижение уровня ЭЭ в мозгу может отражать угнетение и этого процесса при стрессе. Известно также, что альдегиды являются биологически активными веществами, в повышенных концентрациях оказывающими

нейротоксическое действие [12], а острый стресс вызывает функциональные, метаболические и структурные нарушения в мозгу [3,13].

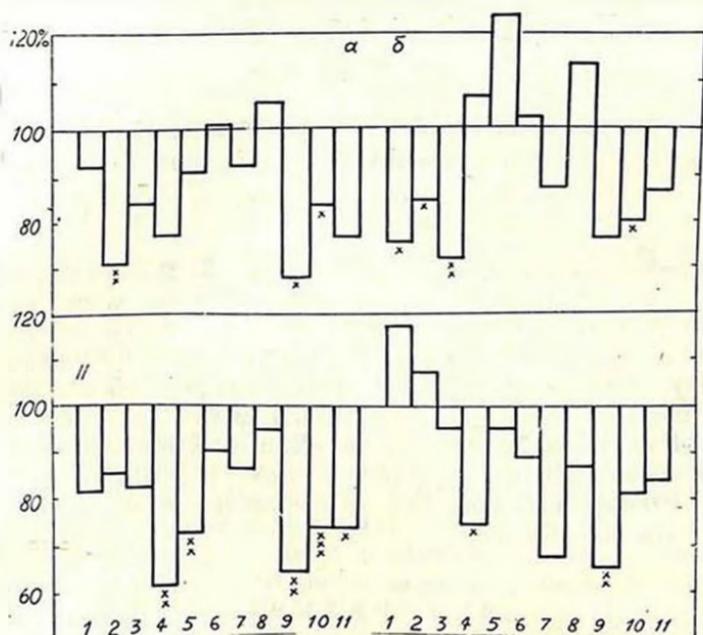


Рис. Активность альдегиддегидрогеназы с ацетальдегидом (а) и бензальдегидом (б) в качестве субстратов в структурах мозга крыс с различной алкогольной мотивацией, подвергнутых острому стрессу. За 100% приняты значения контрольных животных. I—крысы, предпочитающие воду, II—крысы, предпочитающие этанол. 1—наружный зернистый слой сенсомоторной коры мозга; 2—стриатум; 3—чувствительное ядро тройничного нерва; 4—нейроны ганглиозного слоя сенсомоторной коры; 5—капилляры сенсомоторной коры; 6—клетки Пуркинье мозжечка; 7—капилляры мозжечка; 8—глиоциты мозжечка; 9—эпендимоциты бокового желудочка; 10—эпендимоциты сосудистого сплетения; 11—мотонейроны спинного мозга; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ по сравнению с контролем

Таким образом, острый стресс вызывает снижение альдегидметаболизирующей способности нейронных и барьерных структур мозга, что может приводить к нарушениям в ЦНС, создающим дополнительные условия для накопления в нем альдегидов различного происхождения. Эти изменения более выражены у крыс, предпочитающих этанол, что может быть связано с повышенной чувствительностью их мозга к стрессу.

ALDEHYDE-METABOLIZING CAPACITY IN THE BRAIN OF RATS WITH DIFFERENT PREFERENCE TO ALCOHOL UNDER THE CONDITIONS OF ACUTE STRESS

Zimatkin S.M., Pronko P.S.,
Tarasov Yu.A.

*Institute of Biochemistry, Academy of
Sciences of Byelorussian SSR, Grodno*

The activity of aldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.3) decreased in several CNS regions of rats subjected to acute immobilization stress, which was accompanied by a drastic increase in the level of 11-hydroxycorticosteroids in blood and adrenals. The level of endogenous ethyl alcohol in the brain decreased concomitantly. These changes depended on the initial preference to alcohol and were most distinct in rats with high alcohol motivation, which are more stress-sensitive. Decreased capacity to oxidize aldehydes in neuronal and barrier brain structures alongside with activation of aldehyde production in the brain and at the periphery may contribute to the accumulation of aldehyde and consequent CNS disturbances.

ЛИТЕРАТУРА

1. Vogel W., De Turck K., Miller J.M. *Biochem.Pharmacol.*, v.35, №22, p.3983—3987, 1986.
2. Меерсон Ф.З., Каган В.Е., Прилипко Л.Л. *Бюл.эксперим.биол. и мед.*, т.89, №12, с.661—663, 1980.
3. Погодаев К.И., Турова Н.Ф. *Биохимия мозга при утомлении и истощении*, М., Медицина, 1972.
4. Гуляева Н.В., Хошичева Н.М., Обидин А.Б. *Нейрохимия*, т.6, №2, с.259—262, 1987.
5. Бура Ю.В., Ведерникова Н.Н. *Нейрохимия и фармакология алкоголизма*, М., Медицина, 1985.
6. Островский Ю.М., Садовник М.Н., Баньковский А.А., Обидин В.П. *Докл.АН БССР*, т.27, с.273—275, 1983.
7. Садовник М.Н., Сатановская В.И. — В кн.: *Этанол и обмен веществ*, с.42—54, Минск, Наука и техника, 1982.
8. Усватова И.Я., Панков Ю.А. — В кн.: *Современные методы определения кортикостероидов в плазме крови*, с.38—48, М., Медицина, 1968.
9. Пронко П.С., Шишкин С.Н., Колесников В.Б., Волянец С.И., Островский Ю.М. *Журн.невропатол. и психиатрии*, т.87, №3, с.417—422, 1987.
10. Зиматкин С.М., Сатановская В.И., Островский Ю.М. *Докл.АН БССР*, т.29, с.466—469, 1985.
11. Ломенко И.Е., Черникевич И.П. — В кн.: *Фундаментальные достижения нейрохимии—медицине*, с.47—48, Горький, АН СССР, 1987.
12. Phillips S. *Drug and Alcohol Depend.*, v.16, №3, p.273—277, 1985.
13. Богданова Е.Д., Каган В.Е., Кулиев И.Я. *Иммунология*, №2, с.65—66, 1981.

Поступила 27.05.1988

УДК 577.171.4:327.2

ТЕСТИРОВАНИЕ НА МОДЕЛЯХ АГРЕССИВНОГО ПОВЕДЕНИЯ КРЫС И МЫШЕЙ ТРИПЕПТИДА pGluAsnGly

Рылов А.Л., *Уткин Ю.Н.

· Институт нормальной физиологии им.П.К.Анохина АМН СССР
*Институт биоорганической химии им.М.М.Шемякина АН СССР, Москва

В 1979 г. Reichelt и соавт. (Институт педиатрических исследований, Осло) выделили из мочи больных генерализованной липодистрофией ранее неизвестный трипептид pGluAsnGly, однократные инъекции которого мышам вызывали спонтанные агрессивные схватки [1]. Тест заключается в том, что самцов мышей, получивших это вещество, помещали в отдельные клетки и подсаживали к ним мышью-самца (интродера). При этом получившие пептид мыши-хозяева клеток (резиденты) атаковали интродеров и наносили им серьезные ранения [1].

Целью данной работы явилось изучение агрессивного действия указанного трипептида на различных моделях агонистического поведения у крыс и мышей.

Трипептид pGluAsnGly синтезировали классическим методом, используя для конденсации активированные нитрофениловые эфиры. Для защиты С-концевой карбоксильной группы применяли бензиловый эфир, а амидной функции—pGlu-бензилоксикарбонильную группу. В результате конденсации бензилового эфира глицина с п-нитрофениловым эфиром Вос-аспарагина получали дипептид Вос-Asn-Gly-OBzl. После удаления Вос-группы смесью трифторуксусной и уксусной кислот образующееся соединение конденсировали с п-нитрофениловым эфиром Z-пироглутаминовой кислоты. В результате этой реакции получали защищенный трипептид Zp-Glu-Asn-Gly-OBzl (Rf=0,33; хлороформ : метанол 9:1; /M+H⁺525). После удаления защитных групп смесью трифторуксусная кислота : трифторметансульфокислота : тиоанизол (10:1:2,2) деблокированный пептид осаждали из этанола эфиром (Rf=0,3; бутанол : уксусная кислота : вода—3:1:1; /M+H⁺301). Окончательную очистку трипептида проводили методом ВЭЖХ на колонке Zorbax ODS в системе метанол—вода.

Использовали модели агрессивного поведения: агрессию изолированных самцов, хищническую и электроболеву агрессию, которые отражают важнейшие формы указанного поведения, существующие в природе—внутривидовую агрессию самцов, межвидовую и защитно-оборонительную агрессию [2].

Для проверки действия пептида в первой модели использовали самцов белых беспородных мышей массой 20 - 40 г, содержащихся в отдельных клетках в течение 3 суток и становившихся таким образом резидентами. Для тестирования агрессивных реакций в клетку к каждому резиденту на 15 мин помещали самца мыши (интродер) и подсчитывали количество резидентов, атакующих интродеров, а также количество атак с укусами, осуществляемых резидентами.

Таблица

Уровень внутривидовой агрессивности изолированных самцов мышей по показателям количества агрессивных животных (в %) и частоты атак против интродеров за 15 мин тестирования до и после п/к и в/ж инъекций трипептида

| Вид инъекции и количество животных | Время после инъекции | | | | | | | | | | | |
|------------------------------------|----------------------|---------------------------|-------|--------|-----------------|---------|------|--------------------|------|--------|----|--------|
| | До инъекции | | 5 мин | | 60 мин | | 24 ч | | 48 ч | | | |
| | I** | II | I | II | I | II | I | II | I | II | | |
| п/к инъекция пептида | 1 | агрессивные мыши (n=7) | 100 | 26,4±2 | 42* | 5,0±2* | 58 | 12,6±2* | 58 | 23,7±3 | 67 | 18,7±3 |
| | нм | неагрессивные мыши (n=5) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 20 | 4 |
| п/к инъекция пептида | 10 | агрессивные мыши (n=6) | 100 | 17,8±3 | 50* | 6,7±3* | 100 | 13,5±2 | 100 | 14,5±4 | 83 | 16,1±5 |
| | нм | неагрессивные мыши (n=6) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 17 | 2 | 0 | 0 |
| п/к инъекция пептида | 100 | агрессивные мыши (n=8) | 100 | 14,1±1 | 75 | 8,9±4 | 87 | 10,1±2 | 75 | 12,0±4 | 87 | 10,7±4 |
| | нм | неагрессивные мыши (n=5) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| в/ж инъекция пептида | физ. раствор | агрессивные мыши (n=9) | 100 | 17,0±1 | 77 | 5,1±2* | 77 | 14,6±4 | 88 | 15,4±4 | 88 | 19,9±3 |
| | нм | неагрессивные мыши (n=4) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| в/ж инъекция пептида | 10 | агрессивные мыши (n=10) | 100 | 22,2±1 | 10 ⁺ | 0,2±0,2 | 30* | 2,1±1 ⁺ | 77 | 9,4±2* | 77 | 15,9±4 |
| | нм | неагрессивные мыши (n=10) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| в/ж инъекция пептида | физ. раствор | агрессивные мыши (n=4) | 100 | 21,7±4 | 0 | 0 | 75 | 3,5±2* | 75 | 9,5±4* | 75 | 15,5±7 |

Примечание. * $p < 0,05$; I** — количество в % агрессивных самцов мышей, атакующих интродеров II — количество атак со стороны резидентов против интродеров.

По окончании указанного этапа оказалось, что из 74 отобранных в опыт мышей агрессивность проявляли 44 животных, а у 30 она отсутствовала. В дополнение к методике Reichelt и соавт. [1], влияние пептида исследовали как на мышях, проявляющих агрессивность, так и на живот-

ных с заведомым отсутствием указанных реакций. Кроме того, были использованы повышенные дозы пептида. Для повышения эффективности воздействия применяли также внутримозговые (в/ж) инъекции пептида. Все животные были разделены на две группы, и им были сделаны инъекции пептида и физиологического раствора в левый желудочек мозга (таблица). После указанных введений тестирование агрессивных реакций осуществлялось через 5 мин, 24 и 48 ч так же, как и на подготовительном этапе при отборе агрессивных и неагрессивных животных. Статистический анализ проводили по критериям Стьюдента и Пирсона.

Как показывают данные, суммированные в таблице, подкожное (п/к) и в/ж введение пептида во всех дозах и на всех сроках тестирования не оказывало достоверного агрессивного эффекта по обоим показателям. Наоборот, через 5—60 мин после п/к и 5 мин—24 ч после в/ж инъекций пептида и физиологического раствора агрессивность мышей достоверно снижалась, что могло быть вызвано неспецифическими эффектами операционной процедуры. Через 24 ч после п/к введения пептида в дозе 10 нм и через 48 ч после инъекций вещества в дозе 1 нм по одной мыши из данных групп несколько раз атаковали интродеров. Однако статистический анализ не выявил достоверных отличий по сравнению с контрольными группами (таблица).

Во 2-ой и 3-ей сериях опытов изучали влияние трипептида на формируемое и сформированное поведение убийства крысами мышей (мурицид). Пептид в дозе 10 нм (в 20 мкл физиологического раствора) или физиологический раствор (20 мкл) вводили однократно в латеральные желудочки мозга беспородных белых крыс-самцов массой 200-250 г. Во 2-ой серии использовали по 10 крыс, получавших инъекции пептида или физиологического раствора. Сразу же после инъекций животных изолировали и в течение 4 дней лишали пищи с общей целью индукции у них мурицидности. Мурицидность, оцениваемую по числу крыс, убивающих мышей, тестировали ежедневно с 1 по 4 суток изоляции, для чего в клетку к крысе на 60 мин подсаживали беспородную мышь. В 3-ей серии опытов изучали влияние пептида на сформированную под влиянием изоляции и пищевой депривации мурицидность. Пептид и физиологический раствор так же, как и во 2-ой серии, инъецировали 2 группам, включающим по 5 животных, у которых было предварительно выработано поведение убийства мышей. Тестирование проводили в течение 4 дней.

Результаты экспериментов показали, что инъекции трипептида не оказывают достоверного влияния ни на формирование у крыс мурицидности, ни на сформированную агрессивность крыс-убийц мышей.

В 4-ой серии опытов исследовали влияние трипептида на электролевою агрессивность крыс. Опыты проводили на самцах беспородных белых крыс массой 200-250 г, содержащихся по 6 животных в клетке. Инъекции трипептида вводили 6 животным в дозах 10 нм п/к и интрацеребрально, как во 2-ой и 3-ей сериях опытов. Контрольные группы получали физиологичес-

кий раствор.

Тестирование агрессивности крыс, попарно помещаемых на электрифицированную решетку, проводили через 30 мин и далее через 1 и 24 ч после введения вещества по ранее описанной методике [2]. Результаты опытов показали, что трипептид после п/к и в/ж введений не оказывает достоверного влияния на уровень электроболевого агрессивности крыс по сравнению с контрольными группами.

За все время наблюдения крыс и мышей после введения трипептида во всех дозах п/к и в/ж введений не отмечалось каких-либо побочных или токсических эффектов.

Общий вывод, который следует из проведенной работы, состоит в том, что инъекции трипептида pGluAsnGly не оказывают достоверного влияния на межсамцовую агрессивность мышей (1—100 нм п/к и 10 нм в/ж), хищническую и электроболевою агрессивность крыс (10 нм п/к и в/ж) и не вызывают в этих дозах побочных или токсических эффектов.

Следовательно, результаты, полученные Reichelt и соавт. в описанных условиях, не удалось воспроизвести. Характерно, что инъекции трипептида не только не оказывали воздействие на агрессивность животных, но и вообще никак не отражались на их поведении. Между тем, интрацеребральная доза 10 нм является достаточно высокой, и практически все известные биологические пептиды при введении в таких же количествах вызывали те или иные изменения в поведении крыс и мышей вплоть до токсических эффектов.

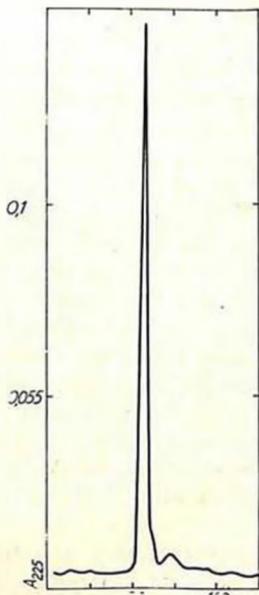


Рис. Очистка 2,5 мг трипептида pGluAsnGly на колонке Zorbax ODS (21,9×250 мм). Условия элюирования: 5%-ный метанол в 0,1%-ной трифторуксусной кислоте, скорость 10мл/мин

EFFECT OF TRIPEPTIDE pGluAsnGly ON AGGRESSIVE BEHAVIOR OF MICE AND RATS

Rylov A.L., * Utkin Yu.N.

*Anokhin Institute of Normal Physiology, USSR Academy of Medical Sciences
Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, USSR Academy of Sciences, Moscow

Biological activity of tripeptide pGluAsnGly synthesized by the classical method was tested on three models of aggressive behaviour (isolated male aggression, predatory aggression and aggression provoked by the electric shock). The tripeptide induced no aggression in mice and rats even at high doses and did not affect the animal behavior. .

ЛИТЕРАТУРА

1. Reichelt K.L., Trygstad O.E., Foss I., Johansen J.H. Psychopharmacology of aggression (ed.M.Sandler), Raven Press, N.Y.,p.159 - 166,1979.
- 2.Valzelli L. Progr. Neuro-psychopharmacol.,v.2, p.591 - 613,1978.

Поступила 27.11.1988

УДК 547.612.018+543.963.3

ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ГИСТОНОВ И ХРОМАТИНА ГОЛОВНОГО МОЗГА БЕЛЫХ КРЫС ПРИ ОДНОСТОРОННЕЙ ГАНГЛИОСИМПАТЭКТОМИИ

Карагезян К.Г., *Овсян Г.А.,
*Кочарян К.М.

*Институт экспериментальной биологии АН АрмССР, Ереван
Ереванский государственный медицинский институт

Многочисленными исследованиями установлено адаптационно-трофическое действие симпатической нервной системы на ЦНС. Об этом свидетельствуют изменения в условно-рефлекторной деятельности организма после повреждения различных отделов симпатической нервной системы. Однако биохимические и молекулярно-биологические механизмы этого действия в литературе освещены недостаточно. Общеизвестно, что в формировании структуры хроматина, содержащего ДНК, гистоны, негистоновые белки, небольшое количество хромосомной РНК и липидов [1], в его пространственной организации важная роль принадлежит гистонам и липидам. Ранее были показаны сдвиги в количественном и фракционном составе гистонов мозга крыс при односторонней ганглиосимпатэктомии [2]. Предполагалось, что изменения во фракционном составе гистонов связаны с конформационными изменениями гистоновой молекулы.

Целью настоящего исследования явилось изучение на фоне ганглиосимпатэктомии флуоресцентных характеристик суммарных гистонов, а также структурной организации хроматина методом инфракрасной спектроскопии.

Эксперименты проводили на белых беспородных крысах обоего пола массой 180—200 г, содержащихся на обычном пищевом рационе. Правый верхний шейный симпатический узел удаляли под легким эфирным наркозом. О достоверности произведенной операции судили по развивающемуся синдрому Клода-Бернара-Горнера (четко выраженный энтофтальм, сужение глазной щели и зрачка). Животных декапитировали под легким эфирным наркозом через 7 суток после экстирпации узла. Ядра выделяли по методу Dingman, Sporn [3]. Хроматин получали по методу Shaw, Huang [4]. Выделение тотальных гистонов проводили по методу Vopner и соавт. [5]. Флуоресценцию гистонов изучали в 0,1 М трис-НСl буфере, рН 8,0, в концентрации 25 мкг/мл в прямоугольных кварцевых кюветах 1×1 см

при комнатной температуре на флуоресцентном спектрофотометре MPF-2A («Hitachi», Япония) при максимальной чувствительности прибора и минимальной ширине щелей 7 обоих монохроматоров (не выше 6 мкм). Инфракрасные спектры хроматина изучали на спектрофотометре «Specord» 75 JR (ГДР). Содержание белка в пробах определяли по методу Lowry и соавт. [6]

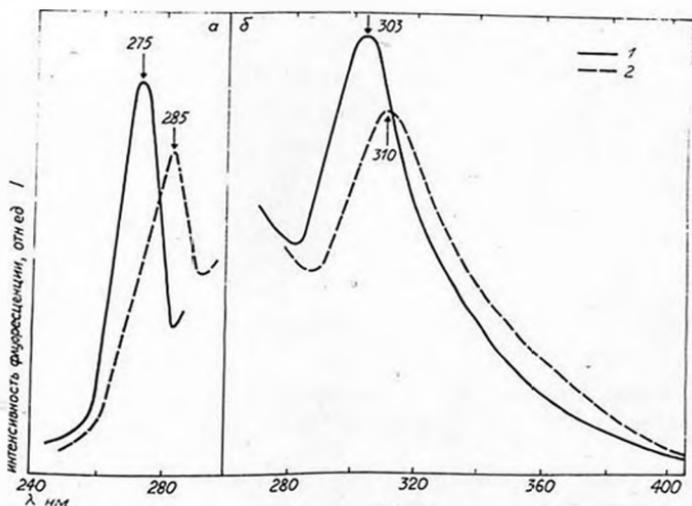


Рис.1. Спектры экстинкции (а) при E_{mW} - 303 нм и эмиссии (б) при E_{mW} - 275 нм гистонов, полученных из хроматина: 1 - контрольного, 2 - ганглий эктомированного полушарий мозга белых крыс. Ширина щелей монохроматоров экстинкции и эмиссии - 6 нм

Результаты проведенных исследований в виде средних данных представлены на рис.1,2. Гистоны (рис.1,а,б), выделенные из хроматина головного мозга контрольных животных, имеют следующие флуоресцентные характеристики: максимум спектра экстинкции при 275 нм и максимум спектра эмиссии при 303 нм. Максимум спектра эмиссии при 303 нм, соответствующий свечению тирозинилов, обусловлен флуоресценцией тирозина. Флуоресцентный анализ гистонов хроматина мозга после ганглиосимпатэктомии показал (рис.1, б), что максимумы спек λ_{Ex} — 310 нм) с подавлением квантового выхода флуоресценции, более выраженные у гистонов хроматина эктомированного полушария мозга. Описанный эффект ранее был отмечен в исследованиях Давтяна и соавт. [7] при индуцировании хроматина печени гидрокортизоном, а также на фоне голодания, высокобелковой диеты и введения смеси аминокислот. На наш взгляд, сдвиг во флуоресцентных характеристиках гистонов при ганглиосимпатэктомии происходит только за счет конформационных перестроек тирозиновых комплексов, а не проявления флуоресценции триптофана, который в гистонах отсутству-

ет. Это предположение основано на литературных данных, указывающих на типичное триптофановое свечение в белках, не содержащих триптофана [8,9]. На основании полученных результатов можно прийти к заключению, что подавление фосфорилируемости гистонов, показанное нами ранее [10], является следствием изменения конформации гистоновой молекулы, что в свою очередь может привести к изменению структурной организации хроматина.

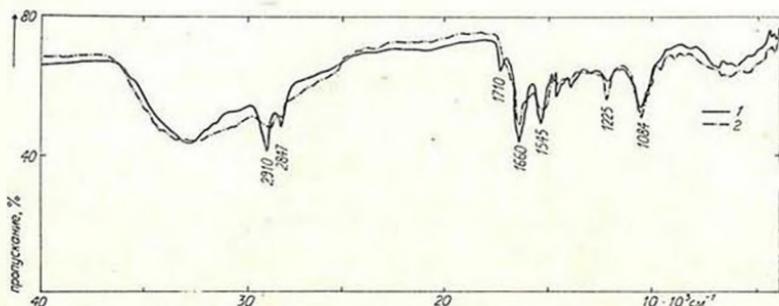


Рис.2. Инфракрасные спектры неориентированных пленок хроматина, полученного из: 1 - контрольного, 2 - ганглии эктомированного полушарий мозга белых крыс

Инфракрасные спектры неориентированных пленок нативного хроматина правого полушария мозга крыс (рис.2) показали, что характерные для дезоксирибонуклеопротеидов полосы с частотами 1710, 1225 и 1084 см^{-1} претерпевают изменения на 7-е сутки после ганглиосимпатэктомии [11]. Это, в частности, касается полосы с частотой 1710 см^{-1} (показывающей сильно выраженный перпендикулярный дихроизм), которая исчезает. Такое наблюдается при высушивании или обработке дезоксирибонуклеопротеидов дезоксирибонуклеазой [11]. Полосы со частотами 1225 и 1084 см^{-1} (в меньшей степени) становятся интенсивными. Это свидетельствует об изменении водородных связей фосфатных групп [11,12]. А полосы Амид 1 при 1660 см^{-1} (валентные колебания С=О групп) и Амид 2 при 1545 см^{-1} (деформационные колебания N-H групп) становятся менее интенсивными. Сказанное свидетельствует об изменении ДНК-белок взаимодействия [13]. Показаны также изменения в интенсивности полос 2910 и 2847 см^{-1} (рис.2), которые, как и исчезновение полосы с частотой 1710 см^{-1} , по-видимому, вызваны изменением ДНК-липид взаимодействия [13—15]. Хроматин интактного полушария мозга таких выраженных изменений не претерпевает.

Таким образом, полученные данные показали, что конформация гистоновой молекулы, ДНК-белок, ДНК-липид, белок-липид взаимодействий хроматина сопровождается изменениями структурной организации хроматина.

PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF HISTONES AND CHROMATIN FROM RAT BRAIN AFTER UNILATERAL GANGLIOSYMPATHECTOMY

Karagezian K.G.,* Hoveyan G.A.,

*Kocharyan K.M.

*Institute of Experimental Biology,
Armenian SSR Academy of Sciences, State
Medical Institute, Yerevan*

Fluorescent characteristics of histones and infrared spectra of chromatin were studied after unilateral gangliosympathectomy (removal of the upper cervical sympathetic ganglion). Changes in the physico-chemical properties of E histones and chromatin after the procedure were observed. Unilateral gangliosympathectomy led to an altered conformation of histone molecules and modified structural organization of chromatin.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Хесин Р.Б., Лейбович Б.А. Молекуляр. биология, т.10, N1, с.3 — 33, 1976.
2. Мхехян Э.Е., Кочарян К.М. *Вопр. биохимии мозга*, т.13, с.138 — 143, Ереван, 1978.
3. Dingman C.W., Sporn M.B. *J. Biol. Chem.*, v.239, p.3483 — 3488, 1964.
4. Shaw L.M., Huang R.C. *Biol. Chem.*, v.9, p.4530 — 4538, 1970.d
5. Bonner J., Chalkley G.R., Dahmus M., Fambrough D., Fujimura F., Huang R.C., Huberman J., Jensen R., Marushige K., Ohlenbusch H., Olivera B., Widholm J. *Methods in Enzymology*, v.12, p.3 — 10, 1968.
6. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. *J. Biol. Chem.*, v.193, p.265 — 275, 1951.
7. Дагян М.А., Казарян Р.Р. *Биол. журн. Армении*, т.34, N5, с.498 — 501, 1981.
8. Kitagawa T., Ting J. J. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, v.45, p.1227 — 1230, 1971.
9. Мардамян С.С., Демин Ю.М. *Биохимия*, т.42, с.1024 — 1029, 1977.
10. Мхехян Э.Е., Кочарян К.М., Киракосова А.С. *Биол. журн. Армении*, т.33, N6, с.660 — 663, 1980.
11. Tsuboi M.J. *Applied Spectroscopy Reviews*, v.3, N1, p.45 — 90, 1969.
12. Верболович В.П. — В кн.: *Инфракрасная спектроскопия биологических мембран*. Алма-Ата, Наука, 1977.
13. Жижина Г.П., Олейник Э.Ф. *Успехи химии*, т.41, N3, с.474—511, 1972.
14. Шабаршина Л.И., Сухоруков Б.И., Кувичкин В.В. *Биофизика*, т.24, N6 с.990—997, 1979.
15. Shabarshina L.J., Sukhorikov V.J. *J. Stud. biophys.*, v.79, p.33—34, 1980.

Поступила 10.10.1988.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 612.822.1:577.112.083

**ВЫДЕЛЕНИЕ ОПИАТСВЯЗЫВАЮЩИХ МЕМБРАННЫХ
БЕЛКОВ С ПОМОЩЬЮ β -ЭНДОРФИН- ω -
АМИНОГЕКСИЛСЕФАРОЗЫ**

Изыкенова Г.А., Таранова Н.П.

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

Получен аффинный сорбент β -эндорфин- ω -аминогексилсефароза 4В, который применен для выделения опиатсвязывающих белков из синаптических мембран головного мозга крыс. Выделены две основные фракции белков, обладающие сродством к [3 H]налоксону. Выделенные белки исследованы с помощью электрофокусирования и ДДС-Na-электрофореза. Показано, что использование сорбента с иммобилизованным эндогенным пептидом дает возможность выделить опиатсвязывающие мембранные белки.

* * *

Для понимания механизмов функционирования ЦНС представляет интерес изучение структуры и функций опиатных рецепторов головного мозга. Решение этих задач требует выделения и очистки опиатных рецепторов в нативном состоянии из ткани мозга. К настоящему времени описаны результаты выделения опиатсвязывающих мембранных белков из головного мозга млекопитающих, которые относят к опиатным рецепторам μ -и/или δ -типа [1—6]. При очистке этих рецепторов были использованы аффинные сорбенты, содержащие в качестве специфических лигандов фармакологические препараты—производные кодеина и морфина или ковалентно иммобилизованный (D-Ala², Leu⁵)-энкефалин (DALA)—синтетический аналог Leu-энкефалина [7, 8]. Эндогенные опиоидные пептиды (эндорфины, Met- и Leu-энкефалины) для этой цели не применяли, возможность их использования для аффинной очистки опиатных рецепторов остается проблематичной. Однако эта задача представляет несомненный интерес в плане сравнительного изучения опиатных рецепторов, выделенных с использованием сорбентов, содержащих иммобилизованные природные и синтетические опиоидные лиганды.

Цель настоящей работы—выделить опиатсвязывающие белки из синаптических мембран головного мозга крыс с помощью нового аффинного сорбента, содержащего ковалентно иммобилизованный β -эндорфин.

Выбранный нами эндогенный пептид обладает высоким сродством к μ - и δ -типам опиатных рецепторов [9]. Следовало ожидать, что примененный

аффинный сорбент будет связывать преимущественно μ - и δ -рецепторы. Кроме того, в отличие от пентапептидов, аналогов Leu- и Met-энкефалинов β -эндорфин устойчив к действию аминопептидаз, которые могут быть солюбилизированы из синаптических мембран [10].

Материалы и методы

В опытах использовали крыс-самцов линии *Wistar* массой 150—200 г.

Выделение синаптических мембран из головного мозга крыс проводили методом дифференциального центрифугирования с некоторыми модификациями [11]. Ткань мозга (25 г) гомогенизировали в 10-кратном объеме 0,32 М раствора сахарозы в рабочем буфере (1 мМ фенилметилсульфонилфлуорид, 10 мкг/мл бацитрацин, 0,05 М трис-HCl, pH 7,5), центрифугировали в течение 20 мин при 2000 г. Надосадочную жидкость затем центрифугировали при 10000 г в течение 20 мин, полученный осадок ресуспендировали в 10-кратном объеме бидистиллированной воды и после осмотического шока (10 мин, 4°) центрифугировали при 100000 г в течение 40 мин. Осадок суспендировали в 5 мл холодной бидистиллированной воды, наносили на ступенчатый градиент сахарозы 0,4-0,6-0,8-1,0-1,2 М и центрифугировали при 100000 г в течение 2 ч. Отбирали фракции синаптических мембран на границе 0,6-0,8 М и 0,8-1,0 М сахарозы, затем осаждали их центрифугированием в течение 40 мин при 100000g.

Солюбилизацию синаптических мембран проводили в рабочем буфере, содержащем 0,5% дигитонина и 1 мМ Na ЭДТА, при температуре 0° в течение 20 мин. Несолюбилизованные мембраны осаждали центрифугированием в течение 30 мин при 100000 г и отбрасывали. Для удаления избытка детергента супернатант очищали и концентрировали 15—20 раз ультрафильтрацией на приборе ФМ 02-10 (Мукачево, СССР) через мембранные фильтры РМ-10 («Amicon», Голландия). Количество белка определяли по методу Essen [12].

Выделение оптически связывающих мембранных белков из солюбилизата проводили с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-100 fine («Pharmacia», Швеция). На колонку (1,6×50 см) наносили 3—4 мл раствора белка (7—8 мг) в рабочем буфере. Элюцию проводили рабочим буфером со скоростью 15 мл/ч и регистрировали оптическую плотность растворов с помощью прибора Uvicord-S («LKB», Швеция). Отбирали фракции по 2,0 мл.

Для дальнейшей очистки объединяли лишь фракции, обладающие способностью специфически связывать [³H]налоксон, которую определяли в предварительных опытах: аликвоты солюбилизованных мембранных белков (3 мл, концентрация белка 1 мг/мл), очищенные от избытка детергента, инкубировали с 10 нМ [³H]налоксона (44,4 Ки/ммоль, «Amersham», Англия) в присутствии 1 мкМ немеченого налоксона («Serva», ФРГ) в течение 20 мин при 37°. Параллельно инкубировали пробы без

немеченого налоксона. Реакцию останавливали охлаждением раствора до 0° (5 мин) и проводили гель-фильтрацию по описанной выше методике. Радиоактивность проб измеряли в диоксановом сцинтиллаторе [13] на счетчике Isoscap-300 («Трасог-Еурога», Нидерланды). Для определения величины M_r выделяемых при гель-фильтрации опиятсвязывающих мембранных белков предварительно калибровали колонку с помощью стандартных белков: БСА (M_r 66 кД), пепсина (M_r 35 кД), цитохрома С (M_r 12,3 кД). Концентрация белков-маркеров—1 мг/мл, объем раствора, нанесенного на колонку—3 мл.

Приготовление аффинного сорбента. Получение аффинного сорбент β -эндорфин- ω -аминогексилсефарозы 4В основано на реакции иммобилизации пептида за счет его свободных карбоксигрупп, взаимодействующих с образованием ковалентной связи с активными аминогруппами ω -аминогексилсефарозы 4В. Учитывая, что в молекуле β -эндорфина имеются две свободные карбоксигруппы, можно предположить, что пептид взаимодействует одновременно с двумя аминогруппами «спейсера» сефарозы. Активный центр пептида (тираминовая группа) остается в этом случае свободным для взаимодействия с опиатными рецепторами [14]. В качестве основы для разработки метода получения сорбента использовали методику получения аффинных сорбентов, содержащих ковалентно иммобилизованные аминокислоты [15], внося некоторые модификации.

Коммерческий сорбент ω -аминогексилсефарозу 4В (3 г) обрабатывали стандартным способом для удаления стабилизатора [16] и переносили гель в 2 мл раствора, содержащего 3 мг β -эндорфина («Sigma», США) и 200 мкг бацитрацина в рабочем буфере. К раствору добавляли 10 мкг N-цикло-N-(2-морфолиноэтил)-карбодимидметил-пара-толуолсульфоната («Fluka AG», Швейцария) и с помощью 0,1 н. раствора HCl доводили pH среды до 4—5. Смесь оставляли при перемешивании на 1,5 ч при комнатной температуре и далее на 14—15 ч при 4°. По окончании реакции гель отмывали 200 мл дистиллированной воды на фильтре Шотта (N3). Свободные аминогруппы ω -аминогексилсефарозы после связывания с пептидом блокировали 1 М раствором этаноламина [16]. Перед применением аффинный сорбент отмывали в буферных растворах по схеме, представленной в работе Дамбиновой, Беседина [15]. Содержание β -эндорфина в полученном аффинном сорбенте (определяли по разности количества пептида в исходном растворе и промывных водах по методу Essen) составляло 60 нМ/мл геля.

Аффинную хроматографию опиятсвязывающих мембранных белков, выделенных с помощью гель-фильтрации, проводили на колонке (0,7×16 см), заполненной β -эндорфин- ω -аминогексилсефарозой 4В в рабочем буфере. На колонку наносили 1 мл сконцентрированного раствора белка, полученного после гель-фильтрации (1,6 мл) и отмывали 50-кратным объемом рабочего буфера неспецифически сорбированные белки. Специфически связавшиеся с β -эндорфином белки элюировали в линейном градиен-

те солевого раствора (0—1,0 М NaCl в рабочем буфере, общий объем 100 мл). Отбирали фракции по 1,0 мл, объединяя фракции каждого белкового пика, которые регистрировали с помощью Uvicord-S.

Специфическое связывание меченого налоксона с исследуемыми белками изучали по методу Bidlack и соавт. [2] с некоторыми модификациями. Пробы белков (по 100 мкг на первых стадиях выделения и по 10 мкг после аффинной очистки) инкубировали в 0,5 мл раствора, содержащего 10 нМ [³H]налоксона (44,4 Ки/ммоль, «Amersham», Англия) в течение 20 мин при 37°. Одновременно инкубировали параллельные пробы, содержащие избыток немеченого налоксона (1 мкМ, «Serva», ФРГ). Реакцию останавливали охлаждением раствора до 0°, добавляли 0,2 мл охлажденного раствора БСА (10 мг/мл) и 0,4 мл 30%-ного раствора ПЭГ-6000 («Serva», ФРГ). Растворы фильтровали через стекловолокнистые фильтры GF/C («Whatman», Англия), предварительно вымоченные в 0,3%-ном растворе полиэтиленimina и промывали 5 мл 7,5%-ного раствора ПЭГ-6000. После фильтрации фильтры подсушивали и помещали в вials с диоксановым сцинтиллятором, радиоактивность проб определяли на счетчике Isoscap-300.

Электрофокусирование выделенных с аффинного сорбента фракций белков, проявивших высокое сродство к [³H]налоксону, проводили с использованием коммерческих гелей Servalyte-Precotes, pH 3-10 («Serva», ФРГ) [13]. Размеры блока геля 125×125×0,3 мм, анодный электрод—раствор, содержащий L-аспарагиновую кислоту (25 мМ) и L-глутаминовую кислоту (25 мМ); катодный электрод—раствор, содержащий аргинин (23 мМ), L-лизин (4 мМ) и этилендиамин (2,0 М). Величина силы тока—50 мА, напряжение—500 В. Процесс вели в течение 2-3 ч при 4°. Гели фиксировали в 10%-ной ТХУ и окрашивали в красителе Serva Blue W («Serva», ФРГ). Изоэлектрические точки выделенных мембранных белков определяли, используя стандартный набор белков-маркеров («Serva», ФРГ).

Диск-электрофорез исследуемых мембранных белков на разных стадиях выделения выполняли в 10%-ном ПААГ в присутствии 0,1% ДДС-Na [17]. Электрофорез проводили 4 ч при 10° (сила тока 60 мА, напряжение 140 В). Столбики геля фиксировали в смеси уксусная кислота/этанол/вода (10:25:65 v/v) и окрашивали в 1%-ном растворе Кумасси R-250. Для определения величины M_r выделенных белков использовали стандартный набор белков-маркеров («Sigma», США).

Результаты и обсуждение

Во всех аналогичных работах по выделению опиатсвязывающих белков мембранных структур мозга с применением как фармакологических препаратов опиатов, так и аналога опиоидных пептидов, в качестве исходного материала использовали фракции тотальных мембран головного мозга. При обработке этого материала детергентами солибилизировались белки

не только нейрональных мембран, но и других мембранных структур: митохондрий, миелина, глии и др. Однако существуют данные о том, что опиатные рецепторы обнаружены и на мембранах глиальных клеток [18]. Возможно, что эти рецепторы могут иметь структурные и функциональные отличия от опиатных рецепторов нейронов. В связи с этим нам представлялось целесообразным выделять опиатсвязывающие белки не из тотальных мембран мозга, а из фракции синаптических мембран головного мозга крыс с тем, чтобы получить мембраны преимущественно нейронального происхождения.

Таблица

Опиатсвязывающие белки синаптических мембран головного мозга крыс на разных стадиях выделения и очистки

| Фракция белков | Количество белка, мг | Выход белка, % | Специфическое связывание [³ H] налуксона* | | |
|---|----------------------|----------------|---|--|----------------|
| | | | имп/мин/мг белка | в расчете на общее количество белка во фракции | |
| | | | | имп/мин | % от исходного |
| Фракция синаптических мембран | 40 | 100 | 97 ± 12 | 3880 | 100 |
| Осадок несольюбилизованных мембран (100000g) | 33 | 83 | 22 ± 9 | 726 | 19 |
| Супернатант сольюбилизованных белков (100000g) | 8 | 18 | 256 ± 24 | 2048 | 53 |
| Налуксонсвязывающие белки после гель-фильтрации | 1,6 | 4 | 1210 ± 51 | 1936 | 50 |
| Фракции белков после аффинной хроматографии: | | | | | |
| элюирование рабочим буфером | 1,0 | 2,5 | | | |
| элюированы 0,1 М NaCl | 0,1 | 0,25 | 112 ± 14 | | |
| элюированы 0,5 М NaCl | 0,2 | 0,80 | 3000 ± 21 | | |
| элюированы 1,0 М NaCl | 0,09 | 0,24 | 1560 ± 43 | | |

Примечание.* Все значения представлены для концентрации [³H] налуксона — 10 нМ; **обнаружены лишь следы радиоактивности.

Для сольюбилизации мембранных белков наиболее подходящими детергентами являются Тритон X-100, CHAPS, дигитонин [4,5,19,20]. В предварительных экспериментах мы использовали Тритон X-100. Однако оказалось, что работа с этим детергентом связана с рядом неудобств: сложностью удаления его избытка и, следовательно, трудностями при

дальнейшем исследовании выделенных белков. Наиболее существенным препятствием для использования Тритона X-100 в качестве солюбилизирующего детергента оказался низкий выход опиятсвязывающих мембранных белков. Поэтому нами был выбран более удобный в работе неионный детергент дигитонин, который солюбилизирует белки тотальной мембранной фракции мозга с высоким выходом опиятсвязывающих белков [21]. Кроме того, избыток этого детергента легко удаляется гель-фильтрацией солюбилизованных белковых растворов или их диализом.

В наших опытах при использовании 0,5%-ного раствора дигитонина солюбилизовалось 18—20% белков фракции синаптических мембран. Исследование взаимодействия солюбилизованных мембранных белков с [^3H]налоксоном показало, что они обладают способностью специфически связывать этот лиганд. Причем связывающая активность этих белков в 2,5 раза выше по сравнению с налоксонсвязывающей активностью исходной фракции синаптических мембран (таблица).

Мы считали целесообразным ввести предварительную стадию очистки солюбилизованных белков путем гель-фильтрации через колонку с сефадексом для того, чтобы удалить избыток детергента, который мешает связыванию выделенных белков с опиятными лигандами и может снижать эффективность связывания белков с лигандом аффинного сорбента. Кроме того, мы полагали, что эта процедура позволит отделить неактивные по отношению к опиятным лигандам белки тотального солюбилизата от интересующих нас белковых фракций с наибольшей опиятсвязывающей способностью. В качестве контроля активности выделенных опиятсвязывающих мембранных белков на каждой стадии очистки мы исследовали их связывание с антагонистом опиятных рецепторов — [^3H]налоксоном.

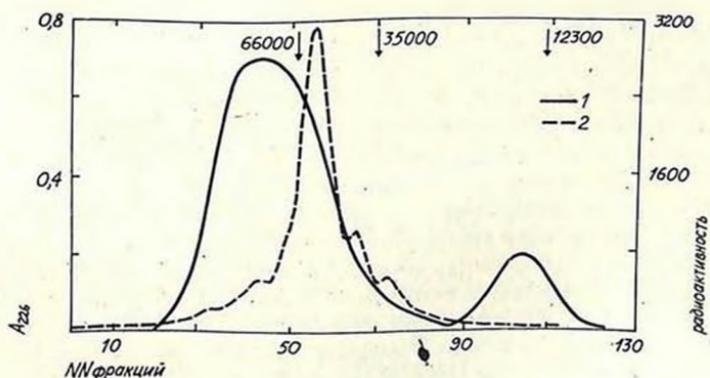


Рис. 1. Гель-хроматография солюбилизованной фракции синаптических мембран после инкубации с [^3H]налоксоном на сефадексе G-100. 1 — распределение белка, 2 — радиоактивность

Результаты гель-фильтрации белков солюбилизата, представленные на рис.1, свидетельствуют о том, что наибольшей способностью взаимодействовать с [^3H]налоксоном обладали белковые фракции 40—75, с величиной M_r 30—70 кД. На их долю приходилось не более 20% белков солюбилизата, нанесенного на колонку или 4% тотальных белков фракции синаптических мембран. Изучение равновесного связывания объединенной фракции с [^3H]налоксоном показало, что специфическое связывание радиолиганда с этими белками в 4—7 раза выше, чем с белками солюбилизата и в 12,4 раза выше, чем с фракцией синаптических мембран (таблица). Следовательно, полученные результаты подтверждают целесообразность введения предварительной очистки тотального солюбилизата. Действительно, после этой процедуры, как показывает сравнение суммарной активности солюбилизата и фракции 40—75, нами выделены практически без потерь все опиатсвязывающие белки солюбилизата (таблица).

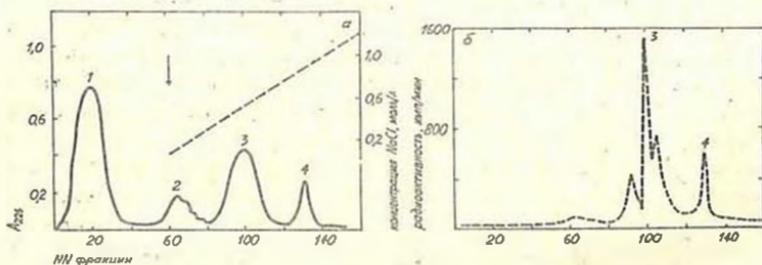


Рис.2. Аффинная хроматография на β -эндорфин- ω -аминогексилсефарозе 4В фракции 40—75. Сплошная линия—распределение белка; стрелкой указан момент повышения ионной силы элюирующего буфера (а); б—специфическое связывание выделенных фракций с [^3H]налоксоном

Дальнейшую очистку белков проводили на аффинном сорбенте β -эндорфин- ω -аминогексилсефарозе 4В. На рис.2 представлены результаты аффинной хроматографии объединенной фракции 40—75, выделенной при гель-фильтрации. Из профиля элюции белков с этого сорбента видно, что рабочим буфером вымываются фракции 7—35 (пик 1), содержащие «балластные» белки, не проявившие сродства к β -эндорфину. На долю этих белков приходится большая часть (до 63%) белков, нанесенных на аффинный сорбент (таблица). При замене элюента 0,1—0,2 М раствором NaCl с сорбента вымывались белки пика 2 (фракции 60—75), составлявшие 6—7% от нанесенных на колонку белков (рис.2, а). Эти фракции проявили слабое сродство к [^3H]налоксону (рис.2,б). При повышении ионной силы элюента (0,5 М NaCl) с колонки выходили белки пика 3 (фракции 100—115). Наиболее прочно связанные с сорбентом белки пика 4 (фракции 125—135) элюировались 1,0 М раствором NaCl (рис.2, а). Белки этих пиков проявили высокую активность при взаимодействии

с меченым налоксоном. Однако уровень специфического связывания радиолиганда с белками пика 3 был в 2 раза выше, чем с белками пика 4 (рис. 2, б, таблица). Таким образом, из синаптических мембран головного мозга крыс были выделены две наиболее активные фракции опиатсвязывающих белков, очищенных в 200 (пик 3) и в 400 раз (пик 4), но их связывающая активность при очистке возрастала в меньшей степени (таблица). Это, по-видимому, связано с тем, что в процессе выделения рецепторных белков происходит утрата микроокружения, необходимого белкам для проявления рецепторных свойств.

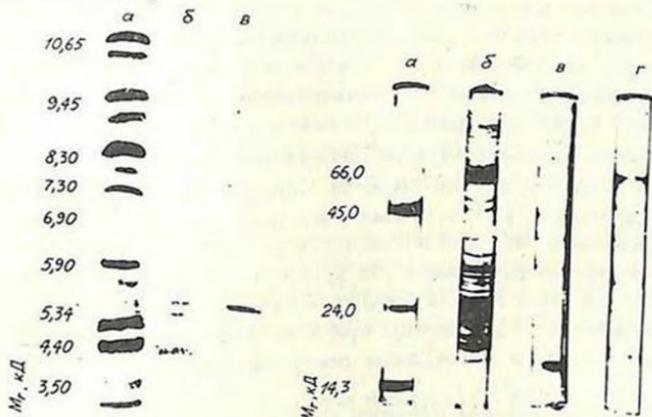


Рис.3. Электрофореграммы выделенных с аффинного сорбента налоксоносвязывающих белков: а — белки-маркеры, б — белки пика 3, в — белки пика 4

Рис.4. Электрофорез в ПААГ-ДДС-На синаптических мембранных белков: а — белки-маркеры, б — солюбилизованные мембранные белки, в — белки пика 3, г — белки пика 4

Для оценки степени гомогенности полученных опиатсвязывающих мембранных белков было проведено их исследование с помощью электрофокусирования (рис.3). Результаты эксперимента показали, что для белков пика 3 существуют 3 полосы: одна соответствует белку с pI 4,4 и две другие полосы с pI 5,3. Для белков пика 4 была обнаружена одна полоса белков с pI 5,3 (рис.3). Эти данные свидетельствуют о высокой степени гомогенности белков пика 4 и позволяют предположить, что, возможно, этот пик является индивидуальным белком, тогда как белки пика 3 состоят, по меньшей мере, из двух различных белков, отличающихся по своим электрическим свойствам. Появление двух близлежащих полос на электрофореграмме белков пика 3 может быть следствием расщепления лабильного белка на субъединицы под действием высокого электрического напряжения или следов детергента, примененного нами для растворения мембранных белков. Кроме того, величины pI свидетельствуют о том, что белки как пика

3, так и пика 4 являются кислыми белками; по-видимому, они содержат избыток кислых аминокислот—аспарагиновой и глутаминовой. Однако данных об аминокислотном составе белков опиатных рецепторов в известной нам литературе не имеется. Таким образом, данные электрофокусирования подтверждают, что использование β -эндорфина для получения аффинного сорбента позволяет выделить несколько типов опиатсвязывающих мембранных белков.

Для определения белкового спектра исследуемых белков пиков 3 и 4 нами был проведен их электрофорез в денатурирующих условиях. Из электрофореграмм, представленных на рис.4, видно, что из сложного спектра белковых полос солиобилизованных белков синаптических мембран с M_r от 12 до 100 кД в составе белков пика 3 присутствуют лишь 4 основные белковые полосы, соответствующие субъединицам с величинами M_r 15, 30, 38, 45 кД (рис.4, *а*). Белки пика 4 содержат 2 основные белковые полосы, соответствующие субъединицам с M_r 15 и 66 кД (рис.4, *г*). И в том и в другом случае имеются минорные примеси. Сопоставление полученных данных с результатами электрофокусирования дает возможность предположить, что белок пика 4 с pI 5,3 может состоять из двух субъединиц: низкомолекулярной (15 кД) и высокомолекулярной (66 кД), а два типа белков пика 3 (pI 4,4 и 5,3), выявленные электрофокусированием, дают 4 основные субъединицы при SDS-электрофорезе. Чтобы определить, из каких именно субъединиц построен каждый белок, необходимы дальнейшие исследования.

В литературе описаны попытки выделения опиатсвязывающих мембранных белков с помощью аффинного сорбента, содержащего иммобилизованный синтетический аналог Leu-энкефалина, — DALA [7,8]. Выделенные с помощью этого сорбента белки головного мозга имели M_r 62 кД, однако их способность связывать меченый дельта-лиганд оказалась на порядок ниже, чем у солиобилизата тотальной фракции мембран мозга [7]. При аффинной хроматографии на β -эндорфин- ω -аминогексилсефарозе мы также выделили опиатсвязывающие мембранные белки, которые имели близкое к проведенному в работе Fujoka и соавт. [7] значение M_r (66 кД), однако налоксонсвязывающая активность этих белков (пик 4) не только не снижалась, а, напротив, возрастала в 7 раз по сравнению с солиобилизатом. При попытках выделения опиатных рецепторов μ -типа с применением сорбентов, содержащих иммобилизованные производные морфина, были получены белки, которые с высоким сродством связывали лиганды μ -рецепторов: [3H]дипренорфин, [3H]налоксон, [3H]DAGO [2,3]. Для этих белков был характерен субъединичный состав с M_r 28, 35, 43 кД [2] или 36 кД [3]. Приведенные значения величин M_r близки к величинам, полученным нами для белков пика 3 (M_r 30, 38, 45 кД), которые активнее взаимодействовали с [3H]налоксонном, чем белки исходного солиобилизата и белки пика 4. Сходство величин M_r выделенных белков (пик 3) и их способность

связывать μ -антагонист позволяют предположить, что эти белки являются компонентами μ -рецепторов. Белки типа 4, проявившие наибольшее сродство к β -эндорфину сорбента, по-видимому, относятся к опиатсвязывающим белкам рецепторов другого типа. Поскольку у этих белков имеется некоторое сходство с белками, выделенными на сорбенте, содержащем иммобилизованный δ -лиганд—DALA [7], можно предварительно отнести белки пика 4 к компонентам δ -рецепторов.

Таким образом, применение предложенного нами сорбента, содержащего иммобилизованный β -эндорфин, позволяет выделить опиатсвязывающие белки синаптических мембран, которые, возможно, являются структурными компонентами разных типов опиатных рецепторов. Этот сорбент имеет существенное преимущество перед предложенными ранее [1—3,7], так как более универсален—связывает рецепторные белки нескольких типов опиатных рецепторов. Использование этого сорбента освобождает от необходимости применения специфических сорбентов для каждого субтипа рецепторов, требуется только разделить белки разных типов, подбирая специфические элюенты.

Дальнейшее углубленное изучение физико-химических характеристик и рецепторных свойств этих белков по отношению к различным опиатным лигандам позволит более полно охарактеризовать выделенные нами опиатсвязывающие белки синаптических мембран головного мозга крысы.

ISOLATION OF OPIATE-BINDING PROTEINS ON β -ENDORPHIN- ω -AMINOHEXYL SEPHAROSE

Isykenova G.A., Taranova N.P.

*Pavlov Institute of Physiology, USSR
Academy of Sciences, Leningrad*

Two types of opiate-binding proteins were isolated from rat brain synaptic membranes using a new affinity adsorbent: β -endorphin- ω -aminoethyl Sepharose 4B. The isolated proteins were homogeneous by the criteria of isoelectric focusing and SDS-electrophoresis, their pI values were 4.4 and 5.3, they differed in subunit composition and ability to bind [3 H]-naloxone. It is proposed that these proteins are components of brain opiate receptors)

ЛИТЕРАТУРА

1. Cho T.M., Ge B.L., Yamato C., Smith A.P., Lok H.H. Proc.Nat.Acad.Sci.USA, Biol.Sci., v.80, N17, p.5176—5180, 1983.
2. Bidlack J.M., Abood L.G., Munemitsu S.M., Archer S. Gala D., Kreilick R.W. Regulatory peptides: from molecular biology to function, v.33, p.301—309, New York, Raven Press, 1982.
3. Ueda H., Harada H., Misawa H., Nozaki M., Takagi H. Neurosci.Lett., v.75, N3, p.339—344, 1987.

4. *Chang K.-J., Cuatrecasas P. Federat.Proc., v.40, p.2729—2734, 1981.*
5. *Simon E.J. Trends.Pharmacol.Sci., v.2, p.155—158, 1981.*
6. *Simon E.J. J.Receptor Res., v.7, N1—4, p.105—132, 1987.*
7. *Fujoka T., Inoue F., Kuriyama H. Biochem.Biophys.Res.Comm., v.131, N2, p.640—646, 1985.*
8. *Simon J., Benyhe S., Hepp J., Khan A., Borsodi A., Szücs S., Medzihradsky K., Wollemann M. Neuropeptides, v.10, N1, p.19—28, 1987.*
9. *Howard A.D., Sarne Y., Gioannini T.L., Hiller J.M., Simon E.J. Biochemistry, v.25, p.357—360, 1986.*
10. *Marks N., Grynbaum A., Neidle A. Biochem.Biophys.Res.Comm., v.74, p.1552—1559, 1977.*
11. *Zukin S.R., Young A.B., Snyder S.H. Proc.Nat.Acad.Sci.USA,Biol.Sci., v.71, N2, p.4802—4807, 1974.*
12. *Essen A. Anal.Biochem., v.89, p.264—273, 1978.*
13. *Остерман Л.А. — В кн.: Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радионуклидными методами, с.203—219, М., Наука, 1983.*
14. *Сергеев П.В., Шимановский Н.Л. — В кн.: Рецепторы, с.258—283, М., Медицина, 1987.*
15. *Дамбинова С.А., Беседин В.И. Нейрохимия, т.1, N4, с.543—549, 1982.*
16. *Туркова Я. — В кн.: Лабораторное руководство по хроматографическим и смежным методам, т.2, с.405—444, М., Мир, 1982.*
17. *Laemmli W.K. Nature, v.227, N5259, p.680—685, 1970.*
18. *Абугидзе К.Д., Соломония Р.О., Микеладзе Д.Г. Нейрохимия, т.6, N3, с.418—421, 1987.*
19. *Simon P.R., Swan J.H., Griffiths T., Meldrum B.S. Science, v.226, N4676, p.850—852, 1984.*
20. *Maruyama M., Sugino H., Akita K., Hatanaka H. Brain Res., v.401, p.14—22, 1987.*
21. *Simon J., Benyhe S., Abutidze K., Borsodi A., Szucs M., Toth G., Wollemann M. J.Neurochem., v.46, N3, p.695—701, 1986.*

Поступила 10.06.1988

ОБЗОРЫ

УДК 577.123+612.2

РЕПАРАЦИЯ ДНК В НЕРВНЫХ КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Иванов В.А.

Институт биологической физики АН СССР, Пущино

Репарация ДНК в клетках мозга характеризуется тканевой специфичностью, которая определяется особенностями структуры хроматина и функционирования генетического аппарата нервных клеток. Предполагается, что специфичность репарации ДНК в этих клетках обусловлена генетической индукцией, сопровождающей процессы высшей нервной деятельности.

* * *

В настоящее время на основании экспериментальных фактов сложилось мнение о недостоверности репарации индуцированных повреждений ДНК в перманентно неделящихся высоко дифференцированных нервных клетках [1—6]. Вместе с тем, следует полагать, что репарация ДНК в клетках головного мозга является более точной и эффективной, чем в других тканях организма, так как от функциональной целостности экспрессируемых генов нервных клеток прежде всего зависит выживаемость (адаптивный поведенческий ответ) животного.

Недавно была предложена гипотеза, которая представляет репарацию ДНК в качестве специфического этапа инициации матричных процессов, то есть служит конкретным обоснованием функции репарации ДНК в нормальной жизнедеятельности клетки: например, репарация вовлекается в любой процесс функционирования клетки, который сопровождается индукцией генов [7]. Известно, что выработка условных рефлексов у животных сопровождается интенсификацией синтеза различных фракций РНК исключительно в клетках мозга и одновременно значительным повышением включения меченого тимидина в ДНК [8]. В соответствии с гипотезой это включение тимидина обусловлено репарационным синтезом ДНК, который, в таком случае, имеет специфическое значение в функционировании клеток головного мозга.

В настоящем сообщении обсуждаются данные литературы и результаты собственных исследований о структурно-функциональной организации процессов репарации ДНК в нейронах млекопитающих, связанной с аналитико-интегративной деятельностью этих клеток.

Ферменты репарации, идентифицированные в клетках мозга

На рисунке представлены ферменты головного мозга и репарационные пути, в которых они могут участвовать. Инициация репарации сопровождается конформационными превращениями хроматина [9—11] и предполагает участие ферментов, осуществляющих взаимопревращение топологических изомеров ДНК. Такими ферментами являются ДНК-топоизомеразы. В клетках млекопитающих различают два типа ДНК-топоизомераз [12]. Посредством временного разрыва одной цепи ДНК и проведения другой цепи через этот разрыв (тип 1) или посредством разрыва обеих комплементарных цепей и последующего поворота (вращения) двухцепочечного сегмента (тип 2) эти ферменты могут катализировать многие виды топологических превращений ДНК. Оба фермента обнаружены в нейронах [13, 14] и в глиальных клетках [14] головного мозга животных. ДНК-топоизомераза I выделена из нейронов коры головного мозга крыс и очищена до электрофоретически гомогенного [15]. Обнаружено детальное сходство свойств ДНК-топоизомеразы I нейронов и лимфоидных клеток и некоторое отличие их от ферментов из других клеток животных [16]; показан высокий и неизменный в процессе развития уровень активности ДНК-топоизомеразы II в ядрах нейронов [14]. В то же время активность последнего фермента во всех других исследованных клеточных системах строго изменяется в соответствии с изменениями репликативного синтеза ДНК [7].

В зависимости от позиции, в которой алкилируются основания, возможны два различных пути репарации этих повреждений ДНК. N-алкилированные пурины и O²-алкилированные пиримидины элиминируются посредством расщепления N-гликозильной связи, в то время как O⁶-алкилгуанин и O⁴-алкилтимин репарируются посредством удаления алкильной группы. N-алкилированные пурины и O²-алкилированные пиримидины удаляются или посредством спонтанной депуринизации или действием специфических ДНК-гликозилаз [17]. Известно, что клетки головного мозга человека эффективно удаляют алкилированные основания: N³-метилладенин и O²-метилтимин из модифицированных субстратов [18] и проявляют урацил-ДНК-гликозилазную активность [19]. Поэтому мы предполагаем существование в мозгу млекопитающих соответствующих ДНК-гликозилаз — представителей большого класса ферментов, которые избирательно гидролизуют N-гликозидную связь модифицированного основания в ДНК, продуцируя апуриновые или апиридиновые (АП) сайты [20]. В клетках мозга обнаружена O⁶-алкилгуанин-ДНК-алкилтрансферазная активность [18, 19, 21, 22]. По-видимому, она аналогична репарационному ферменту, известному в разнообразных клетках млекопитающих, который катализирует прямой перенос алкильной группы из модифицированного основания на цистеиновый остаток ферментного белка с восстановлени-

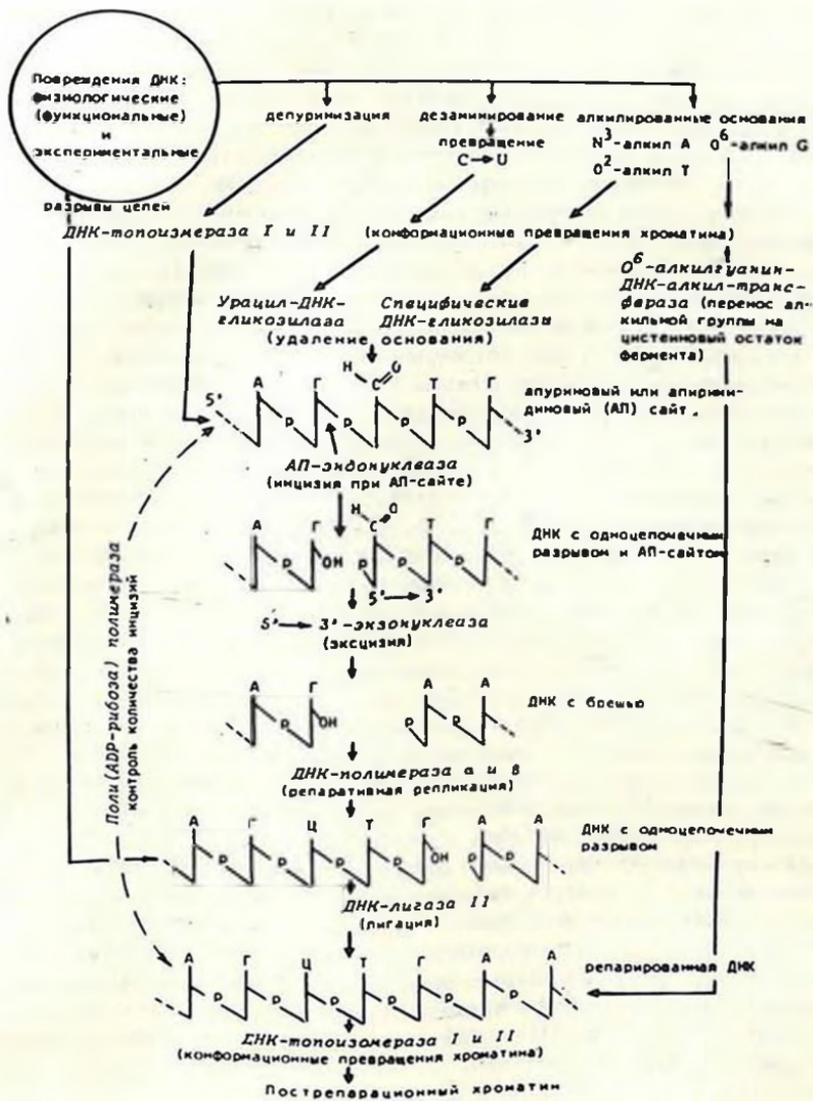


Рис. Пути репарации ДНК, идентифицированные в клетках головного мозга

ем нативной структуры ДНК в результате единственного этапа репарации [23].

В хроматине неокортекса крыс найдена эндодезоксирибонуклеаза, которая узнает АП повреждения в ДНК [24]. Ферменты этого класса вводят разрез в цепь ДНК возле АП-сайта и, таким образом, катализируют один из начальных этапов эксцизионной репарации ДНК. Очищенный фермент гидролизует фосфодиэфирную связь с 3'-ОН и 5'-фосфатной концевых групп. ДНК, инцизированная этим ферментом, служит эффективным праймером для ДНК-полимеразы β из печени крыс или ДНК-полимеразы I из *E.coli*. Фермент мозга, в отличие от известных АП-эндонуклеаз млекопитающих, высоко специфичен к суперспиральной форме субстрата [25]. Такое свойство, ранее описанное лишь для эндонуклеазы из печени крыс, узнающей другой тип повреждения ДНК, может иметь важное функциональное значение, предохраняя ДНК от двухцепочечного разрыва в процессе репарации, который приводит к дисфункции клетки [26].

Разрыв фосфодиэфирной связи в одной цепи ДНК возле поврежденного основания инициирует вырезание этого оснований вместе с некоторым количеством интактных нуклеотидов [17]. В мозгу обнаружена экзодезоксирибонуклеаза В3, которая по некоторым свойствам напоминает эксцизионные ферменты из других клеток млекопитающих [27]. Анализ кинетики гидролиза ДНК, с равномерно распределенной по длине молекулы тритиевой меткой и терминально меченной по фосфору, показал, что фермент мозга деградирует полинуклеотиды в направлении от 5'-к 3'-концу по частично процессивному механизму действия и, по-видимому, может участвовать в быстром и координированном процессе эксцизионной репарации [28]. Поскольку ДНКазы VIII не известна в других тканях организма, по свойствам совершенно четко отличается от других экзодезоксирибонуклеаз млекопитающих, локализована преимущественно в нейронах и в специальном исследовании не обнаружена в печени крыс, предполагается мозгоспецифичность этого фермента [16].

Полимеризацию нуклеотидов в репаративном синтезе катализирует ДНК-полимераза β , которая полностью обеспечивает этот процесс при репарации ДНК короткими фрагментами [29]. Ряд данных позволяет предполагать, что ДНК-полимераза α в клетках млекопитающих также принимает участие в репарации повреждений ДНК [17]. Необходимо отметить, что последний фермент отсутствует в зрелых нейронах неокортекса, в противоположность ДНК-полимеразе β , на долю которой приходится 99,2% общей ДНК-полимеразной активности, обнаруживаемой в этих клетках [30].

Завершает репарацию ДНК, обеспечивая непрерывность цепи, ДНК-лигаза. В головном мозгу обнаружены высокомолекулярная (ДНК-лигаза I) и низкомолекулярная (ДНК-лигаза II) формы фермента, последней из которых приписывается репарационная роль. Известно, что низкомолекулярный фермент является основным представителем ДНК-ли-

газ в ядрах зрелых нейронов [16,31].

Недавно показано, что в модельных экспериментах *in vitro* нуклеолитические ферменты головного мозга (АП-эндонуклеаза неокортекса крыс и ДНКазы В11), действуя последовательно, эксцизируют АП-сайты из суперспиральной ДНК фага РМ2 [25]. Результаты этой работы предполагают, что упомянутые ферменты могут участвовать *in vivo* в координированных действиях в эксцизионной репарации ДНК клеток головного мозга, где дальнейшие этапы катализируются другими репарационными ферментами: ДНК-полимеразой β и ДНК-лигазой II, которые обнаружены в нейрональных клетках в качестве главных форм.

Репарация ДНК контролируется на различных уровнях организации клетки. Мало известно о принципах этого контроля, но участие в нем процессов, катализируемых поли(ADP-рибоза) полимеразой, неоспоримо [32]. Известно, что активность этого фермента стимулируется наличием одноцепочечных разрывов ДНК, которые, по-видимому, служат необходимыми косубстратами реакции. Функциональная роль поли(ADP-рибоза) полимеразы не установлена. Любая модель, претендующая на это, должна учитывать быстрый обмен ADP-рибозы, специфические белки-мишени, участие фермента на этапе лигации и вовлечение в репарацию ДНК. Нам кажется удачной модель, предложенная Schweiger и соавт. [33], где в качестве биологической функции фермента предполагается контроль количества одноцепочечных разрывов ДНК в процессе функционирования генома (в частности, в репарации ДНК) и, таким образом, предотвращение его дезинтеграции. Уровни активности этого фермента в суспензиях ядер нейронов и глии подобны, в то же время активность нейронального фермента, экстрагируемого в 1 M NaCl , значительно выше, чем глиального. Это обусловлено, по-видимому, присутствием в ядрах нейронов растворимых активаторов фермента, которых нет в глиальных клетках [34].

Необходимо отметить, что участие ДНК-топоизомераз предполагается, по крайней мере, на двух этапах репарационного процесса — в начале и в конце, которое обусловлено конформационными перестройками хроматина, обеспечивающими структурно и функционально инициацию репарации и послерепарационное «приведение в порядок» хроматиновой структуры [9—11, 35,36]. Хотя репарация ДНК во многих аспектах не ясна, есть прямые доказательства, что организация ДНК в сложную и динамическую структуру хроматина имеет значительные последствия для эффективного узнавания повреждений и их удаления.

Структура хроматина клеток мозга

Хроматин всех исследованных эукариотических организмов представляет ряд повторяющихся нуклеопротеиновых частиц, называемых нуклеосомами. Нуклеосома состоит из «кора», содержащего 140-145 пар оснований ДНК, ассоциированных с октамером из 4-х гистонов, и «линкерной»

области, соединяющей «коры» друг с другом посредством ДНК [37,38]. Переваривание хроматина микрококковой нуклеазой продуцирует фрагменты ДНК, которые мигрируют в ПААГ в соответствии с величинами M_n , кратными повторяющейся единице (ПЕ) ДНК. ПЕ хроматина является суммой средних длин ДНК «кора» и области линкера нуклеосомы. Эта величина может быть различной у разных организмов благодаря изменению длины линкера. ПЕ высших эукариотов составляет 200 пар оснований (п.о.) ДНК, то есть 140 п.о. в коровой частице и 60 п.о. в области линкера. Thomas, Thompson [39] первыми обнаружили уникально короткую ПЕ в нейронах неокортекса животных, равную 160 п.о. в отличие от 200 п.о. глиальных клеток. Короткая ПЕ в нейронах обусловлена уменьшением количества ДНК в линкерной области нуклеосомы до 20 п.о., которое происходит в период раннего развития головного мозга: постнатально в течение 2-7 суток у кроликов, мышей и крыс и пренатально между 32—44 днями эмбрионального развития морских свинок [40].

Сокращение ПЕ сопровождается увеличением чувствительности хроматина к действию ДНКазы I и ростом транскрипционной активности ДНК. На таком основании некоторые авторы считают, что этот уникальный процесс сопровождается деконденсацией хроматина, которая увеличивает доступность ДНК для действия самых различных ферментов [41]. Такое предположение является, по-видимому, слишком упрощенным. Мы полагаем, что деконденсация хроматина имеет функциональный, а не физический смысл и избирательно ограничивается строго определенными участками ДНК. Так, сокращение ПЕ без изменения размеров генома, очевидно, обуславливает увеличение количества нуклеосом на единицу длины ДНК. Дополнительный синтез гистонов, наблюдаемый в этот период, подтверждает такое предположение [42]. Поэтому в некотором смысле следует говорить о дополнительной компактизации ДНК на нуклеосомном уровне, что, в известной мере, может структурно ограничивать влияние ферментов на ДНК. Например, около 50% пиримидиновых димеров в ДНК проницаемых клеток человека являются недоступными для действия экзогенной эндонуклеазы, специфичной для этих димеров. Однако предварительная обработка клеток NaCl, диссоциирующая «коровые» гистоны, превращает большинство димеров в доступные для эндонуклеазы и, таким образом, показывает, что нуклеосомные белки могут блокировать поврежденную ДНК от репарационного фермента [43]. На наш взгляд, увеличение чувствительности (активности) хроматина в связи с сокращением ПЕ можно попытаться объяснить увеличением числа локальных одноцепочечных участков на единицу длины ДНК, которое обусловлено ростом количества нуклеосом. Действительно, ассоциация двухцепочечной ДНК с белками «кора» является причиной изменения ее суперспиральной плотности [44], что в свою очередь сопровождается появлением дополнительных одноцепочечных участков, которые легко атакуются экзогенными нуклеазами [45,46] и являются точками инициации матричных процессов

В клетках млекопитающих регистрируемая методами седиментации энзиматическая репарация ДНК, индуцированная γ -облучением или рентгеновскими лучами, происходит по двухфазной кинетике: 80—90% «повреждений» удаляются в первые 15—30 мин после воздействия, затем в течение нескольких часов удаляются оставшиеся «повреждения» [49]. На основании сравнительных исследований кинетики репарации ДНК в клетках, находящихся в различных состояниях дифференциации, предполагается, что двухфазная кинетика может быть результатом репарации повреждений, которые локализованы в легкодоступных для действия ферментов и факторов репарации (быстрая фаза) и труднодоступных (медленная фаза) областях генома [49—52]. В соответствии с этим предположением геном нейронов мозжечка крыс содержит принципиально более труднодоступные участки, чем не нервные клетки [53]. Необходимо отметить, что степень этой доступности не связана с размерами ПЕ, так как в нейронах мозжечка не обнаружено уникального уменьшения длины нуклеосомы, а, по-видимому, является характерным свойством нервной клетки. Есть основания полагать, что специфический этап в созревании нейронов неокортекса, который сопровождается изменением длины ПЕ, является дополнительным механизмом, усиливающим разделение генома на легкодоступную для ферментов и регуляторных факторов метаболически активную ДНК и труднодоступную стабильную ДНК.

Отдельного внимания заслуживают данные о существовании в мозгу так называемой лабильной или метаболической ДНК [54—56]. Введение радиоактивных предшественников синтеза ДНК *in vivo* и *in vitro* сопровождается быстрым включением радиоактивности в ДНК нейронов и столь же быстрым исчезновением значительной ее части из ДНК [57,58]. Этот процесс, уникальный по интенсивности в клетках мозга, интерпретируется как наличие особой относительно быстро обменивающейся фракции ДНК [58]. Такие данные определенным образом дополняют результаты анализа кинетики репарации ДНК, которые, как отмечено выше, позволяют представить геном дифференцированных клеток в виде двух фракций: легкодоступной метаболически активной ДНК и труднодоступной стабильной ДНК. Очевидно, это явление резко выражено в нейронах: они содержат как более стабильную ДНК, так и более активную метаболическую ДНК по сравнению с другими клетками. В соответствии с предложенной гипотезой мы полагаем, что феномен метаболической ДНК обусловлен интенсивной репарацией ДНК на участках генома, представленных транскрибируемыми генами, количество и транскрипционная активность которых являются, как известно, характерными свойствами клеток мозга [8].

Также можно обосновать функциональное значение существования в геноме перманентно неделящихся клеток более труднодоступной области в сравнении с другими клетками. Здесь могут быть локализованы необратимо репрессированные гены, сохранение функциональной целостности кото-

рых не имеет значения для нейронов, скорее наоборот: сохранение поврежденных этих генов, по-видимому, имеет смысл как элемент механизма, необратимо блокирующего деление нейрона. Система репарации ДНК нейронов поэтому может быть количественно или качественно редуцирована таким образом, чтобы обеспечить сохранение повреждений перманентно репрессированных генов.

Репарация экспериментально индуцированных повреждений ДНК

Известно, что скорость элиминации O^6 -метилгуанина в клетках головного мозга очень низка. Так, при исследовании репарации в различных тканях взрослых крыс самая быстрая реакция найдена в печени: через 7 суток после воздействия это повреждение не обнаруживалось. В легких такой процесс происходит в течение 24 суток. В мозгу скорость репарации значительно ниже. После быстрого уменьшения концентрации O^6 -метилгуанина в течение первых часов (после индукции повреждения) наблюдали резкое падение скорости элиминации. В течение 14 суток уровень O^6 -метилгуанина сокращается до 50% от начального, затем скорость репарации еще более снижается. Даже через 6 месяцев в ДНК мозга присутствует около 25% начальной концентрации O^6 -метилгуанина [5]. Это повреждение, как показано, вовлекается в карциногенез, индуцируемый алкилирующими агентами [21, 59]. В некоторых тканях наблюдается хорошая корреляция между длительностью присутствия O^6 -алкилгуаниновых или O^4 -алкилтимининовых остатков в ДНК и частотой индукции опухолей. Однако такая корреляция не обнаружена в головном мозгу, клетки которого обладают высокой устойчивостью к трансформации. Приведенные факты, по-видимому, подтверждают предположение об избирательной репарации в клетках головного мозга только таких генов, экспрессия которых является необходимой для нормального функционирования клетки и органа. Можно отметить, что бесклеточные экстракты мозга также интенсивно удаляют O^6 -метилгуанин из метилированных субстратов, как и экстракты других тканей [18]. Следовательно, уровень активности O^6 -алкилгуанин-ДНК-алкилтрансферазы в клетках головного мозга, по-видимому, не ниже, чем в других клетках организма, а медленный процесс репарации O^6 -метилгуанина обусловлен особенностями структурной организации хроматина клеток мозга.

Результаты автордиографических экспериментов по УФ-облучению (доза 5 Дж/ M^2) культуры клеток эмбрионального мозга мышей показали, что вся глия сохраняет способность к репликации, тогда как 70% нейробластов (пролиферирующих предшественников нейронов) эту способность теряют. В то же время γ -облучение в дозе 10 Гр в равной мере угнетало репликацию ДНК в обоих типах клеток [3]. Уровень УФ-индуцированного незапрограммированного синтеза ДНК ниже в нейробластах, чем в глиаль-

ных клетках [4]. Инкубирование срезов головного мозга крыс, обработанных карциногенами, также приводит к очень низким величинам незапрограммированного синтеза ДНК в нервных клетках, которые еще более уменьшаются в процессе развития животного [2].

В других работах радиоактивность ДНК определяли (после выделения, очистки и гидролиза) сцинтилляционным методом. Было обнаружено, что индуцированный *in vivo* γ -облучением животных синтез ДНК в ткани неокортекса 14-суточных крыс прекращается через 2 ч. Однако этот же процесс в такой же ткани 60-суточных крыс и нейронах 14- и 60-суточных животных продолжается 3—3,5 ч после облучения [60]. Далее было показано, что γ - и УФ-облучение (20 Гр и 90 Дж/М² соответственно) повышают интенсивность синтеза ядерной ДНК нейронов при воздействии *in vitro* на изолированные срезы неокортекса новорожденных, 14- и 60-суточных крыс, однако величина УФ-индуцированного внепланового синтеза резко падает в процессе постнатального онтогенеза, в то время как γ -индуцированный синтез уменьшается незначительно [61].

Для исследования процесса УФ-индуцированной репарации ДНК в пролиферирующих предшественниках гранулярных нейронов мозжечка 5—10-суточных мышей использовали оксимочевину—специфический ингибитор рибонуклеотидредуктазы, а также афидиколин и дидезокситимидин-селективные ингибиторы ДНК-полимераз α и β соответственно. Полученные данные позволяют предполагать, что в этих клетках мозга как ДНК-полимераза α , так и β необходимы для репарации ДНК [62]. Таким образом, пониженная активность нервных клеток неокортекса для репарации УФ-индуцированных повреждений ДНК обусловлена, в частности, уменьшением содержания ДНК-полимеразы α , которая, как известно, отсутствует в зрелых нейронах. Последний факт можно объяснить, принимая во внимание существование механизма, необратимо блокирующего деление нервных клеток млекопитающих, о котором упоминалось выше. Понятно, что так называемая недостаточность репарации ДНК в нервных клетках не имеет значения функционального дефекта, а является лишь термином, определяющим более низкую репарационную способность этих клеток по сравнению с не нервными клетками в условиях эксперимента.

Изменение активности ферментов в результате повреждающих воздействий является адаптивным ответом клетки, который может отражать участие этих ферментов в процессах восстановления функциональной целостности структур клетки. Одним из механизмов регуляции активности фермента является посттрансляционная энзиматическая модификация ферментного белка, которая модифицирует структуру и приводит к соответствующему изменению каталитической активности. Наиболее интересным, по нашему мнению, является исследование индуцированного перераспределения (функциональной компартиментализации) активного белка-фермента среди клеточных, ядерных или хроматиновых субфракций, обусловленного, по-видимому, избирательной модификацией локальных внутриклеточных

точных пулов фермента. В качестве примера можно представить действие облучения на упомянутую ДНК-топоизомеразу I.

Было обнаружено, что активность фермента в ядерной фракции, экстрагированной 1 M NaCl из нейронов неокортекса крыс, увеличивается почти в два раза после γ -облучения (7 Гр) животных или инкубируемых срезов ткани неокортекса [63]. Эти результаты не являются неожиданными. Так, показано, что активность ДНК-топоизомеразы I в ядерных экстрактах из человеческих лимфоцитов или культивируемых лимфобластоидных клеток также увеличивалась после облучения в близкой дозе [64]. Очевидно, можно предположить, что изменение активности этого фермента в нейронах является результатом индуцированной облучением репарации ДНК. В этой связи большое значение имел анализ компартиментализации процесса. Известно, что ДНК-топоизомераза ассоциирована с хроматином [12]. Степень этой ассоциации может зависеть от активности генома. Действительно, ассоциация фермента с хроматином (по тесту солевой элюции) изменялась обратимо для растущих и покоящихся культивируемых клеток [65]. Обнаружено, что активность ДНК-топоизомеразы в экстрактах нейронального хроматина увеличивается неравномерно после ДНК-тропного повреждающего воздействия. Наиболее выраженные изменения найдены во фракциях, экстрагированных солью в концентрации >400 мМ. Эти данные предполагают, что только связанный фермент (который элюируется при ≥ 400 мМ NaCl) модифицируется (активируется), тогда как активность слабосвязанного не изменяется. Подобное явление было обнаружено для ДНК-полимеразы α в регенерирующей печени крыс [66]. Авторы наблюдали перераспределение ДНК-полимеразной активности среди ядерных субфракций в течение репликации *in vivo*. Самым замечательным, на наш взгляд, является «движение» ДНК-полимеразной активности к ядерному матриксу, которое соответствует представлению о локализации матричных процессов на структурах ядерного скелета клетки [67].

Индукцированное репарацией перераспределение активности ДНК-топоизомеразы I среди субфракций хроматина нервных клеток, по-видимому, также отражает «движение» этого фермента к ядерному матриксу и может быть обусловлено активацией процесса репарации ДНК. Такое предположение подтверждается экспериментальными фактами, которые демонстрируют структурную связь инициации репарации ДНК с элементами ядерного матрикса клетки [68,69].

На основании приведенных данных можно отметить, что экспериментальные не летальные повреждающие воздействия, которые вызывают различные изменения в организме, индуцируют, очевидно, адекватную реакцию репарационных (адаптивных) систем организма. Поэтому можно полагать, что разнообразные факторы внешней среды в естественных (физиологических) условиях жизнедеятельности, отличающиеся от экспериментальных (повреждающих) лишь величиной дозы, действуют на те же функциональные адаптивные системы организма.

Репарация ДНК как составная часть индуцированной транскрипции генов

Известно, что экранирование животных от влияния естественного фона ионизирующей радиации (реликтового излучения) резко задерживает их развитие [70]. В соответствии с этим установлено, что ионизирующее облучение в малых дозах (вдобавок к естественному фону) оказывает стимулирующее действие на рост и развитие животного организма [71], в частности, увеличивает частоту разрядов спонтанной импульсной активности нейронов ЦНС [72] и интерпретируется как проявление опосредованного или непосредственного действия на нервные клетки [73].

Применение методов генной инженерии в исследовании нейрональной функции (механизмов преобразования и хранения информации в нервной системе) в последние годы позволило получить принципиальные результаты. Установлено, что внешние стимулы, изменяющие импульсную активность нейронов, селективно переключают экспрессию специфических транскрипционных генов [74]. Эти регуляторные (ранние) гены в случае длительного хранения информации индуцируют эффекторные (поздние) гены, которые кодируют белки, обеспечивающие длительные изменения синаптической функции нервных клеток [75]. Мы полагаем, что стимулирующее влияние на развитие организма малых доз ионизирующего излучения, изменяющего, как упомянуто выше, импульсную активность клеток, может быть обусловлено также индукцией регуляторных, а затем эффекторных генов. Внутриклеточные механизмы, ответственные за трансформацию величины мембранной деполяризации в избирательную индукцию генов, неизвестно. Однако можно предполагать, что действие как сенсорных факторов, так и ионизирующей радиации в малых дозах на геном эукариотических клеток опосредовано регуляторными системами, контролирующими суперспиральную конформацию ДНК, которая, как известно, играет важную роль в инициации экспрессии генов [45].

Можно считать установленным, что проявления высшей нервной деятельности сопровождаются тканеспецифической индукцией генов в клетках головного мозга [74, 75]. Поэтому анализ экспрессии генов представляет большой интерес как исследование молекулярного механизма формирования памяти. Вместе с тем, к настоящему времени имеются лишь незначительные сведения о регуляторных механизмах индукции генов в эукариотической клетке. Недавно мы предложили гипотезу, представляющую репарацию ДНК в качестве специфического этапа инициации матричных процессов, которая, таким образом, служит конкретным обоснованием функции репарации ДНК в нормальной жизнедеятельности клетки [7]. В соответствии с этим представлением структура ДНК не активного гена повреждена, и его индукция обязательно связана с предварительной репарацией ДНК. Известно, что выработка пищевых и оборонительных условных рефлексов у животных сопровождается дополнительным синтезом ДНК в клетках головного мозга [8]. Синтез ДНК в клетке обусловлен

тремя типами биологических процессов: репликацией, эксцизионной репарацией и обратной транскрипцией [16]. Вместе с тем, мы полагаем, что именно репарация ДНК является постоянной составляющей синтеза ДНК, индуцируемого в клетках мозга при обучении животных.

На основании данных, представленных в настоящем сообщении, можно предполагать, что особенности структурно-функциональной организации процессов репарации ДНК в клетках головного мозга связаны с интегративной деятельностью этого органа.

DNA REPAIR IN NERVE CELLS OF MAMMALS

Ivanov V. A.

Institute of Biological Physics, USSR Academy of Sciences, Pushchino

DNA repair in brain cells has tissue specificity, which depends on specificity of chromatin structure and functioning of the genetic machinery of nerve cells. It is proposed that the specificity of DNA repair in these cells is due to the genetic induction accompanying processes of higher nervous activity.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wheeler K.T., Weinstein R.E. *Radiation Res.*, v.80 p.343—347, 1979.
2. Heyting C., Veer L. *Carcinogenesis*, v.2, p.1173—1180, 1981.
3. Damberg R., Kidson Ch. *J. Neurophat. Exp. Neurology.*, v.36, p.576—585, 1977.
4. Damberg R., Kidson Ch. *Intern. J. Radiat. Biol.*, v.36, p.271—280, 1979.
5. Kleihues P., Bucheler J. *Nature*, v.269, N5629, p.625—626, 1977.
6. Wang T.S., Wheeler K.T. *Radiation Res.*, v.73, p.464—475, 1978.
7. Иванов В.А., Гушмалова Н.А. *Успехи соврем.биол.*, т.106, с.163—178, 1988.
8. Алапкин В.В., Ванюшин Б.Ф. *Успехи соврем. биол.*, т.98, с.323—337, 1984.
9. Hunting D.J., Dresler S.L., Lieberman M.W. *Biochemistry*, v.24, p.3219—3226, 1985.
10. Mitchell D.L., Clarkson J.M., Adair G.M. *Mutation Res.*, v.165, p.123—128, 1986.
11. Takahashi K., Kaneko I. *Intern.J.Radiat.biol.*, v.48, p.389—395, 1985.
12. Wang J.C. *Ann.Rev.Biochem.*, v.54, p.665—697, 1985.
13. Ivanov V.A., Melnikov A.A. *FEBS Lett.*, v.177, p.300—304, 1984.
14. Tsutsui K., Tsutsui K., Sakurai H., Shohmori T., Oda T. *Biochem. Biophys.Res.Commun.*, v.138, p.1116—1122, 1986.
15. Ivanov V.A., Melnikov A.A., Terpilovska O.N. *Biochim. et biophys. acta*, v.866, p.154—160, 1986.
16. Иванова В.А., Третьяк Т.М. *Успехи соврем.биол.*, т.101, с.174—187, 1986.
17. Friedberg E.C. *DNA repair*, N.Y.: Freeman and Company, 1985.
18. Wani A.A., Wani G., D'Ambrosio S.M. *Biochem. Biophys. Res..Commun.*, v.133, p.589—597, 1985.
19. Krokan H., Haugen A., Myrnes B., Guddal P.H. *Carcinogenesis*, v.4, p.1559—1564, 1983.
20. Lindahl T. *Ann. Rev. Biochem.*, v.51, p.61—87, 1982.
21. Kleihues P., Rajewsky M.F. *Prog. Exp. Tumor Res.*, v.27, p.1—16, 1984.
22. Wani A.A., D'Ambrosio S.M. *Arch.Biochem. Biophys.*, v.246, p.690—698, 1986.
23. Myrnes B., Giercksky K.E., Krokan H. *J.Cell.Biochem.*, v.20, p.381—392, 1982.
24. Иванов В.А. *Биохимия*, т.52, с.1133—1137, 1987.

25. Ivanov V.A., Tretyak T.M., Afonin Yu.N. Eur.J.Biochem., v.172, p.155—159, 1988.
26. Helland D., Ncs I.F., Kleppe K.F.EBS Lett., v.142, p.121—124, 1982.
27. Ivanov V.A., Gaziev A.I., Tretyak T.M. Eur.J.Biochem., v.137, p.517—522, 1983.
28. Иванов В.А., Третьяк Т.М., Терпиловская О.Н., Смирнова Г.Н. Биохимия, т.52, с.842—845, 1987.
29. Grossman L. Arch. Biochem. Biophys., v.211, p.511—522, 1981.
30. Waser J., Hübscher U., Kuenzle C.C., Spadari S. Eur.J.Biochem., v.97, p.361—368, 1979.
31. Kuenzle C.C. Brain Res. Rev., v.10, p.231—245, 1985.
32. Oleinick N.L., Evans H.H. Radiation Res., v.101, p.29—46, 1985.
33. Schweiger M., Auer B., Burtscher H.J., Hirsch-Kauffman M., Klocker H., Schneider R. Eur. J. Biochem., v.165, p.235—242, 1987.
34. Bilen J., Ittel M.E., Niedergang C., Okazaki H., Mandel P. Neurochem. Res., v.6, p.1253—1263, 1981.
35. Nissen K.A., Lan S.Y., Smerdon M.J. J. Biol. Chem., v.261, p.8585—8588, 1986.
36. Smerdon M.J. J. Biol. Chem., v.261, p.244—252, 1986.
37. Kornberg R.D. Ann. Rev. Biochem., v.46, p.931—954, 1977.
38. McGhee J.D., Felsenfeld G. Ann. Rev. Biochem., v.49, p.1115—1156, 1980.
39. Thomas J.O., Thompson R.J. Cell., v.10, p.633—640, 1977.
40. Molecular approaches to neurobiology (ed. I.R.Brown), N.Y.-L.-Toronto-Sydney- San Francisco, Acad. Press, 1982.
41. Greenwood P., Brown I.R. Neurochem. Res., v.7, p.965—976, 1982.
42. Brown I.R. Develop. Biol., v.80, p.248—252, 1980.
43. Mellon I., Bohr V.A., Smith C.A., Hanawalt P.C. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., Biol. Sci., v.83, p.8878—8882, 1986.
44. Carnevali F., Caserta M., Di Mauro E. J. Biol. Chem., v.259, p.12633—12643, 1984.
45. Гразепов А.И., Миркин С.М. Молекуляр. биология, т.14, с.8—34, 1980.
46. Snounou G., Malcolm A.D.B. Eur. J. Biochem., v.138, p.275—280, 1984.
47. Hoffman L.M., Collins J.M. Nature, v.260, N5552, p.642—643, 1976.
48. Mattern M.R., Painter R.B. Biochim. et biophys. acta, v.563, p.306—312, 1979.
49. Wheeler K.T., Wierowski J.V. Radiat. Environ. Biophys., v.22, p.3—19, 1983.
50. Wheeler K.T., Wierowski J.V. Radiation Res., v.93, p.312—318, 1983.
51. Wierowski J.V., Thomas R.R., Ritter P., Wheeler K.T. Radiation Res., v.90, p.479—488, 1982.
52. Wierowski J.V., Wheeler K.T. Radiation Res., v.91, p.387—388, 1982.
53. Wierowski J.V., Thomas R.R., Wheeler K.T. Radiation Res., v.98, p.242—253, 1984.
54. Cameron I.L., Adrian E.K. Cytobios, v.25, p.85—92, 1979.
55. Kimberlin R.H., Shirt D.B., Collins S.C. J. Neurochem., v.23, p.241—248, 1974.
56. Merits I., Cain J. Biochem. et biophys. acta, v.209, p.327—338, 1970.
57. Hobi R., Kuenzle C.C. Neurosci. Lett., v.58, p.311—314, 1985.
58. Perrone-Capono C., D'Onofrio G., Giulitta A. J. Neurochem., v.38, p.52—56, 1982.
59. Kleihues P., Schmerold I., Wiestler O. —In: Developments in the science and practice of toxicology, p.255—264, Elsevier Amsterdam, 1983.
60. Иванов В.А., Терпиловская О.Н., Куликов А.Б., Третьяк Т.М. Цитология, т.29, с.73—78, 1987.
61. Иванов В.А. Радиобиология, т.27, с.586—590, 1987.
62. Licastro F., Sarafian Th., Verity A.M., Walford R.L. Biochem. Biophys. Res. Commun., v.132, p.929—933, 1985.
63. Ivanov V.A. Neurosci. Lett., v.94, p.99—103, 1988.
64. Johnstone A., McNerney R. Biosci. Rep., v.5, p.907—912, 1985.
65. McConaughy B.L., Young L.B., Champoux J.J. Biochim. et biophys. acta, v.655, p.1—8, 1981.
66. Smith H.C., Berezney R. Biochemistry, v.22, p.3042—3046, 1983.
67. Chromosomal nonhistone protein (ed. Z.S. Hnilica), p.119—180, CRC Press Inc., 1984.
68. Газиев А.И., Безлепкин В.Г., Малиновский Ю.Ю., Вельхови В. Радиобиология, т.25, с.137—138, 1985.

69. Mullenders L.H.F., van Kesteren—van Leenwen A.C., van Zeeland A.A., Natarajan A.T. *Biochim. et biophys. acta*, v.826, p.38—48, 1985.
70. Кузин А.М., Сложеникина Л.Ф., Фиалковская Л.А., Примак—Миролюбов В.Н. *Радиобиология*, т.23, с.192—195, 1983.
71. Семагин В.Н. *Радиобиология*, т.15, с.583—588, 1975.
72. Пеймер С.И., Дудкин А.О., Свердлов А.Г. *Докл. АН СССР*, т.284, с.1481—1484, 1985.
73. Дудкин А.О., Пеймер С.И., Свердлов А.Г., Шугова И.Е. *Радиобиология*, т.25, с.510—514, 1985.
74. Black I.W., Adler J.E., Dreyfus Ch.F. Fridman W.F. Roach A.H. *Science*, v.236, p.1263—1268, 1987.
75. Goelet Ph., Castellucci V.F., Schacher S., Kandel E.R. *Nature*, v.322, p.419—422, 1986.

Поступила 10. 06. 1988

H. Zimmerman Cellular and Molecular Basis of Synaptic Transmission (NATO(ASI Servies, v.H21), Springer, Berlin, 547 p., 1988
Клеточные и молекулярные основы синаптической передачи

В центре внимания нейрохимиков по-прежнему остается изучение клеточных и молекулярных механизмов синаптической передачи нервного импульса. В книге рассматриваются методические приемы и перспективные исследования, способствующие прогрессу в рассматриваемой области. Она охватывает как исторические аспекты развития биохимических исследований синаптической передачи, так и наиболее передовые методы, применяемые в морфологических и функциональных исследованиях процессов, происходящих в нервных окончаниях. Изучение молекулярных и функциональных свойств синаптических пузырьков, регуляции пресинаптического синтеза нейротрансмиттеров, выброса трансммиттеров, в особенности, молекулярного строения и функций пресинаптических ионных каналов и рецепторов трансммиттеров обеспечивает дальнейшее проникновение в механизмы синаптических процессов.

Книга предназначена для нейрофизиологов, нейрохимиков и биофизиков.

ХРОНИКА

ВИ СЪЕЗД ЕВРОПЕЙСКОГО НЕЙРОХИМИЧЕСКОГО
ОБЩЕСТВА

(Гетеборг, Швеция, 12—17 июня, 1988)

С 12 по 17 июня 1988 г. состоялся VII съезд Европейского нейрохимического общества (ЕНО). В его деятельности приняло участие свыше 720 человек, в том числе 73 ученых из Великобритании, 72—из Франции, 19—из СССР, 18—из ВНР, 10—из ГДР, а также представители других стран Европы, США, Японии, Канады. В докладах, представленных на съезде, нашел отражение современный уровень развития нейрохимических исследований в наиболее актуальных их направлениях.

На съезде было сделано несколько пленарных докладов. Среди них большой интерес вызвал доклад *A.Fontana* (Швейцария). В этом докладе отмечалось, что принципы иммунного надзора в ткани мозга отличаются от принципов иммунного надзора в других тканях. В докладе приводились свидетельства того, что важную роль в определении внутримозговой реактивности, в активации лимфоцитов и макрофагов играют клетки астроглии и микроглии, выполняющие роль регуляторных элементов, расположенных на границе ЦНС.

Интересными и информативными были и другие пленарные доклады. Доклад *L.Svennerholm* (Швеция), в котором рассматривалась биологическая роль ганглиозидов, доклад *V.Mutt* (Швеция), в котором рассматривалась в историческом аспекте функциональная роль пептидов в ЦНС, доклад *H.Thoenen* (ФРГ), посвященный факторам роста и нейротрофическим факторам, доклады *S.Tucek* (ЧССР) и *A.Carlsson* (Швеция), посвященные изучению холинергических и допаминергических нейронов.

14 симпозиумов, 14 рабочих заседаний, 16 круглых столов и стендовых докладов охватывали широкий круг вопросов. В настоящем сообщении основное внимание будет уделено наиболее интересным докладам, посвященным исследованию гликоконъюгатов клеточной поверхности, факторов, определяющих пластичность нервных клеток, и иммунохимическим аспектам исследования.

В докладе *J.Finne* и соавт. (Финляндия) приводились свидетельства того, что экспрессия таких углеводных последовательностей, как полисиалозильные и поли-N-ацетиллактозаминные цепи, претерпевают значительные изменения в процессе развития нервной ткани, причем эти изменения связаны с процессами дифференцировки клеток. Так, длинные полисиалозильные цепи, входящие, главным образом, в состав молекул клеточной

адгезии NCAM и характерные для ранних этапов развития нервной ткани, выполняют роль негативных модуляторов адгезии клеток.

В докладах *E. Bock* (Дания), *G. Alcaraz* и *C. Goridis* (Франция) показано, что молекулы клеточной адгезии (NCAM, L1 и другие) играют важную роль в процессах морфогенетического развития нервной ткани, при этом происходит существенное изменение их локализации и содержания. Функции этих молекул в значительной мере регулируются посттрансляционными изменениями их молекулярной организации.

Иммунохимические подходы являются в настоящее время наиболее информативными при изучении специфических для мозга соединений. В докладе *P. Fredman* (Швеция) было показано, что аутоантитела против ганглиозида GM1 выявляются в сыворотке крови людей в высоких титрах при рассеянном склерозе и ряде других патологий. Отличительной чертой синдрома Гуилона-Барре является наличие в сыворотке крови антител против ганглиозида 3-LM1. Интересно отметить, что при болезнях, связанных с поражением ЦНС, в СМЖ также выявлялись антитела против гликолипидов мозга, но в значительно менее высоких титрах, чем в сыворотке крови.

Оживленную дискуссию вызвал доклад *B. Zalc* и соавт. (Франция), посвященный разработке метода иммунохимического определения галактозилцерамида в биологических жидкостях, позволяющий производить детекцию 60 пмоль этого соединения. Этот гликолипид был выявлен в СМЖ лишь у пациентов, у которых наблюдался процесс демиелинизации, причем в периоды обострения рассеянного склероза содержание галактозилцерамида в СМЖ резко возрастает.

В тезисах *Н.П.Тарановой* и *О.С.Луцаковой* (СССР) приводятся свидетельства образования аутоантител против галактозилцерамида в сыворотке крови людей при поражении ткани мозга. Разработанный авторами метод определения этих антител может быть использован для выявления повреждений олигодендроглиальных и миелиновых мембран при болезнях, связанных с повреждением ЦНС.

В работе *P. Deul* и соавт. (Бельгия) проводилось определение в СМЖ специфических для мозга белков (GFAP, S-100, основного белка миелина, белка микрофиламентов и др.) с целью разработки иммунохимических критериев диагностики болезней, связанных с поражением ЦНС. Показано, что появление каждого из этих белков в СМЖ, как правило, имеет место при различных болезнях, при которых происходят деструктивные изменения в ткани мозга.

В настоящее время в центре внимания многих исследователей находятся вопросы пластичности нервных клеток, регенерации и роста их отростков. Предпринимаются, в частности, попытки найти те факторы, которые могли бы снять ингибирование роста аксонов, характерное для ЦНС взрослых млекопитающих. В докладе *K. Victorin* и *A. Björklund* (Швеция) исследовались анатомические корреляты хорошо установленных

фактов улучшения поведенческих реакций у взрослых крыс с поврежденным стриатумом при пересадке им эмбрионального стриатума.

В докладах *D.Edgar* (ФРГ) и *G.Cohen* (Великобритания) приводились свидетельства важной роли гликопротеина ламинина в процессах направленного роста аксонов.

Многие доклады на съезде были посвящены изучению нейротрофических и нейритогенных факторов, прежде всего фактора роста нервов и ганглиозидов. В докладе *H.Thoenen* (ФРГ) показано, что фактор роста нервов выполняет роль ретроградного мессенджера, при этом он регулирует степень выживаемости специфических популяций нейронов после того, как они достигнут области своих клеток-мишеней во время критических периодов развития нервной ткани.

В докладе *T.Ebendal* и соавт. (Швеция) приводились свидетельства того, что фактор роста нервов удается выявить на всех стадиях эмбрионального развития мозга крысы, но максимальное его содержание совпадает с созреванием системы холинергической иннервации.

Сообщения *Y.-A.Bard* и соавт. (США), *K.Unsicker* и соавт. (ФРГ), *R.M.Lindsay* и соавт. (Великобритания) посвящены доказательству наличия в мозгу и описанию свойств других нейротрофических факторов белковой природы, способных предотвращать гибель нервных клеток и регулировать процессы развития периферической и центральной нервной системы.

В докладах *L.Svennerholm* (Швеция), *Н.Ф.Авровой*, *Н.М.Гулой* и соавт. (СССР), *A.Petroni* и соавт. (Италия) рассматривался вопрос о нейротрофических и нейритогенных функциях ганглиозидов. В докладе *KL.Svennerholm* подчеркивалось, что ганглиозиды представляют собой полифункциональные соединения, способствующие регенерации нервных клеток и выполняющие функции информационных молекул при осуществлении межклеточных коммуникаций. В докладе *Н.Ф.Авровой*, *Н.М.Гулой* и соавт. было показано, что экзогенные ганглиозиды при действии на клетки мышинной нейробластомы в культуре ткани обладают нейритогенным эффектом, причем при их действии, наряду с чертами морфологической дифференцировки нервных клеток, выявляются и черты биохимической дифференцировки.

В докладе *О.А.Крышталя* и соавт. (СССР) было показано, что на пластичность нервных клеток гиппокампа несомненное влияние оказывают возбуждающие аминокислоты и их антагонисты. Авторы на основании полученных экспериментальных данных предполагают, что хорошо известная пластичность гиппокампальных синапсов может в значительной мере основываться на их переходе из одного состояния в другое, причем эти переходы могут быть индуцированы фармакологическими агентами.

В докладах *G.L.Collingridge* и соавт. (Великобритания) и *M.A.Lynch* и соавт. (Великобритания) рассматривались данные, свидетельствующие о том, что процессы активации глутаминовых рецепторов могут играть

существенную роль в процессах памяти.

Ряд работ, доложенных на съезде, был посвящен биохимическому изучению глутаматных рецепторов. Так, в докладе *С.А.Дамбиновой* и соавт. (СССР) приводились данные о молекулярной организации связывающего глутамат белка, выделенного из синаптических мембран мозга человека с помощью аффинной и жидкостной хроматографии. Показано, что выделенный белок в модельных системах обладает свойствами глутаматных рецепторов, а моноклональные антитела против него могут использоваться в качестве их специфических маркеров.

Обсуждению механизмов действия нейрогормонов и кардиоактивных веществ, оказывающих воздействие на обмен медиаторов, были посвящены сообщения *А.А.Галояна* и соавт. и *М.Д.Чиflikян* и *А.А.Галояна* (СССР).

На съезде были оглашены изменения в составе Организационного Совета ЕНО. Председателем избрана *Anica Dahlström* (Швеция), секретарем Совета — *Anthony Turner* (Великобритания). В число членов Совета избраны *Uve Agid* (Франция), *Наталья Аврова* (СССР), *Volker Bigl* (ГДР) и *Wilfried Seifert* (ФРГ).

АВРОВА Н.Ф.

РЕФЕРАТЫ СТАТЕЙ, НАПРАВЛЕННЫХ НА
ДЕПОНИРОВАНИЕ В ВИНТИ

УДК 577.150.8

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ МЕМБРАНОСВЯЗАННОЙ
МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ МАО ПО КОЛИЧЕСТВУ
ОБРАЗОВАВШЕГОСЯ АММИАКА БЕЗ ЕГО
ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ОТГОНКИ

Молочкина Е.М., Боровок Н.В.

Флуорогенная реакция аммония с о-фтальевым альдегидом (ОФТА) и 2-меркаптоэтанолом (МЭ) дает возможность определять наномолярные количества аммиака в присутствии других аминокислот, аминов, белков, что позволяет надеяться на успешное определение выделившегося в катализируемой МАО реакции аммиака без его предварительного удаления из среды реакции.

Задачей данной работы было подобрать условия проведения и фиксации окислительного дезаминирования биогенных аминов (серотонин, тирамин) МАО митохондрий мозга для определения активности мембраносвязанного фермента по количеству выделившегося аммиака без отгонки последнего.

Фракцию митохондрий суспендировали в 100 мМ фосфатном буфере (рН 7,6). Реакцию проводили в пробирках с шлифованными пробками. Окисление вели кислородом воздуха при 37° и при постоянном встряхивании. Среда инкубации содержала 0,5 мл суспензии митохондрий (0,5—0,7 мг белка), 0,3 мл фосфатного буфера; реакцию начинали добавлением 0,1 мл раствора субстрата в том же буфере. Для фиксации реакции в среду инкубации добавляли 0,5 мл этанола, выпавший белок осаждали центрифугированием. К супернатанту добавляли 50 мкл реагента, содержащего по 10 мкмоль ОФТА и МЭ. В «слепые» пробы этанол приливали до добавления субстрата. Пробы, закрытые пробками, оставляли на 2 ч в темном месте, после чего измеряли флуоресценцию при $\lambda_{\text{возб.}} = 410-413$ нм, $\lambda_{\text{исп.}} = 476-480$ нм.

При определении активности МАО каждый раз готовили «внутренний стандарт», то есть проводили калибровку по сульфату аммония, добавленному в соответствующие «слепые» пробы.

Продукт реакции аммиака с ОФТА и МЭ определяли также спектрофотометрически по поглощению при $\lambda = 413$ нм. Получены калибровочные

кривые для спектрофотометрического определения аммония без его отгонки в присутствии белка и биогенных аминов. Этот метод также является удобным и перспективным для определения активности МАО по количеству аммиака.

Используя вышеописанный метод, определили активности МАО митохондрий мозга беспородных крыс и крыс линии *Крушинского-Молодкиной*. Об адекватности использованного метода говорит тот факт, что определенная нами в данной работе активность МАО беспородных крыс совпадает по величине с активностью, полученной ранее с использованием метода определения аммиака при его изотермической отгонке с последующей несслеризацией.

7 с.ил.5. библиогр. 9

Институт химической физики АН СССР

Поступила 18.01.1989

Рукопись депонирована в ВИНТИ 31.05.89, №3627-В89

УДК 616.379.577.16.1.3+577.15

ВЛИЯНИЕ АНТИОКСИДАНТОВ НА ПРОЦЕСС ПОЛ В ГОЛОВНОМ МОЗГУ ПРИ АЛЛОКСАНОВОМ ДИАБЕТЕ

Геворкян Д.М.

Между интенсивностью ПОЛ и составом и структурой липидной компоненты существует регуляторная взаимосвязь (Бурлакова, 1981). Изменения скорости ПОЛ находятся в прямой зависимости от количественных изменений эндогенных биоантиоксидантов, участвующих в обеспечении функциональной активности клетки.

В настоящее время изучение особенностей нарушения липидного обмена в головном мозгу является предметом интенсивного исследования.

Целью настоящей работы явилось изучение сдвигов процессов ПОЛ, уровня α -токоферола (α -Т), активности ферментов антиоксидантного действия—супероксиддисмутазы (СОД), глутатионпероксидазы (ГлП) и глутатионредуктазы (ГлР) в головном мозгу белых крыс при аллоксановом диабете (АД) на фоне применения α -токоферилацетата (α -ТА) и синтетического антиоксиданта дилудина (Дубур и соавт., 1979).

Полученные результаты свидетельствуют о статистически достоверном увеличении выхода малонового диальдегида (МДА) в гомогенатах головного мозга на протяжении 21 дня наблюдения как в NADPH-зависимой (НЗП), так и в аскорбатзависимой (АЗП) системах ПОЛ, причем кривая динамики свидетельствует о закономерно проявляющейся волнооб-

разности его в различные сроки формирования АД. Повышенными оказались также фоновые липидные перекиси и диеновые конъюгаты полиненасыщенных жирных кислот, дающие возможность судить об изменении скорости течения ПОЛ при АД. Довольно высокий уровень ПОЛ во все сроки наблюдения (7-, 14- и 21-й день) можно объяснить дефицитом антиоксидантов в головном мозгу при развитии патологического процесса, в частности, α -Т, уровень которого значительно уступает контрольным цифрам.

Существенным барьером, предохраняющим субклеточные органеллы от действия токсических продуктов ПОЛ, являются ферменты антиоксидантного действия—СОД, ГлП и ГлР. Активность СОД при АД была подавлена в мозговой ткани во все сроки наблюдения, особенно сильно на 21-й день, такова же была динамика изменения активности ГлП и ГлР, ингибированных к 21-у дню на 35 и 37% соответственно по сравнению с контрольным уровнем. В то же время наблюдалось увеличение затрат эндогенного α -Т. Внутривентрикулярное введение природного антиоксиданта α -ТА и синтетического—дилудина по лечебно-профилактической схеме приводило к значительному подавлению ПОЛ, которое к 21-у дню наблюдения устанавливался в НЗП и АЗП системах в пределах, значительно уступающих уровню их в головном мозгу интактных крыс.

Введение α -ТА и дилудина во все сроки наблюдения повышало уровень эндогенного α -Т, причем наблюдалась фазовость в его накоплении. Что касается ферментов антирадикальной защиты, то введение α -ТА и дилудина оказывало слабое воздействие на активность СОД и ГлР, которые к 21-у дню обнаруживали лишь тенденцию к повышению по сравнению с уровнем при АД. Упорядочение активности ГлП происходило более интенсивно и к 21-у дню завершалось максимальным приближением к контрольному уровню.

Таким образом, однонаправленность действия испытанных антиоксидантов очевидна. Однако степень их воздействия, сроки оптимального действия зависят от природы антиоксиданта, биологических особенностей мозговой ткани, потенциального уровня функционирующих в головном мозгу пусковых и защитных систем, ответственных за образование и нейтрализацию активных форм кислорода или участвующих в разложении перекисей нерадикальным путем. Не исключена роль систем, регулирующих метаболизм мембранных фосфолипидов и влияющих путем изменения состава ненасыщенных жирных кислот на скорость иницирования и продолжения цепной реакции.

10 с., ил., библиогр.17

Ереванский государственный
медицинский институт

Поступила 26.01.1989

Рукопись депонирована в ВИНТИ 31.05.89, №3623-В89

ОСОБЕННОСТИ АЗОТИСТОГО ОБМЕНА В ГОЛОВНОМ МОЗГУ КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ ХРОНИЧЕСКОЙ АНТЕНАТАЛЬНОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Швец Т.А.

Основная роль в генезе алкоголизма отводится нейроактивным аминокислотам, в частности, глутаминовой, аспарагиновой и ГАМК, выполняющим роль нейротрансмиттеров.

Этанол обладает способностью легко проникать через плацентарный барьер, поэтому в плаценте создается его такая же концентрация, как и в крови матери.

Многими клиническими и экспериментальными исследованиями доказано, что этанол обладает эмбриотоксическим, тератогенным и мутагенным действием на плод.

В ткани мозга крыс в возрасте 3, 10, 14, 21, 28 дней постнатального развития, подвергшихся в антенатальный период действию алкоголя, был изучен аминокислотный состав.

В мозговой ткани 3-дневных крыс количество аспарагиновой кислоты снижено по сравнению с контролем. В 28-дневном возрасте концентрация аспартата увеличивается в 2 раза и составляет 0,092 ммоль. Уровень глутамина к месячному возрасту повышается, незначительно превалируя в опытных пробах. Содержание ГАМК уменьшается к 28-дневному возрасту по сравнению с началом исследования в 2 раза. Концентрация глутаминовой кислоты также снижается с увеличением возраста животных.

Таким образом, в ткани мозга потомства алкоголизированных животных количество аспарагиновой кислоты и ГАМК уменьшено, а глутамина и глутаминовой кислоты увеличено по сравнению с контрольной группой.

Эти изменения, вызывая сдвиги в системе глутамин—глутаминовая кислота—ГАМК, могут повлечь за собой нарушения в синтезе белка.

6 с., ил.1, библиогр.8

Донецкий государственный
медицинский институт

Поступила 14.02.1989

Рукопись депонирована в ВИНТИ 31.05.89, №3628-В89

СО Д Е Р Ж А Н И Е

| | |
|--|-----|
| Армен Анушаванович Галоян (к 60-летию со дня рождения) | 163 |
| <i>Островский С.Ю., Кишмаа К.</i> Нейротрансмиттерные аминокислоты мозга генетических линий разнотолерантных к этанолу крыс | 167 |
| <i>Войтенко Н.Н., Пилязин А.И.</i> Действие L-ДОФА и 5-гидрокситриптофана на активность MAO мозга крыс | 175 |
| <i>Горошинская И.А., Стоянович Т., Миччи Д., Мриуля Б.Б.</i> Активность MAO в отделах мозга монгольских песчанок при церебральной ишемии и в период рециркуляции | 182 |
| <i>Самсоненко Р.А., Долженко А.Т., Ельский В.Н., Титиевский А.В.</i> Гарман модулирует функцию мелатонин-опиоидной системы мозга, участвующей в механизме развития травматического шока | 191 |
| <i>Гомазков О.А., Ростовцев А.П., Папфилов А.Д.</i> Соотношение энкефалинового и ангиотензинового пептидных звеньев в регуляции агрессивного поведения крыс | 197 |
| <i>Романцев Ф.Е., Тигранян Р.А., Прокопенко Н.П., Рябчук В.А.</i> Свойства комплекса биологически активных пептидов эпифиза | 204 |
| <i>Худавердян Д.Н., Тер-Маркосян А.С., Саргсян А.Р.</i> К механизму действия паратиреоидного гормона на функциональную активность нервных клеток | 210 |
| <i>Капля А.А., Кравцов А.В., Кравцова В.В., Горошиняк В.П.</i> Изоформы каталитической субъединицы $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -АТФазы мозга и их чувствительность к уабаину | 216 |
| <i>Корнеев А.Я., Левицкий Ю.А., Брусованик В.И.</i> Эндогенный ингибитор специфического связывания ^3H уабаина с $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -АТФазой из мозга быка | 224 |
| <i>Каландадзе И.В., Дзиеладзе Д.Т., Микеладзе Д.Г.</i> Выделение и свойства ядерной Ca^{2+} -кальмодулинзависимой протеинкиназы II из мозга крыс | 230 |
| <i>Ткаченко А.В.</i> Влияние билирубина и сывороточного альбумина на активность АХЭ в синапсомной мембране | 238 |
| <i>Чернявская Л.И., Архипова Г.В., Бурлакова Е.Б.</i> Изменения в составе и физико-химических свойствах липидов головного мозга как причина разной чувствительности ЦНС животных к раздражающим факторам | 249 |
| Краткие сообщения | |
| <i>Молодцова Г.Ф.</i> Регионарные и сезонные различия в связывании ^3H серотонина в мозгу крыс | 259 |
| <i>Таранова Н.П., Маликов У.М.</i> Метаболизм серотонина в области дорзального ядра шва и синего пятна головного мозга крысы в условиях невротицизации | 264 |
| <i>Зиматкин С.М., Пронько П.С., Тарасов Ю.А.</i> Альдегидокисляющая способность мозга крыс с различной алкогольной мотивацией в условиях острого стресса | 269 |
| <i>Рылов А.Л., Уткин Ю.Н.</i> Тестирование на моделях агрессивного поведения крыс и мышей трипептида pGluAsnGly | 273 |
| <i>Карагезян К.Г., Овелян Г.А., Кочарян К.М.</i> Изучение некоторых физико-химических свойств гистонов и хроматина головного мозга белых крыс при односторонней ганглиосимпатэктоми | 279 |
| Методы исследования | |
| <i>Изыкенова Г.А., Таранова Н.П.</i> Выделение опиятсвязывающих мембранных белков с помощью β -эндорфин- ω -аминогексилсефарозы | 282 |
| Обзоры | |
| <i>Иванов В.А.</i> Репарация ДНК в нервных клетках млекопитающих | 293 |
| Хроника | |
| <i>Аверова Н.Ф.</i> VII съезд Европейского нейрохимического общества | 307 |
| Рефераты статей, направленных на депонирование в ВИНТИ | |
| <i>Молочкина Е.М., Боровак Н.В.</i> Определение активности мембраносвязанной митохондриальной MAO по количеству образовавшегося аммиака без его предварительной отгонки | 311 |
| <i>Геворкян Д.М.</i> Влияние антиоксидантов на процесс ПОЛ в головном мозгу при аллоксановом диабете | 312 |
| <i>Швец Т.А.</i> Особенности азотистого обмена в головном мозгу крыс при действии хронической антенатальной алкогольной интоксикации | 314 |

CONTENTS

| | |
|---|-----|
| Galoyan A.A. (On his 60th Birthday) | 163 |
| <i>Ostrovsky S. Yu., Ktianna K.</i> Brain neurotransmitter amino acids in genetic strains of rats with different tolerance to ethyl alcohol | 167 |
| <i>Voitenko N. N., Piyansin A. I.</i> Effect of L-DOPA and 5-hydroxytryptophan on monoamine oxidase activity in rat brain | 175 |
| <i>Goroshinskaya I. A., Stojanovic T., Micic D., Mrsulja B.B.</i> Monoamine oxidase activity in various brain regions of mongolian gerbils under cerebral ischemia and during reperfusion | 182 |
| <i>Samsonenko R. A., Dolzhenco A. T., Yelsky V. N., Titievsky A. V.</i> Harmane modulates the function of melatonin-opioid brain system which participates in traumatic shock development | 191 |
| <i>Gomazkov O. A., Rostovtsev A. P., Panfilov A. D.</i> Interaction of enkephalin and angiotensin peptide systems in the regulation of rat aggressive behaviour | 197 |
| <i>Romantsev F. E., Tigranyan R. A., Prokopenko N. P., Ryabchuk V. A.</i> Properties of a pineal peptide complex possessing biological activity | 204 |
| <i>Khudaverdyan D. N., Ter-Marcosyan A. S., Sargsyan A. R.</i> On the mechanism of parathyroid hormone effect on functional activity of nerve cells | 210 |
| <i>Kaplya A. A., Kravtsov A. V., Kravtsova V. V., Gorishnyak V.P.</i> Isoforms of the catalytic subunit of brain Na ⁺ K ⁺ -ATPase and their ouabain sensitivities | 216 |
| <i>Karneev A. Ya., Levitsky Yu. A., Brusovanik V. I.</i> Endogenous inhibitor of the specific [³ H]-ouabain binding with bovine brain Na ⁺ K ⁺ -ATPase | 224 |
| <i>Kalandadze I. V., Dzeladze D. T., Mikeladze D. G.</i> Isolation and properties of nuclear Ca ²⁺ -calmodulin-dependent protein kinase II from rat brain | 230 |
| <i>Tkachenco A. V.</i> Influence of bilirubin and serum albumin on acetylcholinesterase activity in synaptic membrane | 238 |
| <i>Chernyavskaya L. I., Arkhipova G.V., Burlakova E.B.</i> Changes in the composition and physico-chemical properties of brain lipids as an explanation of different sensitivity of the central nervous system to stimulation | 249 |
| Short communications | |
| <i>Molodtsova G. F.</i> Regional and functional changes of 5-HT receptors in rat brain | 259 |
| <i>Taranova N. P., Malikov U. M.</i> Metabolism of serotonin in the area of rat brain raphe dorsalis and locus coeruleus under experimental neurosis | 264 |
| <i>Zimatkin S. M., Rronko P. S., Tarasov Yu. A.</i> Aldehyde-metabolizing capacity in the brain of rats with different preference to alcohol under the conditions of acute stress | 269 |
| <i>Rylov A. L., Utkin Yu. N.</i> Effect of tripeptide pGluAsnGly on aggressive behaviour of mice and rats | 273 |
| <i>Karagezian K. G., Hoveyan G. A., Kocharyan K. M.</i> Physico-chemical properties of histones and chromatin from rat brain after unilateral gangliosympathectomy | 279 |
| Methods | |
| <i>Izykenova G. A., Taranova N. P.</i> Isolation of opiate-binding proteins on β -endorphin- ω -aminohexyl sepharose | 282 |
| Reviews | |
| <i>Ivanov V. A.</i> DNA repair in nerve cells of mammals | 293 |
| Chronicles | |
| VII Congress of European neurochemical society. (Göteborg, Sweden, 12-17 of June.) | 307 |
| Summaries of manuscripts presented for deposition in All-Union Institute of Scientific and Technical Information | |
| <i>Moloshkina Ye. M., Borovok N. V.</i> The assay of mitochondrial membrane monoamine oxidase activity by microdetermination of ammonia without its removal from the reaction medium | 311 |
| <i>Gevorkyan D. M.</i> The effect of antioxidants on LPO in brain of animals with alloxane diabetes | 312 |
| <i>Shwetz T. A.</i> Nitrogen metabolism in rat brain during chronic antenatal alcohol intoxication | 314 |

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

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

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

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

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

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

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

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

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

Фамилии иностранных авторов даются в тексте на языке оригинала.

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

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.