

том 8, № 3, 1989

ISSN 0203-493X

НЕЙРОХИМИЯ

ՆԵՅՐՈՔԻՄԻԱ



АКАДЕМИЯ НАУК СССР
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

НЕЙРОХИМИЯ ՆԵՅՐՈԲՈՒՄԻԱ

ТОМ 8, ВЫП. 3
ИЮЛЬ—СЕНТЯБРЬ

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.А. Маргарян

Ст. редактор Э.А. Хачатурова

Лит. сотрудник Г.Р. Григорян

Сдано в набор 12.03.89г. Подписано в печать 5.03.90. ВФ 02796

Формат 70×108 ¹/₁₆. Бумага №1

Гарнитура «тип Таймс». Печать офсетная.

Печл. 9,88, усл. печ. л. 13,83 учет.-издл. 10,52 Тираж 665 экз. Заказ № 722

Издат. 7725. Цена 1р. 65к.

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

Типография Дилижанского гориздата ИПО «Периодика»

Гокомиздата Арм. ССР г. Дилижан, ул. Камо, 110

Редакционная коллегия

А. А. ГАЛОЯН—главный редактор

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

Редакционный совет

Н. Г. АЛЕКСИДЗЕ, О. Г. БАКЛАВАДЖЯН, А.Ю. БУДАНЦЕВ,
В. А. БЕРЕЗИН, М. Е. ВАРТАНЯН, Г. П. ГЕОРГИЕВ,
М. А. ДАВТЯН, С. А. ДАМБИНОВА, Н. Н. ДЕМИН,
Н. Д. ЕЩЕНКО, П. Г. КОСТЮК, Б. Н. МАНУХИН,
Д. Г. 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

1. ОФОРМЛЕНИЕ СПРАВОК-ЗАЯВЛЕНИЙ

Для получения гонорара автору необходимо оформить и выслать в ВААП справку-заявление автора.

СПРАВКА-ЗАЯВЛЕНИЕ оформляется:

- на листе бумаги стандартного формата;
- на пишущей машинке или печатными буквами от руки;
- на каждое наименование журнала и год его издания;
- с указанием следующих необходимых для расчета данных:
 1. Фамилия, имя, отчество (полностью)
 2. Год рождения
 3. Наличие детей
 4. Домашний адрес (с почтовым индексом, по прописке в паспорте)
 5. Телефоны (служебный, домашний)
 6. Выходные данные статьи:
 - наименование журнала
 - год издания
 - том
 - номер
 - страницы статьи
 7. Форма получения гонорара — указать нужное:
 - на текущий счет типа «В» — №.....
(только в свободноконвертируемой валюте),
наименование учреждения банка, в котором открыт счет;
 - в рублях — —счет №.... в отд. сбербанка
№.....расчетный счет №....
В.....
(наименование банка)
— почтовым переводом
— в кассе ВААП
 8. Льготы по подоходному налогу: удостоверение участника (инвалида) Великой Отечественной войны — указать серию, номер удостоверения, когда и каким учреждением выдано.
 9. Дата
 10. Личная подпись

II. СРОКИ ВЫПЛАТЫ ГОНОРАРА

Выплата авторского гонорара начинается через 2 года и заканчивается через 4 года после выхода последнего номера журнала в СССР (например, выплата гонорара за перепечатку статей, опубликованных в журналах в 1988г., будет производиться с 1 января 1991г. по 30 декабря 1992 г.).

Всесоюзное агентство по авторским правам напоминает, что срок обращения авторов в Агентство по гонорарам за переиздание журналов 1986г. истекает 1 ноября 1990 г. и т. д.

Пропуск авторами сроков направления в ВААП справок-заявлений влечет за собой перечисление не востребовавшихся сумм в доход государства и утрату авторами права на их получение.

Расчет и выплата гонорара производятся в течение года, в котором в ВААП поступила справка-заявление.

Справки-заявления направлять:

— почтой по адресу: 103670, Москва, К-104, Б. Бронная, 6а, ВААП

— либо в отдел расчета по журналам — Москва, Малая Бронная, д. 19, ком. 306.

Тел.: 203-59-53

УДК 577. 352. 46 + 577. 352. 335

ТРАНСПОРТ [^3H] ГАМК ЧЕРЕЗ МЕМБРАНЫ СИНАПТОСОМ, МОДИФИЦИРОВАННЫЕ СИНТЕТИЧЕСКИМ АНТИОКСИДАНТОМ ФЕНОЗАНОМ-К

Жарикова А. Д., Жариков С. И.,
Буданцев А. Ю., *Чернявская Л. И.

Институт биологической физики АН СССР, Пуццано

**Институт химической физики АН СССР, Москва*

Исследовали активность высокоаффинного Na^+ -зависимого транспорта [^3H] ГАМК в синапсомы, мембрана которых модифицировалась синтетическим антиоксидантом фенозаном -К (калиевая соль γ -(4-окси-3,5-ди-трет-бутилфенил)-пропионовой кислоты). Показано, что в зависимости от концентрации фенозан-К оказывает противоположные влияния на транспорт [^3H] ГАМК. Низкие концентрации фенозана-К (10^{-7} и 10^{-5}M), добавленные в течение 5-минутной преникубации синапсом, стимулировали мембранный транспорт [^3H] ГАМК. В концентрации 10^{-3} и 10^{-4}M фенозан-К не оказывал эффекта. При использовании высокой концентрации фенозана-К (10^{-1}M) наблюдалось ингибирование транспорта [^3H] ГАМК через мембраны синапсом, которое устранялось при одновременном добавлении в инкубационную среду БСА (1 мг/мл). Анализ собственных результатов и данных литературы позволяет высказать предположение, что эффекты синтетического антиоксиданта фенозана-К на Na^+ -зависимый мембранный транспорт [^3H] ГАМК в синапсомы опосредуются через эндогенные насыщенные жирные кислоты, которые могут осуществлять контроль микровязкости синаптических мембран.

* * *

Установлено, что пресинаптические окончания ГАМК-ергических нейронов способны поглощать ГАМК из синаптической щели с помощью высокоаффинной Na^+ -зависимой транспортной системы захвата [1]. Этот механизм, наряду с поглощением в постсинаптические элементы и глию, по-видимому, служит для удаления ГАМК, высвободившейся из нервного окончания в процессе нейротрансмиссии [2,3]. Основным компонентом системы транспорта ГАМК через синаптические мембраны в головном мозгу крыс является гликопротеин с M_r 80 кД, способный образовывать димеры [3]. К настоящему времени довольно детально исследована зависимость функциональной активности ГАМК-переносчика от градиента концентраций ионов по разные стороны пресинаптической мембраны и установлено, что переносчик катализирует котранспорт Na^+ , Cl^- и ГАМК [4].

Несомненно, что в функционировании ГАМК-переносчика значительная роль должна принадлежать мембранным липидам, которые могут влиять на конформацию и функциональную активность белка-переносчика одновременно с помощью различных механизмов (аллостерического взаимодействия, изменения соотношения липид-белок и микровязкости мембран, изменения заряда липидов и т. д.). Однако имеющиеся в литературе

данные пока не позволяют четко определить роль липидов синаптических мембран в транспорте ГАМК [5, 6]. Одним из эффективных подходов к изучению роли мембранных липидов в функционировании ГАМК-переносчика является химическая модификация липидного биослоя. В последнее время для изучения значения состава и свойств липидов в процессах, происходящих в синаптических мембранах, активно используются синтетические антиоксиданты [7, 8]. В настоящей работе сообщаются результаты исследования транспорта [^3H] ГАМК через мембраны синапсом, модифицированные антиоксидантом фенозаном-К, относящимся к классу экранированных фенолов.

Материалы и методы

В работе использовали: HEPES («Sigma», США), трис («Merck», ФРГ), БСА («Koch-Light Lab», Великобритания), γ -амино [2,3- $^3\text{H}_2$]-масляную кислоту гидрохлорид (У. А. 57,43 Ки/ммоль, Ленинград, СССР), фенозан-К (водорастворимая калиевая соль γ -(4-окси-3,5-ди-трет-бутилфенил) пропионовой кислоты; синтезирован в Институте химической физики АН СССР). Остальные реактивы отечественного производства квалификации хч и осч.

Препараты синапсом получали из коры и подкорковых структур мозга белых крыс-самцов линии *Wistar* массой 140—150 г по методу Hajos [9]. Конечный осадок синапсом ресуспендировали в 0,32 М сахарозе (HEPES-NaOH-буфер, 10 mM, pH 7,4) и хранили на холоде. Аликвоты полученной суспензии синапсом объемом 50 мкл (200 мкг синапсомного белка, определяемого по Lowry и соавт. [10]) добавляли в инкубационные пробирки со средой следующего состава (в mM): NaCl — 132; KCl — 5; MgCl_2 — 1,2; NaH_2PO_4 — 1,2; CaCl_2 — 1,2; HEPES — 10; глюкоза — 10; pH инкубационной среды доводили до 7,4 трисом. Перед добавлением в пробирки [^3H] ГАМК синапсомы преинкубировали в данной среде при 37° в течение 5 мин. Фенозан-К добавляли в пробирки в начале преинкубации, а в некоторых экспериментах за 10 с до добавления [^3H] ГАМК. Конечный объем среды в период инкубации с [^3H] ГАМК составлял 1 мл, а начальная концентрация [^3H] ГАМК — 10^{-5} М. Инкубация синапсом с [^3H] ГАМК продолжалась 5 мин. Транспорт [^3H] ГАМК в синапсомы останавливали методом фильтрования через мембранные фильтры («Millipore», США) с размером пор 0,65 мкм. Количество аккумулязированной в синапсомах [^3H] ГАМК оценивали по радиоактивности фильтров, определяемой в сцинтилляционной смеси на основе толуола. Количество [^3H] ГАМК, накопившейся в синапсомах путем активного Na-зависимого транспорта через синапсомные мембраны, определяли по разности между значениями, полученными в присутствии и в отсутствие Na^+ (в последнем случае NaCl в инкубационной среде заменяли эквимоллярным количеством LiCl). Статистическую обработку данных проводили с помощью стандартных программ на ЭВМ.

Результаты и обсуждение

Полученные нами экспериментальные данные по влиянию различных концентраций фенозана-К на Na-зависимый транспорт [^3H]ГАМК через мембраны синапсом, выделенных из головного мозга крыс, представлены в табл. 1. Как видно из таблицы, в зависимости от использованной концентрации фенозан-К оказывает противоположные эффекты на захват

Таблица 1

Влияние различных концентраций фенозана-К на Na-зависимый транспорт [^3H] ГАМК в синапсомы

	Накопление [^3H] ГАМК в синапсомы (в пмоль на 1 мг белка за 5 мин)
Контроль	3,08 ± 0,04
Фенозан, 10^{-7} М	3,33 ± 0,13
10 ⁻⁸ М	3,62 ± 0,09*
10 ⁻⁹ М	3,56 ± 0,09*
10 ⁻¹⁰ М	3,23 ± 0,11
10 ⁻¹¹ М	2,22 ± 0,06*
Фенозан 10^{-7} М + БСА (1 мг/мл)	2,88 ± 0,15
БСА (1 мг/мл)	2,94 ± 0,18

Примечание. Представлены данные 4-5 экспериментов в 3-х параллелях. *Различия с контролем достоверны с $p < 0,001$.

[^3H]ГАМК синапсомы. Низкие концентрации фенозана-К (10^{-7} и 10^{-8} М) увеличивают аккумуляирование [^3H]ГАМК в синапсомы на 17,9 и 16,3% соответственно. В концентрациях 10^{-9} и 10^{-10} М фенозан-К не оказывал эффекта. Характерно, что отсутствие эффекта фенозана-К при концентрации 10^{-11} М наблюдалось при разных временах преинкубации

Таблица 2

Влияние разного по времени контакта фенозана-К (10^{-7} М) с мембранами синапсом на Na-зависимый транспорт [^3H]ГАМК

	Захват [^3H] ГАМК синапсомы (в пмоль на 1 мг белка за 5 мин)
Контроль	3,08 ± 0,04
Фенозан 10^{-7} М, 5 мин	3,47 ± 0,15
10 мин	3,23 ± 0,11
15 мин	2,97 ± 0,58

Примечание. Представлены данные 3-4 экспериментов, сделанных в 3-х параллелях.

с синапсомы, или другими словами, при разном времени его контакта с синаптическими мембранами (табл. 2). Высокие концентрации фенозана-К (10^{-7} М) на 27,9% ингибировали Na-зависимый транспорт [^3H]ГАМК в синапсомы. Ингибирующее влияние высокой концентрации фенозана-К устранялось при одновременном добавлении в инкубационную среду БСА (1 мг/мл), который не влиял на мембранный транспорт [^3H]ГАМК. Анализ концентрационной зависимости эффектов фенозана-К на синапсомный транспорт [^3H]ГАМК позволяет высказать ряд предпо-

ложений о возможных механизмах его действия на этот процесс. Известно, что включение антиоксидантов в синаптические мембраны сопровождается повышением устойчивости мембранных липидов к окислению, а также неспецифическим модифицирующим действием антиоксидантов на структуру мембран [11—13]. Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о том, что в зависимости от концентрации в действии антиоксидантов, в том числе и фенозана-К, может преобладать тот или иной эффект. Так, Хохлов, Бурлакова [7] установили, что в наномолярных и миллимолярных концентрациях фенозан-К по-разному влияет на физико-химические свойства синаптических мембран, что коррелирует с разнонаправленными изменениями активности М-холинергической системы головного мозга крыс. По мнению авторов, эффективность низких концентраций фенозана-К не обусловлена структурными изменениями мембранных липидов, а, вероятно, связана с наличием специфических мест связывания для фенозана-К на синаптической мембране. С другой стороны, эффекты фенозана-К в концентрациях выше 10^{-5} М авторы объясняют его неспецифическим взаимодействием с синаптическими мембранами и обнаруженными изменениями физико-химического состояния мембранных липидов. Концентрационная зависимость влияния на свойства модельных и биологических мембран установлена также для дибунола [13] и α -токоферола [14,15]. Показано, например, что α -токоферол в концентрации 10^{-4} М оказывает стабилизирующее действие на синапсосомы, обработанные олеиновой кислотой или фосфолипазами A_2 и C , которое проявляется в снижении отрицательного поверхностного потенциала, повышении трансмембранного потенциала и увеличения микровязкости синаптических мембран [15]. Стабилизирующее действие α -токоферола на биологические мембраны связывают с его прямым взаимодействием со свободными жирными кислотами, образующимися при гидролизе мембранных фосфолипидов под действием фосфолипаз [16]. Более высокие концентрации α -токоферола порядка 10^{-3} М вызывают значительное увеличение подвижности модельных мембран из дипальмитоил- α - α -фосфатидилхолина и линолевой кислоты [14] и генерацию супероксидного анион-радикала в синаптических мембранах [20]. Учитывая вышеизложенное, можно предполагать, что в проведенных нами экспериментах в низких концентрациях (10^{-7} и 10^{-5} М) фенозан-К взаимодействует с эндогенными свободными жирными кислотами, присутствие которых показано в препаратах синапсосом [17]. В результате взаимодействия может устраняться ингибирующий эффект эндогенных ненасыщенных жирных кислот на обратный захват нейромедиаторов, обнаруженный ранее рядом исследователей [17, 18], а в проведенных нами экспериментах наблюдается увеличение Na-зависимого транспорта [3 H] ГАМК в синапсосомы. В свою очередь действие высоких концентраций фенозана-К (10^{-3} М) на мембранный транспорт [3 H] ГАМК, вероятно, связано с дестабилизацией синаптических мембран за счет собственного (или опосредованного другими механизмами) хаотропного эффекта. При использовании промежуточной концентрации фенозана-К (10^{-4} М) его хаотропный эффект не проявляется, так как компенсируется стабилизирующим действием. По этой причине мы и не наблюдали измене-

ний синаптосомного транспорта [^3H] ГАМК под действием 10^{-4} М фенозана-К.

Полученный нами факт, что БСА предотвращает ингибирующий эффект фенозана-К (10^{-3} М) на Na-зависимый транспорт [^3H] ГАМК, можно объяснить либо связыванием БСА с высвобождающимися под действием фенозана-К ненасыщенными жирными кислотами (если такое высвобождение действительно имеет место), либо непосредственным взаимодействием БСА с фенозаном-К и устранением хаотропного эффекта последнего. Для уточнения действительно происходящих процессов необходимы дополнительные исследования. Однако мы склонны предполагать, что эффекты синтетического антиоксиданта фенозана-К на Na-зависимый мембранный транспорт [^3H] ГАМК в синаптосомы опосредуются через эндогенные свободные ненасыщенные жирные кислоты, которые контролируют микровязкость синаптических мембран.

Высказанное нами предположение относительно механизма действия различных концентраций фенозана-К на Na-зависимый мембранный транспорт [^3H] ГАМК в синаптосомы находит подтверждение в работах других исследователей. Так, например, способность фенозана-К снижать микровязкость клеточных мембран обнаружена на плазматических мембранах печени [8] и синаптических мембранах головного мозга крыс [7]. Однако следует отметить, что, по данным Мальцевой и Бурлаковой [8], фенозан-К в концентрации 10^{-4} М не изменяет микровязкость синаптических мембран, что согласуется с наблюдавшимся нами отсутствием эффекта этой концентрации на синаптосомный захват [^3H] ГАМК.

Наша трактовка полученных в данной работе экспериментальных данных согласуется с результатами исследований Ковалевой и соавт. [19], в которых изучалось действие антиоксидантов на захват и высвобождение [^3H] серотонина синаптосомами мозга крыс и одновременно с этим определялось содержание продуктов перекисного окисления липидов. Указанными авторами установлено, что антиоксиданты α -токоферол, 7-оксипаминазин, аминазин, пегинол и 2-метил-6-этил-3-оксипиридин в достаточно высоких концентрациях ($5 \cdot 10^{-4}$ М) тормозят захват и стимулируют высвобождение [^3H] серотонина синаптосомами с помощью механизмов, не связанных с ингибированием перекисного окисления фосфолипидов. И это еще раз дает нам основание объяснять ингибирующее действие 10^{-3} М фенозана-К не антиокислительными свойствами, а его действием на структуру синаптических мембран.

Таким образом, анализ полученных нами данных по влиянию различных концентраций фенозана-К на высокоаффинный транспорт [^3H] ГАМК через синаптические мембраны подтверждает высказанное нами ранее [21] положение о том, что функциональная активность систем мембранного транспорта нейромедиаторов зависит от микровязкости синаптических мембран.

Авторы выражают свою признательность проф. Е. Б. Бурлаковой за поддержку в проведении работы и полезные обсуждения полученных результатов.

TRANSPORT OF [3 H]- γ -AMINO BUTIRIC ACID THROUGH SYNAPTOSOMAL MEMBRANES MODIFIED BY SYNTHETIC ANTIOXIDANT — PHENOZANE-K

Zharikova A. D., Zharikov S. I.,
Budantsev Yu. A.,*Chernyavskaya L. A.

Institute of Biological Physics, USSR Academy of Sciences, Pushchino

**Institute of Chemical Physics,*

USSR Academy of Sciences, Moscow

Activity of high affinity Na^+ -dependent transport of [3 H]- γ -aminobutyric acid ([3 H]-GABA) was studied in synaptosomal membranes modified with synthetic antioxidant—phenozane-K (potassium salt of γ -(4-oxy-3,5-di-tert-butylphenyl)propionic acid). It was shown that the effects of phenozane-K on [3 H]-GABA transport are opposite depending on its concentration. When added in low concentrations (10^{-7} and 10^{-5} M) during 5 min preincubation of synaptosomes, phenozane-K stimulated membrane transport of [3 H]-GABA, while in concentration 10^{-9} and 10^{-4} M phenozane-K was ineffective. Used in high concentrations (10^{-3} M) phenozane-K inhibited [3 H]-GABA transport through synaptosomal membranes; this inhibition could be eliminated with simultaneous addition of bovine serum albumin (1 mg/ml) to the incubation medium. Analysis of the results obtained and literary data allows us to suppose that the effects of synthetic antioxidant, phenozane-K, on Na^+ -dependent membrane transport of [3 H]-GABA into synaptosomes is mediated by endogenous nonsaturated fatty acids which, probably, regulates microviscosity of synaptic membranes.

ЛИТЕРАТУРА

1. Iversen L. L. Brit. J. Pharmacol., v. 41, p. 571—591, 1971.
2. Cupello A., Huden H. Cell and Mol. Neurobiol., v. 6., p. 1—16, 1986.
3. Radin R., Bendahan A., Kanner B. I. J. Biol. Chem., v. 261, p. 15437—15441, 1986.
4. Radian R., Kanner B. I. J. Biol. Chem., v. 260, p. 11859—11865, 1985.
5. De Medio G. E., Trovarelli G., Hamberger A., Porcellati G. Neurochem. Res., v. 5, p. 171—197, 1980.
6. Chweh A. Y., Leslie S. W. J. Neurochem., v. 38, p. 691—695, 1982.
7. Бурлакова Е. Б., Хохлов А. П. Биол. мембраны, т. 1, с. 117—121, 1984.
8. Мальцева Е. Л., Бурлакова Е. Б. Биол. мембраны, т. 3, с. 773—780, 1986.
9. Hajos F. Brain Res., v. 93, p. 485—489, 1975.
10. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
11. Бурлакова Е. Б., Джалябова М. И., Гавахария В. О., Глуценко Н. Н., Молочкина Е. М., Штолько Б. Н. — В кн.: Биодантиоксиданты в регуляции метаболизма в норме и патологии, М., Наука, с. 113—140, 1982.
12. Ерин А. Н., Горбунов Н. В., Брусованик В. И., Тюрин В. А., Прилипко Л. Л. Биохимия, т. 50, с. 998—1004, 1985.
13. Иванов И. И., Королев Н. П., Семин Б. К., Лап В., Вундерлих Э., Пликет Ф. Биол. науки, № 5, с. 35—40, 1986.
14. Скрыпин В. И., Ерин А. Н., Братковская Л. Б., Казан В. Е. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 97, с. 673—675, 1984.

15. Брусованик В. И., Ерин А. Н., Селищева А. А., Горбунов Н. В., Тюрин В. А., Прилипко Л. Л., Казан В. Е. Нейрохимия, т. 5, с. 3—10, 1986.
16. Ерин А. Н., Спириг М. М., Табидзе Л. В., Казан В. Е. Биохимия, т. 48, с. 1855—1861, 1983.
17. Rhoads D. E., Ocker R. K., Peterson N. A., Raghupathy E. Biochemistry, v. 22, p. 1965—1970, 1983.
18. Rhoads D. E., Kaplan M. A., Peterson N. A., Raghupathy E. J. Neurochem., v. 38, p. 1255—1260, 1982.
19. Ковалева Е. С., Прилипко Л. Л., Муранов К. О., Казан В. Е. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 95, с. 55—57, 1983.
20. Takahashi M., Yoneda Y., Kurijama K. Brain Res., v. 296, p. 164—167, 1984.
21. Жарикова А. Д., Жарикова С. И. Нейрохимия т. 6, N 4, с. 581—585, 1987.

Поступила 15.10.1988

УДК612.017.1:612.8.015.3:612.8—009.24

ИММУНОЛОГИЧЕСКОЕ ВМЕШАТЕЛЬСТВО В НЕЙРОХИМИЧЕСКИЕ И НЕЙРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ: КАТЕХОЛАМИНЫ, ПОВЕДЕНИЕ И СУДОРОЖНАЯ ГОТОВНОСТЬ БЕЛЫХ КРЫС, ИММУНИЗИРОВАННЫХ КОНЪЮГАТОМ АЛЬБУМИНА С СИДНОФЕНОМ

Ашмарин И. П., Данилова Р. А., Мельник Е. И.,
Обухова М. Ф., Сагимбаева Ш. К., Циренина М. Л.,
Ганжа С. Ю., Колтовая Н. А.

МГУ им. М. В. Ломоносова

Институт прикладной молекулярной биологии МЗ СССР, Москва

В статье на основании литературных и собственных экспериментальных данных рассматривается перспективный формирующийся путь «инверсной» регуляции, то есть коррекции биохимического и физиологического статуса организма посредством активной иммунизации к биорегуляторам — как эндогенным, так и экзогенным.

Иммунизация конъюгатами аналога фенимина сиднофена с БСА позволяет на длительный период изменять как биохимические (содержание катехоламинов), так и физиологические (поведение, алкоголизируемость, судорожная чувствительность) показатели у крыс.

* * *

В последние годы все чаще используется метод иммунологического изменения состояния регуляторных систем организма. Ранее преобладали эксперименты по пассивной иммунизации антителами к тем или иным регуляторам (пептидам, классическим нейромедиаторам и т.п.). Они принесли определенную пользу, хотя очевидный недостаток этого пути состоял в кратковременности эффекта. Активная иммунизация к регуляторным соединениям, осуществляемая, как правило, введением ковалентных конъюгатов регуляторных соединений с антигенами-носителями, ведет к длительным и глубоким эффектам, так как образование антител охватывает периоды времени, измеряемые месяцами (а в ряде случаев особенно при реиммунизации, — годами). В то же время, биохимический и физиологический эффект всегда оказывается более сложным, так как длительное связывание антителами одного регулятора не может не оказывать влияния на состояние других, сопряженных с ним регуляторных систем.

Понятна привлекательность такого пути воздействия на организм и для теоретических исследований, и для практической перспективы: длительный эффект при малом числе воздействий. История исследования активной иммунизации к эндогенным биорегуляторам своеобразна. Для развития методов радиоиммунного и иммуоферментного определения низкомолекулярных веществ уже давно разработаны методы получения

антисывороток к этим гаптенам, основанные на активной иммунизации животных соответствующими конъюгатами. Однако исследователей интересовала при этом, главным образом или исключительно, высокоактивная сыворотка, а глубокие биохимические и физиологические сдвиги в организме донора сыворотки не привлекали внимания.

Отметим исследования, которые можно отнести к числу наиболее эффективных по глубине, длительности и интересности сдвигов при активной иммунизации к биорегуляторам. Прежде всего это большой цикл работ по иммунизации к люлиберину животных разных видов [1]. Он привел к созданию метода иммунологической кастрации, с одной стороны, и к новым способам модуляции активности половых желез при раке, с другой. Параллельно развивавшийся цикл работ по иммунизации к соматостатину [2] привел к формированию метода значительной стимуляции роста ряда животных, в том числе сельскохозяйственных. Опубликованы сообщения о значительных и длительных сдвигах функций при иммунизации к ряду других регуляторов [3—5]: к тиролиберину — снижение уровня йодтиронинов и пролактина, к кортиколиберину — подавление функций и частичная редукция мозгового слоя надпочечников, к брадикинину — моделирование длительной гипертонии, к кортикотропину «4—10» — подавление обучаемости, к β -эндорфину — подавление фобий и индукция «киндлинга», к серотонину — снижение влечения к алкоголю экспериментальных животных. Как правило, общая направленность эффектов иммунизаций к биорегулятору является обратной по отношению к эффектам того же биорегулятора как такового. Иногда, однако, возникают и непредсказуемые эффекты. Например, при иммунизации к β -эндорфину не наблюдалось повышения ноцицепции, хотя именно этот эффект можно было ожидать, исходя из анальгетической активности опиоидов. Не наблюдалось, как правило, гипотензии при иммунизации к ангиотензину II, хотя иммунизация к ренину — одному из генераторов ангиотензина II вела к стойкой глубокой гипотензии [6]. Такие отклонения от общего направления эффектов немногочисленны. Поэтому описываемый путь можно назвать инверсной регуляцией биохимического и физиологического статуса.

Инверсная регуляция может осуществляться не только с помощью эндогенных регуляторов. Многим фармакологическим средствам соответствуют в организме те или иные эндогенные аналоги-регуляторы или их комплексы. Так обстоит дело с эндогенными аналогами опиатов, бензодиазепинов, антидепрессантов, нейролептиков и т.п. Поэтому соединение с антигенами-носителями фармакологических средств и иммунизация такими конъюгатами индуцирует образование антител не только к ним самим, но и к их эндогенным аналогам-регуляторам. В свою очередь это также ведет к длительным изменениям биохимического и физиологического статуса. Целесообразность использования эндогенного биорегулятора или фармакологических агентов экзогенного происхождения определяется особенностями конкретных задач того или иного исследования.

Мы обратились к некоторым антидепрессантам и психостимуляторам, рассчитывая на то, что образующиеся антитела могут связывать их эндогенные аналоги и формировать длительные состояния, сходные с эффектами агентов нейролептического характера. В частности, был избран

сиднофен — психостимулятор и антидепрессант, родственный по структуре фенамину, и как антиген-носитель — БСА.

Материалы и методы

Конъюгирование сиднофена — 3-(β -фенилизопропил)-сиднонемино гидрохлорида (СССР) с БСА велось с помощью глутарового альдегида и позволяло варьировать уровень связывания сиднофена от 5 до 35 моль на 1 моль белка. Предварительный цикл экспериментов показал, что наибольший уровень образования антител к сиднофену и наиболее выраженные физиологические сдвиги наблюдаются при иммунизации белых крыс конъюгатом, содержащим от 18 до 28 моль сиднофена на 1 моль белка, троекратно в дозе около 800 мкг/кг с недельными интервалами, первые два раза — с полным адъювантом Фрейнда (ПАФ). Титры антител в период наибольшего развития физиологических сдвигов — через 2 месяца после первой иммунизации составляли, как правило, 1/256 — 1/2048.

Известно действие сиднофена (как и других соединений сидноиминового ряда) на катехоламинергическую передачу. Если ориентироваться на изложенную выше концепцию, то представляется вероятным, что гипотетические эндогенные аналоги сиднофена, которые могут связываться антителами к сиднофену, так или иначе сопряжены с системой катехоламинов. Поэтому мы в первую очередь определили уровень катехоламинов в плазме крови и в головном мозгу иммунизированных крыс. Головной мозг (без стволовой части) непосредственно после декапитации беспородных крыс-самцов массой 180—200 г гомогенизировали с 1,5 мл 0,1 н. HClO_4 , центрифугировали (3 мин, 8000 g). 200 мкл супернатанта использовали для определения норадреналина, дофамина и серотонина с помощью ВЭЖХ; колонка Lichrosorb RP—18, элюент — 0,5 М фосфатный буфер (pH 3,8) с добавкой 80 мг/л гексансульфоната натрия в 4%-ном метаноле. Детектирование осуществляли с помощью спектрофлуорометра («Hitachi», Япония), модель 650—60, с проточной кюветой объемом 10 мкл; λ возбуждения — 280 нм, λ эмиссии — 320 нм.

Кровь (0,5—1,0 мл), отобранную при декапитации животного, после добавления гепарина обрабатывали по методу Mogi [7]. Для определения серотонина супернатант после отделения окиси алюминия обрабатывали 75 мкл 60%-ной хлорной кислоты, осадок отделяли, раствор обрабатывали 10%-ным NaOH до pH 3,5. 100 мкл полученного раствора использовали для анализа методом ВЭЖХ в условиях, указанных выше.

Результаты и обсуждение

Весь комплекс данных, представленных на рис. 1, свидетельствует о существенно меньшем уровне норадреналина в крови иммунизированных к сиднофену крыс на 32—47-й день по сравнению с контрольными. Особо на рисунках выделена часть данных, полученных на группах крыс, в которых уровень норадреналина в крови контрольных животных превышал 4,5 нг/мл плазмы. В этом случае различия выражены еще резче. Менее выраженным является сравнительный дефицит дофамина в мозгу.

Динамика процесса, как правило, состояла в некотором начальном повышении уровня норадреналина и адреналина в крови и мозгу на 12—25 дни. Далее следовало значительное снижение концентрации норадреналина и менее значительное снижение концентрации адреналина в крови на 32—47 дни. Концентрация дофамина снижалась, уже начиная с 12-го дня, но существенное снижение наблюдалось к 32—47 дню.

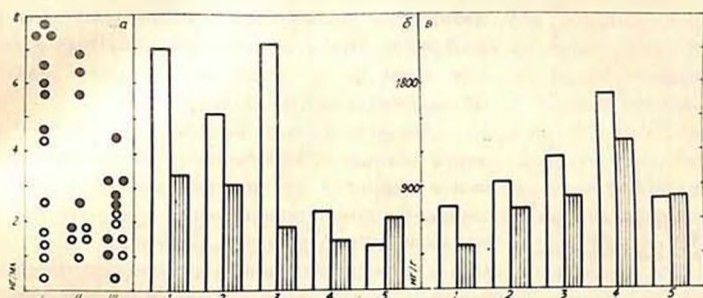


Рис.1. Содержание норадреналина в плазме крови и дофамина в мозгу контрольных и иммунизированных конъюгатом сиднофена с БСА крыс (на 32—47-й день после первой иммунизации). а — уровень норадреналина (пг/мл плазмы) у контрольных (I), иммунизированных БСА (II) и иммунизированных конъюгатом (III) животных; б — средние значения уровня норадреналина в разных сериях опытов. □ — контрольные животные, ■ — иммунизированные конъюгатом животные. 1 — 5 — серии опытов, а — средние значения уровня дофамина (нг/г ткани) в мозгу контрольных и иммунизированных конъюгатом животных

Наибольшие сдвиги в поведении крыс также отмечены на 30—50-е сутки после иммунизации. Лишь в части опытов существенные сдвиги наблюдались уже на 20-е сутки. Главные изменения выявляются в тестах с использованием пищедобывательной лабиринтной методики. Детально они изложены ранее [8, 9]. У большинства иммунизированных конъюгатом животных при помещении их в экспериментальную обстановку отмечается сниженный уровень ориентировочно-исследовательской активности, неподвижность, оцепенение. Характерны настораживание, пугливость, боязнь взять подкрепление из кормушки; двигательная активность чаще проявляется импульсами. Все это сопровождается и отдельными признаками вегетативного возбуждения (частая дефекация, уринаяция). В общем наблюдается пассивное поведение с отдельными проявлениями тревоги. Образование пищедобывательного навыка у этих животных оказывается сильно затрудненным, а иногда вообще невозможным. С 1-го по 4-й день обучения таких крыс сохраняется низкий уровень выполнения, без положительной динамики как по числу реакций, так и по времени их выполнения; доля крыс с низкими показателями обучения, в том числе и крыс, которые не выполняют за все опытные дни ни одной подкрепляемой реакции, значимо больше, чем в контрольных группах ($p \leq 0,01$; вводили либо БСА, обработанный глутаровым альдегидом, с ПАФ, либо сиднофен, либо физиологический раствор).



Рис.2. Временные показатели наступления коразолового судорожного припадка при введении физиологического раствора (1), сиднофена (2), после иммунизации БСА (3) и после иммунизации конъюгатом сиднофена с БСА (4,5): тестирование через 35—40 дней после первой иммунизации (4) и через 60 и более дней (5). По оси абсцисс — номера групп, по оси ординат — величина, обратная латентному периоду судорожного припадка в минутах. Ме — медиана, n — число животных, звездочкой отмечены статистически значимые различия по сравнению с группами 1, 2, 5 ($p < 0,01$) и группой 3 ($p < 0,05$)

у иммунизированных к сиднофену крыс, а также данные литературы о способности сиднофена как такового стимулировать потребление алкоголя, побудили нас оценить в той же схеме эксперимента влияние конъюгата сиднофена на возможность «алкоголизации» крыс. Эти данные опубликованы ранее [9] и с высоким уровнем достоверности свидетельствуют о возможности таким путем подавить процесс «алкоголизации» животных. Возможная роль в механизмах этого процесса изменений уровня катехоламинов следует не только из представленных выше данных, но и из публикаций [4, 5], где подавление алкогольной мотивации достигалось

Вызванные конъюгатом изменения начинают проявляться через неделю после окончания иммунизации, максимально развиваются через 2—4 недели и сохраняются до 1,5—2 месяцев. О подавлении ориентировочно-исследовательской активности у иммунизированных крыс свидетельствует и снижение показателей в норковом тесте и при помещении крыс в трехлучевой лабиринт с регистрацией числа заходов в каждый рукав. При тестировании животных в открытом поле до и после иммунизации различий между группами не обнаружено.

По результатам выработки условного рефлекса активного избегания существенных различий в скорости достижения критерия обучения между иммунизированными и контрольными животными не наблюдается. Отмечена лишь тенденция к улучшению условнорефлекторных показателей у крыс, которым вводили сиднофен, и ухудшение у крыс, иммунизированных БСА, причем различие между этими группами достоверно ($p \leq 0,05$). Однако у крыс, иммунизированных конъюгатом, достоверно увеличивается латентный период условнорефлекторной реакции избегания тока (на свет).

Что касается изменений в контрольных сериях, то необходимо отметить некоторое, хотя и сравнительно небольшое, снижение условнорефлекторных показателей при выработке пищедобывательного навыка в группе, иммунизированной БСА с ПАФ. Однако это наблюдается только в первый день обучения, и все описанные выше признаки поведения, характерные для опытных крыс, животным данной группы не присущи. Введение конъюгата сиднофена с БСА приводит к гораздо более глубоким и качественно отличающимся изменениям.

Глубина и длительность выявленных изменений образования пищедобывательного навыка

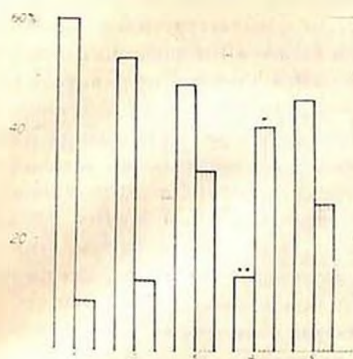


Рис.3. Распределение животных в разных группах по латентному период наступления коразолового судорожного припадка: □ — меньше 10 мин, ■ — отсутствие судорожного припадка в течение 30 мин. По оси абсцисс — номера групп, по оси ординат — число животных в %. Группы крыс: 1 — с введением физиологического раствора; 2 — с введением сиднофена 3 — иммунизированные БСА; 4 — иммунизированные конъюгатом сиднофена с БСА; тестирование через 35—40 дней после первой иммунизации; 5 — то же, но тестирование через 60 и более дней после первой иммунизации. Статистически значимые различия: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

и более чем в 4 раза увеличивается число крыс, у которых в течение 30-минутного периода вообще не наблюдается припадка (рис. 3). В группах крыс, иммунизированных как БСА, так и конъюгатом, но тестирувавшихся через 60 и более дней после начала иммунизации, отмечена тенденция к увеличению числа крыс, не дающих припадок. По латентному периоду наступления припадка изменений по сравнению с контролем в этих группах не отмечается.

Таким образом, иммунизация конъюгатами сиднофена с БСА позволяет получить длительное изменение состояния белых крыс по биохимическим и физиологическим признакам. Значительные изменения уровня норадреналина в плазме крови и дофамина в мозгу показательны и интересны как сами по себе, так и как вероятное отражение других регуляторных сдвигов, заслуживающих дальнейшего изучения. Одновременные изменения эмоционального статуса — депрессия поведенческой активности белых крыс, сходная в некоторых элементах с эффектами нейролептиков, подавление влечения к алкоголю и, наконец, значительное изменение судорожной готовности по коразоловому тесту, — все это, видимо, следствие комплекса изменений в регуляторных системах. Есть основания полагать, что именно продукция антител к сиднофену, способных связывать какие-то эндоген-

активной иммунизацией к серотонину и адреналину.

Наконец, глубина, направленность и длительность отмеченных изменений поведения животных побудили нас оценить влияние иммунизации на порог судорожной чувствительности. Для создания коразоловой модели судорог через 35—40 и более 60 дней после иммунизации, а также контрольным группам крыс вводили коразол (60 мг/кг, подкожно). Регистрировали латентный период от момента введения коразола до начала пятой стадии миоклонического припадка. Анализ полученных данных показывает, что в группе иммунизированных конъюгатом сиднофена с БСА крыс при тестировании на 35—40-й день в целом наблюдается самый большой латентный период наступления судорожного припадка по сравнению с контрольными и другими опытными группами (рис. 2). В этой группе более чем в 4 раза уменьшается число крыс с высокой чувствительностью к коразолу (с латентным периодом наступления припадка < 10 мин)

ные аналоги этого соединения, обуславливает все описанные процессы. Об этом свидетельствует и динамика процесса, соответствующая динамике иммунизации, и тот факт, что иммунизация одним антигеном-носителем не дает столь выраженных эффектов. Тем не менее доказать роль антисиднофеновых антител могут только прямые эксперименты по их действию на эндогенные регуляторы. Результаты настоящего цикла исследований определяют необходимость изучения и ряда других вопросов: более детального изучения динамики иммунизации, специфичности антителогенеза, концентраций катехоламинов в отделах мозга, надпочечниках и других тканях, эффективности метода при воздействии на уже алкоголизированных животных, изменений концентраций не только катехоламинов, но и ряда других эндогенных регуляторов (в первую очередь опиоидных пептидов) и др.

В целом, обобщение данных литературы, представленное в начале статьи, и экспериментальных материалов настоящего исследования позволяет считать перспективным формирующийся путь «инверсной» регуляции, то есть длительной коррекции биохимического и физиологического статуса организма посредством активной иммунизации к биорегуляторам — как эндогенным, так и экзогенным. В медицине можно прогнозировать полезность этого пути в терапии ряда хронических болезней, требующих при обычных способах лечения частого систематического введения лекарств, в частности психических болезней и алкоголизма. В экспериментальной нейрхимии, нейрофизиологии и медицине активная аутоиммунизация к биорегуляторам послужит ценным инструментом в фундаментальных исследованиях механизмов действия биорегуляторов.

IMMUNOLOGICAL INTERFERENCE IN NEUROCHEMICAL AND NEUROPHYSIOLOGICAL PROCESSES: CATECHOLAMINES, BEHAVIOUR AND SEIZURE ACTIVITY OF WHITE RATS IMMUNIZED BY A CONJUGATE OF SERUM ALBUMIN AND SYDNOFEN

**Ashmarin I. P., Danilova R. A., Melnik E. I., Obukhova M. F.
Saghimbaeva Sh. K., Zirenina M. L., Ganzha S. Yu., Koltovaya N. A.**

*Moscow State University and Institute of
Applied Molecular Biology, Moscow*

The mechanism of inverse regulation, i. e. a possibility of correction of biochemical and physiological status of the body by active immunization against endogenous and exogenous biostimulants, is examined. Immunization by conjugates of Sydnofen and BSA resulted in protracted biochemical and physiological effects. The active immunization of white rats against antidepressant drug (Sydnofen) led to alteration of behavioral activity, inhibition of seizure activity and alcohol abuse development, decreased noradrenaline level in blood and dopamine level in brain for over two months.

ЛИТЕРАТУРА

1. Carelli C., Andibert F., Gaillard J.C. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v.79, p.5392—5395, 1982.
2. Spencer G.S.G., Harvey S., Andsley A.R.S., Hallett K.G., Kastin S. Comp. Biochem. Physiol., v.85A, p.553—556, 1986.
3. Ашмарин И.П., Гомазков О.А. Изв. АН СССР, Серия биол., N1, с.11—18, 1989.
4. Крыжановский Г.Н., Есеев В.А. Вестн. Акад. мед. наук СССР, N3, с.10—14, 1988.
5. Давыдова Т.В., Башарова Л.А., Ковалев И.Е., Есеев В.А. Фармакология и токсикология, N2, с.57—58, 1987.
6. Michel J.B., Guetter C., Galen F.X., Philippe M., Corvol P., Menard J. II-th Sci. Meet. Intern. Soc. Hypertension. Abstr.0822, p.407, 1986.
7. Mori K. J. Chromatogr., v.218, p.631—637, 1981.
8. Данилова Р.А., Обухова М.Ф., Ашмарин И.П., Машковский М.Д. Докл. АН СССР, т.303, с.1512—1514, 1988.
9. Данилова Р.А., Обухова М.Ф., Сагimbaева Ш.К., Машковский М.Д., Ашмарин И.П. Биол. науки, N3, с.63—69, 1989.

Поступила 20.04.1989



УДК 612. 822. 1 + 616. 858—008. 6

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПЕПТИДНЫХ ФРАКЦИЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ ПАРКИНСОНИЗМОМ ДО И ПОСЛЕ ЛЕЧЕБНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ

Корешонков О. Н., Корольков А. В., Никитин А. О.

Маргулис М. Н., Дамбинова С. А.

НИИ экспериментальной медицины АМН СССР, Ленинград

В работе исследовали низкомолекулярные пептидные фракции плазмы крови больных паркинсонизмом, для лечения которых применяли аутогеомоливоротрансфузию и лечебные электрические стимуляции и аналогичные фракции, выделенные из плазмы здоровых доноров. Определен диапазон величин M_r , в котором происходят количественные и качественные изменения пептидного состава плазмы крови у больных по сравнению со здоровыми донорами. Проводили изучение ингибирующего действия пептидных фракций на связывание $L[{}^3H]$ глутамата с синаптическими мембранами, выделенными из коры головного мозга крыс. Влияние исследуемых фракций на физиологические ответы идентифицированных нейронов пресноводного моллюска *Planorbis corneus* изучали методом внутриклеточной регистрации потенциала. Влияние пептидов на дофаминергические системы мозга исследовали на поведенческих моделях у экспериментальных животных.

* * *

Одним из наиболее перспективных исследований современной нейробиологии является поиск, выделение и изучение пептидов, обладающих выраженной способностью направленно модулировать различные функциональные состояния головного мозга человека. Конкретным практическим выходом этих исследований является разработка новых подходов к лечению трудно поддающихся для коррекции заболеваний НС, в том числе паркинсонизма.

В 1984 г. Н. П. Бехтерева [1] выдвинула гипотезу об участии малых нейропептидов — одного из важных классов межсистемных биорегуляторов в механизмах стойкости лечебного эффекта электростимуляции и в процессах преодоления устойчивого патологического состояния. Впоследствии с помощью биохимических методов была подтверждена справедливость высказанного предположения. Так, было обнаружено, что лечебные электростимуляции (ЛЭС), проводимые через интрацеребральные электроды, долгосрочно вживленные в патогенетически обоснованные структуры головного мозга у больных паркинсонизмом, вызывали выброс и накопление низкомолекулярных пептидных фракций в крови и СМЖ [1, 2].

Было показано, что пептидные фракции с величиной M_r менее 5 кД обладали компенсаторным модуляторным действием на преимущественно пораженные медиаторные системы: дофаминергические, холинергические и глутаматергические синапсы [2, 3]. Наиболее важным в этих

исследованиях оказалось то, что лечение больных паркинсонизмом с помощью эндолюмбальной аутотрансфузии указанных пептидов, выделенных из крови больного, вызывало стойкий положительный эффект, сопоставимый по клиническому действию с ЛЭС [4, 5].

В связи с вышесказанным, несомненный интерес представляли дальнейшие углубленные биохимические исследования пептидных фракций крови, составляющих группу так называемых «средних молекул» [6] с целью выявления конкретных молекулярных субстратов, ответственных за лечебный эффект ЛЭС и аутогемоликворотрансфузии (АГЛТ), и создание на их основе нового класса фармакологических средств лечения паркинсонизма. В настоящей работе была предпринята попытка сравнительного анализа пептидных фракций, выделенных из крови больных паркинсонизмом до и после лечебных воздействий: ЛЭС и АГЛТ.

Материалы и методы

В исследованиях использовали кровь и СМЖ 5-и больных паркинсонизмом, которым по медицинским показаниям были вживлены золотые электроды в патогенетически обоснованные структуры головного мозга.* АГЛТ была проведена у 3 больных паркинсонизмом, у которых наблюдали выраженный положительный клинический эффект.

Плазму крови и надосадочную СМЖ получали путем центрифугирования при 4° в течение 20 мин при 5000 г. Для первичного фракционирования плазмы и СМЖ использовали гель-фильтрацию на колонке (80 × 1,6), заполненную сефадексом G-50 («Pharmacia», Швеция). В качестве элюента брали 0,15 М NaCl, который пропускали со скоростью 0,45 мл/мин, фракции отбирали по 4,5 мл, их регистрацию проводили с помощью УФ детектора при длине волны 210 нм. СМЖ фракционировали в аналогичных условиях.

Низкомолекулярные компоненты плазмы крови и СМЖ отделяли с помощью ультрафильтрации на ячейке AMICON (Голландия) с фильтром DIAFLO PM10 (Ирландия).

Дальнейший анализ фракций проводили на высокоэффективном хроматографе («Gilson», Франция), на колонке SI-100 POLYOL 0,03 мкм («Serva», ФРГ). В качестве элюента использовали 50 мМ трис-HCl буфер, pH 7,4, скорость потока 1 мл/мин, детекцию проводили при 210 нм.

Биологическую активность пептидных фракций крови на глутаматергические медиаторные системы определяли радиолигандным методом [7]. Анализ эффектов пептидов проводили по конкуренции за связывающие участки L [³H] глутамата, который взаимодействовал специфически с синаптическими мембранами, выделенными из коры головного мозга крысы и посмертных препаратов коры головного мозга человека. Ранее описанный метод модифицировали для исследования больших количеств

* Авторы приносят глубокую благодарность зав. нейрохирургическим отделением клинического НИИ экспериментальной медицины АМН СССР к.м.н. Ф.А.Гурчину и нейрохирургу А.Г.Нарышкину за клиническое обследование и лечение больных паркинсонизмом.

веществ с использованием 96-ячеечного прибора Minifold (ФРГ) на фильтрах GF («Whatman», Англия). Математическую обработку результатов проводили с помощью программ, составленных для компьютера APPLE-IIe (США).

Влияние пептидов на физиологические ответы идентифицированных нейронов пресноводного моллюска *Planorbis corneus* изучали методом внутриклеточной регистрации потенциала при аппликации L-глутамата способом суперфузии [8]. Выделенное кольцо ганглиев из моллюска обрабатывали 30 мин проназой («Sigma», США) для удаления оболочек ганглиев, препарат укрепляли в проточной камере электрофизиологической установки. Пептидные фракции добавляли в камеру, включали проток и апплицировали L-глутамат (10^{-6} — 10^{-4} М). Изменение мембранного потенциала и трансмембранных токов регистрировали с помощью усилителя нейронной активности ЭПМ и самописца Н-327-3 (СССР).

Антипаркинсоническую активность выделенных фракций оценивали по влиянию последних на галоперидоловую катаlepsию у белых мышей [9]. Опыты проводили в одно и то же время суток, при постоянной температуре и интенсивности освещения. Влияние на галоперидоловую катаlepsию определяли путем внутрибрюшинного введения фракций за 15 мин до введения галоперидола (2,5 мг/кг) и оценивали через 10, 30, 60 и 120 мин по числу животных, находящихся в состоянии катаlepsии более 2 мин.

Результаты и обсуждение

Ранее было показано, что на фоне положительного клинического эффекта ЛЭС у больных паркинсонизмом наибольшие изменения наблюдаются в белково-пептидном спектре крови и СМЖ в области 5 кД [1, 2]. Поэтому мы попытались обнаружить существенные различия между пептидными фракциями в зоне «средних молекул».

Для сравнительного анализа экспериментальных данных по распределению пиков на хроматограмме (рис. 1) была использована относительная величина V_e/V_0 , где V_e — объем эволюции данного компонента, а V_0 — свободный объем колонки. На рис. 1 показано, что у больных паркинсонизмом по сравнению со здоровыми донорами происходит перераспределение нингидринположительного материала по фракциям: во-первых, появляется новый пик с $V_e/V_0 = 2,5$; во-вторых, увеличивается содержание материала соответствующему пику с $V_e/V_0 = 3,3$, но при этом практически не обнаруживается материала, соответствующего пику с $V_e/V_0 = 2,9$. Видимых различий в составе пика, содержащего вещества с величиной M_r менее 500 Д, не обнаружено.

Дальнейшее исследование проводили методом ВЭЖХ (рис. 2). Используя калибровку, построенную для применяемой колонки, удалось уточнить диапазон величин M_r исследуемых фракций, который оказался равным 2500—300 Д. Этим методом оказалось возможным так же подтвердить наблюдаемые при гель-фильтрации на сефадексе G-50 количественные и качественные изменения в пептидном составе между здоровыми донорами и больными паркинсонизмом, но уже в более ограниченном

диапазоне величин M_r .

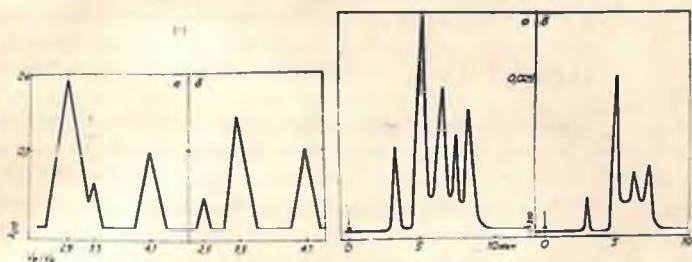


Рис. 1. Схематическое изображение хроматограммы плазмы крови, полученной на колонке $80 \times 1,6$ см с сефадексом G-50: а — плазма крови здорового донора, б — больного паркинсонизмом. Белковые пики с M_r более 6,5 кД не показаны. Здесь и на рис. 3 по оси абсцисс — отношение объема удержания компонента к свободному объему колонки, по оси ординат — показатель поглощения при 210 нм

Рис. 2. Схематическое изображение хроматограммы фракции с M_r 300—2500 Д, выделенной при помощи гель-фильтрации на сефадексе G-50, полученной на колонке CL-100 POLYOL 0,03 мкм. а — здоровый донор, б — больной паркинсонизмом. По оси абсцисс — время выхода компонентов в мин, по оси ординат — поглощение при 210 нм

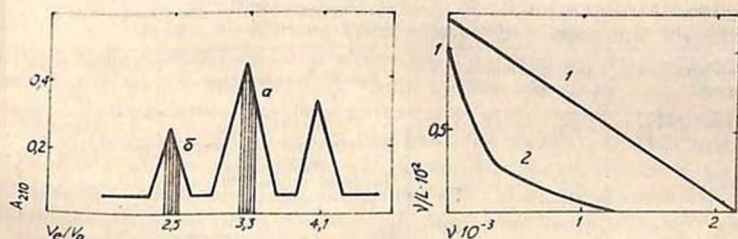


Рис. 3. Схематическое изображение хроматограммы плазмы крови больных паркинсонизмом на колонке $80 \times 1,6$ см с сефадексом G-50. Заштрихованные фракции применяли при аутогемотрансфузии (АГЛТ). а — фракция, обладающая эффектом при АГЛТ, б — фракция, не обладающая эффектом при АГЛТ

Рис. 4. График Скотчарда для связывания [3H] глутамата с синаптическими мембранами, выделенными из коры головного мозга крыс. 1 — контроль, 2 — контроль в присутствии пептидных фракций. По оси абсцисс — число молей лиганда, связанного с одним молем макромолекул, по оси ординат — отношение числа молей лиганда, связанного с одним молем макромолекул к концентрации свободного лиганда

Количественное определение пептидов во фракциях проводили с

помощью известного флуорескаминного метода [10]. Как было обнаружено, концентрации пептидов, выделенных из плазмы здоровых доноров в зоне 2500—300 Д в 1,5—2 раза выше, чем у больных паркинсонизмом. В данном случае учитывалось только относительное изменение концентрации, так как точное количественное определение пептидов в биологических жидкостях осложнено низкими концентрациями и большим количеством примесей.

На рис. 3 представлена хроматограмма плазмы больных паркинсонизмом, у которых в качестве лечебного воздействия применяли АГЛТ. Из исследованных фракций лечебным эффектом обладали при АГЛТ только фракции пептидов, относящихся к зоне с величиной M_r 2500—300 Д (фракция *a* на рис. 3), фракция с величиной M_r 2500—5000 Д (фракция *b* на рис. 3) лечебным эффектом не обладала.

Известно, что после эффективных ЛЭС у больных паркинсонизмом наблюдается появление низкомолекулярных пептидных фракций, которые обладают выраженным биологическим действием на холинергические и дофаминергические медиаторные системы. Согласно последним литературным данным [11, структурай мозга, ответственной за реализацию двигательных функций организма, является стриатум. Двигательные расстройства связываются с нарушением взаимодействия между двумя его афферентными входами, которые включают дофаминергические и глутаматчувствительные синапсы. В связи с вышесказанным существенный интерес представляет изучение влияния выделенных нами пептидных фракций на указанные медиаторные системы в разных экспериментальных моделях.

Таблица

Ингибирующее действие пептидных фракций, выделенных из плазмы крови и СМЖ больных паркинсонизмом до и после лечебных воздействий

Биологическая жидкость	Вид лечебного воздействия	Время взятия пробы	% связывания глутамата от контроля (100%)
Плазма крови	АГЛТ	До АГЛТ	10,6 ± 1,2
		На фоне максимального эффекта	18,4 ± 1,6
		На фоне ослабления эффекта	7,6 ± 1,1
		До АГЛТ	13,3 ± 0,4
СМЖ	АГЛТ	На фоне максимального эффекта	27,3 ± 1,3
		На фоне ослабления эффекта	10,2 ± 0,4
		До АГЛТ	7,4 ± 1,6
		На фоне эффекта	16,5 ± 1,5
Плазма крови	ЛЭС	До ЛЭС	7,4 ± 1,6
		На фоне эффекта	16,5 ± 1,5

Проведен сравнительный анализ влияния пептидных фракций, обладающих лечебным эффектом при АГЛТ и ЛЭС, на связывание $[^3H]$ глутамата с синаптическими мембранами, выделенными из коры головного мозга крысы или посмертных препаратов коры головного мозга человека (таблица). Из таблицы видно, что фракции, выделенные из крови больных после лечебного воздействия, обладали меньшей ингибирующей активностью

Следует пояснить, что лечебное применение той же фракции от здоровых людей пока невозможно в связи с трудностями, возникающими при гетеротрансфузиях.

в отношении связывания L-[H]глутамата с синаптическими мембранами по сравнению с аналогичными фракциями из крови тех же больных до лечебного воздействия. Наблюдалось изменение активности фракций в процессе лечебного воздействия, которое проявилось в усилении ингибирующей активности по мере ослабления лечебного эффекта.

Результат математической обработки полученных данных представлен графически на рис. 4. Выбор координат Скотчарда обусловлен удобством для анализа экспериментальных данных. Для L-глутамата график Скотчарда выглядит в виде прямой линии, что находится в соответствии с ранее описанными данными [7]; подобная зависимость для исследуемых фракций имеет вогнутый вид. Этот факт можно объяснить, если предположить, что под влиянием пептидных фракций происходит модификация глутаматных рецепторов, которая может быть связана с возникновением нескольких типов независимых участков или с взаимодействием идентичных центров одного типа, проявляющегося в отрицательной кооперативности.

Следовательно, можно предположить, что изучаемые фракции обладают модуляторным действием на глутаматчувствительные медиаторные системы нервных клеток.

Действительно, изучение физиологических ответов нейрона моллюска при аппликации пептидных фракций показало, что они обладают модулирующим и возбуждающим действием (рис. 5). Обычно аппликация глутамата к поверхности мембраны идентифицированных нейронов приводила к двухфазному ответу: короткая по времени деполяризация сменялась более длительной гиперполяризацией, в то время как аппликация АХ вызывала только деполяризацию мембраны [12]. Пептидные фракции, выделенные из ликвора или крови, вызывали длительную, до одной минуты, деполяризацию мембраны, и увеличение частоты разрядов нейронов со спонтанной активностью. Фракции, взятые из проб биологических жидкостей до лечебного воздействия, проявляли более сильный эффект, чем исследуемые фракции после воздействия. АХЭ, добавленная к тестируемым фракциям в достаточном количестве для инактивации АХ в высших физиологических концентрациях, уменьшала величину деполяризации мембраны при аппликации проб. Глутамат апплицировали сразу после ответа нейрона на пробы, что вызывало возобновление длительной деполяризации мембраны. В некоторых случаях ответ нейрона был избирательно однофазным. Очевидно, это объясняется различиями в концентрациях пептидов и соответственно различными уровнями десенситации D- и H-рецепторов глутамата. В то же время ответы на АХ были без изменений. Кроме того, тестируемые вещества изменяли спонтанную ритмическую активность на пачечную. Все перечисленные модулирующие действия — изменение ответов на медиаторы и характер спонтанной активности, которые снимались после 10—15-минутной отмывки, а также зависимость ответов от наличия протеолитических ферментов — свидетельствуют в пользу гипотезы о пептидной природе исследуемых фракций.

Влияние пептидов на дофаминергические системы мозга исследовали на поведенческих моделях у экспериментальных животных. Для изучения антипаркинсонических свойств новых фармакологических препаратов преи-

мущественно используют модели паркинсонизма на мелких животных: фармакологические модели с использованием резерпина, вызывающего выраженное снижение содержания биогенных аминов в мозгу животного, с применением ингибиторов синтеза катехоламинов, например, α -метилтирозина, а также более специфического антагониста дофаминовых рецепторов — галоперидола [13]. Применяют также холинергические препараты, такие как никотин, оксотреморин и т. д., вызывающие у животных тремор центрального генеза, который снимается антипаркинсониками [14].

Вторым вариантом моделирования паркинсонизма является стереотаксическое разрушение головного мозга у обезьян. Третьей группой методов является применение химического разрушения нигро-стриатного дофаминергического тракта специальными нейротоксинами: 6-оксидофамином, а позднее MPTP [15, 16].

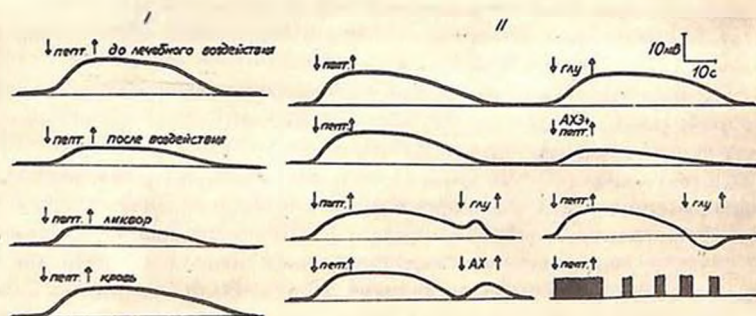


Рис. 5. Возбуждающее (I) и модулирующее (II) действие пептидных фракций, выделенных из плазмы крови и СМЖ, на нейроны моллюска

Для исследования антипаркинсонических свойств фракций плазмы крови больных использовали метод торможения каталептических реакций, вызванных системным введением галоперидола, и определение антирезерпинового эффекта этих фракций при оценке птоза у животных (резерпин 5 мг/кг внутривентрикулярно за 24 ч до эксперимента).

Галоперидол, введенный внутривентрикулярно в дозе 5 мг/кг в контрольной группе животных, вызывал отчетливое повышение процента животных, находящихся в состоянии катаlepsии в течение всего эксперимента (рис. 6). Фракция пептидов, выделенных из крови больного до АГЛТ, практически не обладала антикаталептической активностью после введения галоперидола. Фракция пептидов, выделенных из крови через 10 ч после АГЛТ, которая сопровождалась выраженным клиническим эффектом, вызвала отчетливый антикаталептический эффект, по своему действию напоминающий эффекты тиреолиберина или меланостатина, способных активировать дофаминергические системы мозга [17].

Антирезерпиновую активность пептидных фракций оценивали визуально по выраженности птоза у белых мышей и выражали по стандартной балльной системе [9]. Максимальному количеству баллов — 4, которое вызывалось резерпином, соответствовало полное смыкание век животного.

Внутрибрюшинное введение пептидных фракций плазмы крови, полученных у больных после эффективных ЛЭС или АГЛТ, вызывало снижение выраженности птоза на 25—30%. Этот эффект сохранялся в течение 1,5—2 ч.

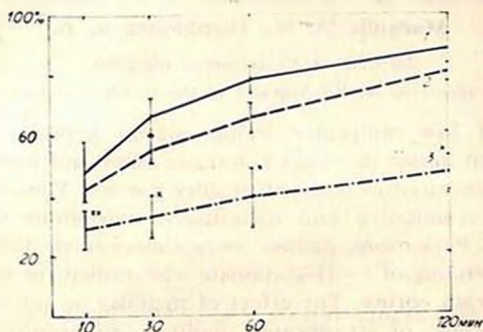


Рис. 6. Антикаталетическая активность пептидных фракций, выделенных из плазмы крови больных паркинсонизмом, у белых мышей после введения галоперидола. 1 — контроль (галоперидол 5 мг/кг внутрибрюшинно), 2 — фракция плазмы крови до проведения аутогемотрансфузии (АГЛТ) или лечебной электрической стимуляции (ЛЭС), 3 — фракция после проведения АГЛТ или ЛЭС, $p < 0,001$, $**p < 0,05$. По оси абсцисс — время в мин, по оси ординат — количество мышей в состоянии катаlepsии (в процентах ко всей группе животных).

Проведенные предварительные эксперименты на моделях паркинсонизма у животных свидетельствуют о влиянии пептидных фракций крови, выделенных у больных после эффективных ЛЭС или АГЛТ, на дофаминергические процессы, угнетенные резерпином и галоперидолом.

Таким образом, полученные результаты подтверждают гипотезу Н. П. Бехтерева об участии малых пептидов в механизмах стойкости лечебного эффекта электростимуляции. Кроме того, данные об изменениях, происходящих в пептидных фракциях при ЛЭС и АГЛТ позволяют предположить о возможном сходстве механизмов, лежащих в основе этих лечебных воздействий. Дальнейшие эксперименты, направленные на очистку индивидуальных нейропептидов, ответственных за лечебные эффекты, позволяют установить конкретные механизмы, лежащие в основе процессов восстановления мозговых функций, обеспечивающих регуляцию движения.

COMPARATIVE STUDIES OF PATIENTS WITH PARKINSONS DISEASE BEFORE AND AFTER MEDICAL TREATMENT

Koreshonkov O. N., Korol'kov A. V., Nikitin A. O.,
Margulis M. N., Dambinova S. A.

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

Properties of low molecular weight serum peptides of Parkinsonian patients subjected to liquor or blood autotransfusion and therapeutic electrical stimulation were compared to those of healthy donors. The range of molecular weights exhibiting qualitative and quantitative variations of serum peptide content caused by Parkinsons disease were determined. Inhibitory action of peptides upon the binding of L-³H-glutamate was studied for synaptic membranes isolated from rat brain cortex. The effect of peptides on physiological response of identified neurons of freshwater mollusc *Planorbarius cornaus* was investigated using intracellular potential monitoring technique. Behavioral patterns were studied in order to assess the effects of peptides upon brain dopaminergic systems.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бехтерева Н.П., Дамбинова С.А., Гурчин Ф.А., Смирнов В.М., Корольков А.В., Писоваров А.М. Физиол. журн. СССР, т.70, N8, с.1092—1099, 1984.
2. Бехтерева Н.П., Дамбинова С.А., Корольков А.В. -В сб.: Научно-методические аспекты биологических исследований новых лекарственных препаратов, с.73—85, Рига, Зинатне, 1987.
3. Маргулис М.Н., Корольков А.В., Павлова О.И., Дамбинова С.А. -В сб.: Материалы I Всесоюзной конференции «Принципы и механизмы деятельности мозга человека», с.130—131, Л., Наука, 1985.
4. Бехтерева Н.П., Гурчин Ф.А., Дамбинова С.А. -В Сб.: Тезисы 10-ой Всесоюзной конференции по биохимии нервной системы, с.71—72, Горький, 1987.
5. Бехтерева Н.П., Гурчин Ф.А., Дамбинова С.А., Корольков А.В., Корешонков О.Н., Нарышкин А.Г. Физиология человека, т.13, N3, с.500—502, 1987.
6. Галактионов С.Г., Николайчик В.В., Цейтин В.М., Михеева Л.М. Химико-фармацевтический журнал, т.11, с.1286—1293, 1983.
7. Дамбинова С.А., Городинский А.И. Биохимия, т.49, N1, с.67—74, 1984.
8. Гапон С.А. Автореферат канд. дисс. «Действие медиаторных веществ на идентифицированные нейроны брюхоногого моллюска роговой катушки», Ленинград, 1981.
9. Вальдман А.В., Козловская М.М., Клуша В.Е., Свиркис Ш.В. Бюл. эксперим. биол. и мед., N6, с.693—696, 1980.
10. Undenfriend S., Stein S., Bohlen P., Dairman W. Science, v.178, p.871—872, 1972.
11. Годухин О.В. Модуляция синаптической передачи в мозге, М., Наука, 1987.
12. Гапон С.А., Качман А.Н., Фролова Е.В. Журн. эволюц. биохимии и физиологии, т.XIV, N3, с.259—265, 1978.
13. Zigmund M.J., Stricker E.M. Life Sci., v.35, N1, p.5—18, 1984.
14. Гацура В.В. Методы первичного фармакологического исследования биохимически активных веществ, М., Медицина, 1974.
15. Silbergeld E.K., Calne B. Pharmac. Ther., v.12, p.159—166, 1981.
16. Ricaurte G.A., Irwin I., Forno L.S., Delanney L.E., Langston E., Langston J.W. Brain Res., v.403,

G.Hertting, H.-Ch.Spatz Modulation of Synaptic Transmission and Plasticity in Nervous System (*NATO ASI Series, v.1119*). Springer, Berlin, 457 p., 1988.

Модуляция синаптической передачи и пластичность нервной системы.

Одной из интереснейших проблем века, неразрешенных и поныне, является выяснение путей передачи и хранения информации в нервной системе и особенно в мозгу человека. В предлагаемой книге пластичность поведения связывается с модуляцией свойств синапсов, осуществляющих связи между нервными клетками в контексте функционирования нервных цепей. Показано, что процессы обучения стали в настоящее время объектом изучения молекулярной биологии. Приводятся аргументы в пользу применения в качестве моделей нервной системы морских моллюсков *Aplysia* и *Hermesena*, плодовых мушек дрозофил и ткани гиппокампа млекопитающих.

УДК 612.822.1:615.214.2

ВЛИЯНИЕ ФОСФОЛИПАЗЫ A_2 И ЯДА СРЕДНЕАЗИАТСКОЙ КОБРЫ НА М-ХОЛИНОРЕЦЕПТОРЫ СИНАПСОМ МОЗГА КРЫСЫ

Московский Г.Н., Кичикулова Т.П., Манухин Б.Н.

*Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова
АН СССР, Москва*

Показано, что целый яд среднеазиатской кобры *Naja naja oxidana* и его мембраноактивный компонент фосфолипаза A_2 вызывают в синапсомозге крысы изменение основных параметров кинетики связывания специфического блокатора М-холинорецепторов [3H]хиноклидинилбензилата. Плотность мест связывания [3H]хиноклидинилбензилата снижается при действии целого яда в концентрациях 1, 10, 100 мкг/мл на 43, 63 и 79%. Фосфолипаза A_2 в тех же концентрациях снижает плотность мест связывания лиганда на 48, 49 и 65%. Величина K_d при действии исследованных веществ также снижается. Обсуждается значение функционального состояния клеточных мембран для специфической активности М-холинорецепторов.

* * *

На изолированном отрезке тонкой кишки крысы было показано, что яд среднеазиатской кобры и выделенная из него фосфолипаза A_2 вызывают характерные достоверные изменения в основных параметрах М-холинэргической реакции [1]. Однако изолированная тонкая кишка крысы представляет сложную гетерогенную тканевую систему, изменение реакции которой на АХ может быть совокупным результатом воздействия яда и фосфолипазы A_2 на специфические рецепторы мышечных элементов, клеточную мембрану, нервные сплетения и др. Поэтому для уточнения локализации действия яда кобры и его компонента на М-холинэргическую реакцию необходимо было использовать простую экспериментальную модель, которая структурно является более однородной системой. Одной из наиболее адекватных моделей для изучения элементарных нейрохимических процессов являются синапсомы. Они сохраняют ряд основных свойств нервных окончаний и постсинаптических мембран, в частности, способность их рецепторов соединяться со специфическими лигандами, что изменяет трансмембранный транспорт ионов и нейротрансмиттеров.

Задачей представленной работы было изучение влияния яда среднеазиатской кобры и его активного компонента фосфолипазы A_2 на первый этап холинэргического процесса — связывание синапсомозга крысы специфического М-холинблокатора [3H]хиноклидинилбензилата.

Синапсомы из коры мозга крыс линии *Wistar* выделяли по методу Hajos [2]. Суспензию синаптических мембран инкубировали при 37° в течение 15 мин в присутствии яда кобры или фосфолипазы A₂ в концентрациях 1, 10, 100 мкг/мл. После охлаждения в ледяной бане и добавления 15-кратного объема холодного раствора Тироде, суспензию синапсом центрифугировали дважды при 14000 об/мин в течение 20 мин. Полученные осадки суспендировали в 0,05 М фосфатном буфере и использовали для радиолигандного анализа.

При радиолигандном анализе общий объем инкубационной среды составлял 500 мкл, объем суспензии синапсом — 50 мкл, концентрация [³H]хинуклидинилбензилата 0,125, 0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 8,0, 16,0 нМ. Для определения неспецифического связывания использовали атропин в концентрациях 10⁻⁵ — 10⁻⁶ М. Инкубацию проводили при температуре 25° в течение 60 мин. Связывание останавливали быстрым охлаждением в ледяной бане. Разделение связанного с синапсомами и несвязанного радиолиганда проводили центрифугированием при 14000 об/мин или фильтрацией в условиях вакуума через фильтры GF/B («Whatman», Англия) с последующей промывкой 6—8-кратными объемами фосфатного буфера. Осадки после центрифугирования промывали 2-кратным объемом фосфатного буфера и инкубировали сутки в 0,5 мл 1%-ного раствора Тритона X-100. Растворившиеся осадки или фильтры после фильтрации переносили во флаконы с сцинтилляционной жидкостью ЖС-8. Радиоактивность измеряли на сцинтилляционном счетчике SL-4000 (Франция).

Активность АХЭ определяли модифицированным методом Элмана [3], содержание белка — по Lowry. Экстинкцию измеряли на спектрофотометре Spekol-21 (ГДР) при длине волны 420 нм для АХЭ и 750 нм для белка. Результаты обработаны статистически с использованием критерия Стьюдента.

Реактивы для радиолигандного анализа — [³H]хинуклидинилбензилат («Amersham», Англия), У.А. 12,3 Ки/ммоль, атропин («Reanal», Венгрия), лиофилизированный яд среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana* и фосфолипаза A₂ (Институт биохимии АН Узбекской ССР).

Результаты и обсуждение

На рис. 1 приведены результаты одного из типичных опытов действия яда и фосфолипазы A₂ в концентрациях 1 мкг/мл на специфическое и неспецифическое связывание синапсомами радиолиганда. Видно, что специфическое связывание лиганда — типичный насыщаемый процесс. Неспецифическое связывание лиганда на фоне атропина линейно зависит от концентрации лиганда. Яд кобры и фосфолипаза A₂ не изменяют общий характер связывания лиганда, но уменьшают его величину. Значительно меньше, недостоверно эти вещества изменяют неспецифическое связывание. Фосфолипаза A₂ в данном случае сильнее ингибирует связывание лиганда, чем цельный яд. Графический анализ результатов этого опыта

в координатах Хофсти-Скэтчарда (рис.2) показывает, что под влиянием яда и фосфолипазы происходит уменьшение концентрации мест связывания лиганда. Величина K_d в этих условиях также снижается. Из графика, приведенного на рис. 2, следует, что рецепторы, связывающие [3 H]хиноклидинилбензилат, являются одним пулом.

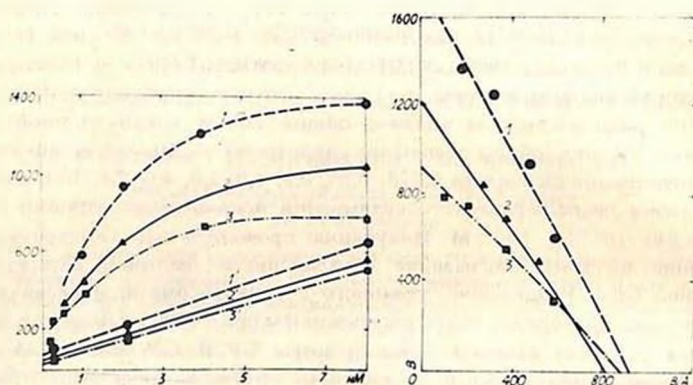


Рис.1. Действие яда среднеазиатской кобры и фосфолипазы A_2 в концентрации 1 мкг/мл на специфическое и неспецифическое связывание синаптическими мембранами коры головного мозга крысы [3 H]хиноклидинилбензилата. По оси абсцисс — концентрация [3 H]хиноклидинилбензилата в инкубационной среде, по оси ординат — концентрация связанного мембранами [3 H]хиноклидинилбензилата. 1,1' — контроль, специфическое и неспецифическое связывание лиганда; 2,2' — действие яда кобры, специфическое и неспецифическое связывание лиганда; 3,3' — действие фосфолипазы A_2 , специфическое и неспецифическое связывание лиганда

Рис.2. Действие яда среднеазиатской кобры и фосфолипазы A_2 в концентрации 1 мкг/мл на связывание [3 H]хиноклидинилбензилата синаптическими мембранами коры мозга крысы. По оси абсцисс — отношение концентраций связанного и свободного [3 H]хиноклидинилбензилата (фмоль/мг белка/нМ), по оси ординат — концентрация связанного лиганда (фмоль/мг белка). 1 — контроль, 2 — связывание после действия яда, 3 — связывание после действия фосфолипазы A_2

В таблице приведены результаты опытов по действию яда кобры и фосфолипазы A_2 на связывание лиганда. Видно, что оба исследованных вещества во всех трех испытанных концентрациях изменяют как плотность мест связывания лиганда (B), так и величину K_d комплекса лиганд — рецептор. При этом цельный яд и фосфолипаза A_2 вызывают близкие по величине изменения параметров, характеризующих связывание лиганда. Различия в активности фосфолипазы A_2 и цельного яда во всех вариантах опыта статистически недостоверны. Величина ингибиторного действия этих активных веществ возрастает по мере увеличения их концентрации. Так, при нарастании концентрации яда с 1 мкг/мл до 10 и 100 мкг/мл плотность мест связывания снижается на 43, 63 и 79% соответственно (таблица). Действие фосфолипазы A_2 в таких же концентрациях приводит к уменьшению мест связывания лиганда на 48, 49 и 65%. Одновременно происходит

снижение величины K_d при действии яда и фосфолипазы A_2 во всех исследованных концентрациях. Однако вследствие большого разброса данных это снижение не во всех вариантах опытов достоверно.

Таблица

Влияние яда среднеазиатской кобры и фосфолипазы A_2 (ФЛ- A_2) на связывание [3H] хинуклидинилбензилата синаптических мембранами коры мозга крысы ($^{\circ}p < 0,01$)

Вещество	Концентрация (мкг/мл)	K_d , нМ	Связывание (В), фмоль/мг белка	$E = B/2K_d$
контроль	—	$1,91 \pm 0,29$	1730 ± 20	453
яд	—	$1,22 \pm 0,24$	995 ± 80^a	407
ФЛ- A_2	1	$1,03 \pm 0,12^a$	897 ± 43^a	435
контроль	—	$1,25 \pm 0,30$	402 ± 18	161
яд	—	$1,21 \pm 0,17$	147 ± 12^a	60
ФЛ- A_2	10	$1,06 \pm 0,17$	207 ± 22^a	66
контроль	—	$2,49 \pm 0,19$	568 ± 32	114
яд	—	$1,56 \pm 0,46$	118 ± 13^a	38
ФЛ- A_2	100	$2,08 \pm 0,08$	200 ± 47^a	48

Общую количественную оценку процесса связывания лиганда характеризует величина эффективности ($E = B/2K_d$) [4]. В данном случае эта величина показывает количество связанного лиганда (фмоль/мг белка) на нМ лиганда при его концентрации в среде, равной K_d . Данные, приведенные в таблице, показывают, что, несмотря на значительную разницу в степени снижения плотности мест связывания лиганда при действии яда и фосфолипазы A_2 в концентрациях 10 и 100 мкг/мл, эффективность связывания лиганда изменяется одинаково. Целый яд снижает величину E на 67 и 70%, а фосфолипаза A_2 на 58 и 59% (таблица). В концентрации 1 мкг/мл целый яд и фосфолипаза A_2 уменьшают количество мест связывания на 43 и 48%, снижается также K_d . Однонаправленное изменение двух основных параметров приводит к тому, что эффективность связывания (E) лиганда практически сохраняется на уровне контроля (снижение на 10 и 4%). Эти результаты хорошо коррелируют с данными о действии яда кобры и фосфолипазы A_2 из этого яда на физиологическую М-холинергическую реакцию [1]. Эффект этих веществ на физиологическую реакцию проявляется в однонаправленном изменении основных параметров реакции (K_d и V), что, как и в представленных опытах, но значительно сильнее, ослабляло ингибирующее действие яда и его компонента фосфолипазы A_2 .

Из приведенных данных видно, что целый яд и фосфолипаза A_2 вызывают сходные изменения способности синапсом связывать [3H] хинуклидинилбензилат при несколько более сильном действии яда в концентрации 10 и 100 мкг/мл. При концентрации 1 мкг/мл их эффекты сравниваются. Известно, что в яде среднеазиатской кобры основными компонентами являются фосфолипазы, цитотоксины, нейротоксины. Показано, что цитотоксины усиливают действие фосфолипаз на липиды мембран [5]. Для потенцирования действия фосфолипаз, по-видимому, нужна определенная концентрация цитотоксина, которая достигается при действии яда в концентрации 10 и 1000 мкг/мл. При концентрации яда кобры 1 мкг/мл цитотоксина, вероятно, недостаточно для усиления эффекта

фосфолипазы, чем можно объяснить более слабый эффект яда, чем фосфолипазы A_2 .

В ряде работ показано, что снижение активности АХЭ под влиянием фосфорорганических соединений (диизопропилфосфат) сопровождается снижением числа холинорецепторов в гиппокампе и стриатуме [6, 7]. Эти результаты позволили авторам предположить возможность десенситизации мускариновых холинорецепторов в условиях избыточной холинергической стимуляции. Наши опыты *in vitro* не подтвердили наличия взаимосвязи между активностью холинэстеразы и плотностью рецепторов при действии яда и фосфолипазы A_2 на синапсомы мозга. Эти результаты совпадают с данными Кээмбре и соавт. [8], которые не обнаружили снижения активности холинэстеразы при обработке мембранных препаратов мозга крысы не только фосфолипазой A_2 , но и трипсином. Полученные экспериментальные результаты хорошо согласуются с данными Кээмбре и соавт. о действии не змеиной фосфолипазы A_2 на М-холинорецепторы микросомной фракции коры мозга крысы. Авторы показали, что при действии фосфолипазы A_2 происходит быстрое уменьшение, вплоть до исчезновения, связывания [3H]хиноклидинилбензилата. В наших опытах использовали яд и фосфолипазу A_2 в концентрациях, снижающих, но не полностью блокирующих связывание лиганда. Это позволяет проанализировать кинетику ингибиторного действия исследуемых веществ. Анализ кинетики ингибирования связывания лиганда показывает, что оба вещества действуют по типу бесконкурентного ингибирования [9]. Величина ингибиторных констант зависит от концентрации яда и фосфолипазы A_2 . Это указывает на то, что активные вещества не оказывают прямого действия на места связывания М-холиноблокатора. Более вероятно, что наблюдаемые изменения в параметрах связывания [3H]хиноклидинилбензилата вызваны действием фосфолипазы A_2 на плазматическую мембрану. Показано, что фосфолипаза A_2 снижает микровязкость мембран синапсомом мозга крысы и вызывает деполяризацию мембран [10].

Результаты проведенных экспериментов и анализ литературных данных показывает, что специфическая активность М-холинорецепторов в значительной степени определяется функциональным состоянием плазматических мембран, в которых они расположены. Изменения в мембране, в частности, вызванные действием фосфолипазы A_2 , приводят к адекватным сдвигам в специфической активности М-холинорецепторов и, как следствие этого, нарушениям холинергического медиаторного процесса.

EFFECT OF PHOSPHOLIPASE A_2 AND CENTRAL ASIA COBRA VENOM ON M-CHOLINORECEPTORS OF RAT BRAIN SYNAPTOSOMES

Moskovkin G. N., Kichikulova T. P., Manukhin B. N.

Koltsov Institute of Developmental Biology,
USSR Academy of Sciences, Moscow

The crude venom of Central Asia cobra *Naja naja oxiana* and phospholipase A_2 , its membrane-active component, affect synaptosomes of

rat brain through changes in major parameters of binding kinetics of ^3H -quinuclidinylbenzylate — a specific blocker of M-cholinoreceptors. Crude venom at concentrations 1, 10 and 100 $\mu\text{g/kg}$ decreased the density of binding sites by 43, 63 and 79% respectively. Similar concentrations of phospholipase A_2 reduced the density of ligand binding sites by 48, 49 and 65%. Both substances also decreased K_d value. The significance of functional state of cellular membranes is discussed with reference to the specific activity of M-cholinoreceptors.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кичикулова Т. П., Бердыева А. Т., Манухин Б. Н. Физиол. журн. СССР, т. 74, с. 791—797, 1988.
2. Hajos F. Brain Res., v. 93, p.485—489, 1975.
3. Gorn V., Proinov Y., Baltescu V. Anal. Biochem., v. 86, p.324—326, 1978.
4. Манухин Б. Н. Физиология адренорецепторов, М., Наука, 1968.
5. Красильников О. В., Юкельсон Л. Я., Таимухаммедов Б. А. Научные доклады высшей школы. Биол.науки, N 3, с. 24—27, 1985.
6. Sivam S. P., Norris J., Hoskins B., Ho J.K. J.Neurochem., v. 40, p. 1414—1422, 1983.
7. Yamada S., Hogaï M., Okudaira H., Hayashi E. Brain Res., v. 268, p. 315—320, 1983.
8. Кээмбре Т. Л., Лангел Ю. Л., Ринкен А. А. Нейрохимия, т.3, с. 107—115, 1984.
9. Диксон М., Узбб Э. Ферменты, М., Мир, 1982.
10. Брусованик В.И., Ерин А.Н., Селищева А.А., Горбунов Н.В., Тюрин В.А., Прилипко Л.Л., Каган В.Е. Нейрохимия, т.5, с.3—11, 1986.

Поступила 13.03.1989

УДК 612.82.821.2

НЕКОТОРЫЕ НЕЙРОХИМИЧЕСКИЕ КОРРЕЛЯТЫ УЧАСТИЯ ГИППОКАМПА МОЗГА КРЫС В УСЛОВНОРЕФЛЕКТОРНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ

Чоговадзе И.С., Микеладзе Д.Г.

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

Проведено количественное определение некоторых пептидов, катехоламинов, серотонина и ГАМК, а также чувствительности рецепторных белков в гиппокампе мозга крыс после обучения животных реакции активного избегания в челночной камере. Выяснено, что при обучении происходит увеличение концентрации Арг-вазопрессина и серотонина и снижение дофамина, ГАМК, субстанции Р и β -эндорфина. Кроме того, было найдено, что увеличивается плотность D_2 -дофаминового и ГАМК-рецепторов и уменьшается число мест связывания для лигандов М-холинорецептора. Показано, что обучение животных сопровождается повышением активности сАМР- и Ca^{2+} -кальмодулинзависимых протеинкиназ. Делается заключение, что при обучении крыс происходит усиленный обмен АХ в гиппокампе, который регулируется тормозящими ГАМК-, дофамин- и пептидергическими интернейронами, проецирующимися из септальной области мозга.

* * *

В настоящее время выяснено, что лимбические структуры мозга, и в особенности септо-гиппокампальная область, участвуют в различных поведенческих реакциях крыс [1, 2]. Морфологическими, физиологическими и фармакологическими исследованиями было найдено, что ингибирование нейрональной активности гиппокампа или изоляция этой структуры от септума (денервация) приводят к полной или частичной потере поведенческих реакций [3]. Предполагается, что специфические изменения трансмембранного потенциала пирамидальных клеток гиппокампа, выражающиеся в длительной потенциации и запускающиеся афферентами из септума, могут лежать в основе синаптической пластичности, в записывании и хранении информации [4]. Показано, что в синаптических контактах септо-гиппокампальных нейронов принимают участие АХ [5], глутаминовая кислота [6], дофамин [7], ГАМК [8], субстанция Р и β -эндорфин [5]. В этой сложной иерархии регуляции физиологической активности гиппокампа ведущее значение имеют соответствующие рецепторные системы, их модуляция и регуляция, которые трансдуцируют синаптический сигнал и в конечном итоге обуславливают длительные биохимические изменения.

В настоящей работе изучены количественные сдвиги катехоламинов и некоторых пептидов в гиппокампе, изменение чувствительности определенных рецепторных систем, а также активностей основных протеинкиназ в процессе обучения и условнорефлекторной деятельности.

Материалы и методы

Опыты проводили на растущих крысах-самцах массой 100-120 г. Реакцию активного избегания животных вырабатывали по методу, описанному Айвазашвили, Иорданишвили [9] в челночной камере с помощью светового сигнала и электрического раздражения. Для улучшения условно-рефлекторной деятельности к пище добавляли оротовую и инозиновую кислоты, а также витамины по методу, описанному ранее [10]. В качестве контрольных использовали крыс, получавших тот же рацион питания.

Синаптические мембраны выделяли по методу Whittaker [11]. Связывание различных лигандов с рецепторными белками определяли в среде, содержащей 120 мМ NaCl, 4 мМ KCl, 1,2 мМ CaCl₂, 1,3 мМ MgCl₂, 50 мМ трис-HCl, pH 7,4, 10 мМ паргиллина. При определении плотности дофаминового рецептора инкубационная среда содержала от 0,5 до 10 нМ [³H]спироперидола, рецепторов ГАМК — от 0,5 до 15 нМ [³H]мусцимола, мускаринового холинорецептора — от 1 до 15 нМ [³H]квиниклидинилбензилата и β-адренорецептора — от 0,7 до 10 нМ [³H]дигидроальprenолола. Для определения неспецифического связывания использовали 10 мкМ сульпирида (D₂-дофаминовый рецептор), 100 мкМ ГАМК (ГАМК-рецептор), 10 мкМ пропранолола (β-адренорецептор) и 10 мкМ атропина (мускариновый холинорецептор). В опытах использовали по 0,4 мг/мл белка. Инкубирование проводили в течение 25 мин при комнатной температуре, и смесь фильтровали через фильтры GF/C («Whatman», Англия). Фильтры промывали 20 мл буфера и радиоактивность считали в толуольной сцинтилляционной смеси.

Протеинкиназную активность определяли по методу Johnson и соавт. [12]. В соответствующих опытах добавляли либо 10 мкМ сАМР (сАМР-зависимая протеинкиназа), либо 10 мкМ CaCl₂ и 25 мкг/мл кальмодулина (Ca²⁺-кальмодулинзависимая протеинкиназа). Количество биогенных моноаминов (серотонин, дофамин, норадреналин) и ГАМК определяли с помощью дансил-derivатизации и ТСХ по методу, описанному ранее [10].

Определение пептидов проводили с помощью хроматографа высокого давления фирмы «Millipore-Waters» (США). Образцы ткани кипятили в 5 объемах воды в течение 3 мин, гомогенизировали и добавляли равный объем 0,1%-ной трифторуксусной кислоты (ТФУ). Смесь инкубировали в течение часа при 37°, центрифугировали при 20000 g 40 мин и надосадочную жидкость пропускали через колонку Ser-Pak («Millipore-Waters», США). Пептиды элюировали 60%-ным раствором ацетонитрила, содержащим 0,05% ТФУ. Элюаты выпаривали досуха на приборе Pico-Tag («Millipore-Waters», США), разводили в 200 мкл 0,05% ТФУ и вводили в систему ВЭЖХ (50—100 мкл). Использовали колонку Nova Pac C₁₈ (RP) (3,9 × 150 мм; «Millipore-Waters», США). Элюирование проводили линейным градиентом ацетонитрила от 0 до 42% со скоростью 0,5 мл в мин. Пептиды детектировали на спектрофотометре 441 («Millipore-Waters», США) при длине волны 214 нм. Количественную обработку хроматограмм проводили на интеграторе Chromatorac C-R2AX («Shimadzu», Япония). Стандартизацию колонки проводили следующими пептидами: Arg-вазопрессин, Leu- и Met-энкефалины, окситоцин, брадикинин, ангиотензин II,

нейротензин, холецистокинин (сульфатированный), субстанция Р, соматостатин, вазоактивный интестинальный пептид, АКГГ₁₋₃₉, β -эндорфин.

Результаты и обсуждение

Исследованиями, проводившимися ранее в нашей лаборатории [13] было выяснено, что условнорефлекторная деятельность животных, способность к обучению, стимулируется определенными метаболитами и зависит от дополнительных факторов питания. Поэтому для усиления поведенческой активности животных в рацион питания как контрольных, так и подопытных животных дополнительно вводили различные коферменты, а также предшественники нуклеиновых кислот в виде оротовой и инозиновой кислот [10].

В настоящее время выяснено, что моноамины мозга (норадреналин, дофамин, серотонин) принимают участие в процессах обучения, консолидации и воспроизводства информации. Показано, что изменения метаболизма этих нейромедиаторов касаются не основных катехоламин- или серотонинергических структур мозга, а происходят на уровне определенных нейрональных путей, способствующих усилению процессов запоминания [14]. Предполагается, что эти пути регулируются некоторыми нейропептидами [15], усиливающими обмен моноаминов и модулирующими рецепторные системы указанных нейромедиаторов.

Количественное определение катехоламинов и серотонина в гиппокампе показало, что у обученных животных происходило снижение содержания дофамина, а количество норадреналина и серотонина оставалось на одном уровне (табл. 1). Эти изменения были характерны для септо-гиппокампальной области и не происходили в других исследуемых нами структурах мозга: кора гемисфер, мозжечок, продолговатый мозг (непредставленные данные). Аналогичная картина наблюдалась и в отношении ГАМК, уровень которой снижался у животных в гиппокампе после обучения.

Таблица 1

Изменение содержания биогенных моноаминов и ГАМК (мкг/г ткани) в гиппокампе мозга крысы после обучения условно-оборонительной реакции

Условия опыта	Норадреналин	Дофамин	Серотонин	ГАМК
Контроль	$0,33 \pm 0,03$	$1,22 \pm 0,04$	$0,94 \pm 0,04$	$5,56 \pm 0,87$
После обучения	$0,21 \pm 0,04$	$0,58 \pm 0,03$	$1,23 \pm 0,12$	$1,92 \pm 0,14$

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3 и 4 приведены средние данные из 6 опытов ($p \leq 0,05$).

Соответственно изменялась лигандсвязывающая способность рецепторных систем дофамина и ГАМК (табл. 2). На фоне уменьшения количеств этих нейромедиаторов происходило повышение числа мест связывания соответствующих лигандов, что свидетельствовало о включении регуляторных механизмов рецепторных систем в ответ на уменьшение содержания агонистов. Повышение плотности дофаминовых и ГАМК-рецепторов свидетельствует о вовлечении этих рецепторов гиппокампа и соответствующих нейромедиаторов в формировании и закреплении

следов памяти. Кроме этого было обнаружено, что при обучении происходит уменьшение плотности мускариновых холинорецепторов, обусловленно-го, по-видимому, увеличением количества АХ в гиппокампе.

Таблица 2

Изменение лигандсвязывающей способности (в фмоль/мг и Kd, в нМ) β -адрено-, М-холино-, Д-дофаминового и ГАМК-рецепторов гиппокампа крыс после обучения животных условнооборонительной реакции

Условия опыта	β -адренорецептор		Д-дофаминовый ре- цептор		ГАМК-рецептор		М-холинорецептор	
	B_{max}	Kd	B_{max}	Kd	B_{max}	Kd	B_{max}	Kd
Контроль	99,4	1,72	35,4	0,82	51,7	1,18	104	4,4
После обучения	101,1	1,27	64,8	1,27	161,9	1,28	25	3,2

Следует отметить, что усиление обмена АХ в гиппокампе является основным коррелятом условнорефлекторной деятельности крыс [5]. Показано, что метаболизм АХ в клетках гиппокампа находится под контролем нервных путей, проецирующихся из септума через опиятные, ГАМК- и дофаминергические интернейроны, а также нейроны, использующие в качестве нейромедиатора субстанцию Р [8]. ГАМК-содержащие интернейроны оказывают тормозящее действие и снижают интенсивность обмена АХ в вентральной части гиппокампа. Со своей стороны эти интернейроны активируются дофаминергическими путями из септума и в конечном итоге также вызывают ингибирование обмена АХ в гиппокампе, а также снижение условнорефлекторной активности [16]. Полученные нами данные указывают на то, что при обучении условно-оборонительной реакции у крыс происходит снижение активности дофаминовых, а соответственно и ГАМК-содержащих интернейронов, что приводит к снятию тормозящего действия последних на обмен АХ в гиппокампе.

Другими важнейшими соединениями, регулирующими активность гиппокампа, являются пептиды. Показано, что широкий спектр этих соединений вовлечен в процесс обучения и памяти [17]. Изменения условнорефлекторной деятельности животных под действием некоторых пептидов в основном затрагивают лимбические структуры мозга и тесно связаны с метаболизмом биогенных моноаминов. Предполагается, что одним из анатомических субстратов поведенческих и нейрохимических эффектов вазопрессина, АКТГ и его фрагментов, субстанции Р и β -эндорфина может быть гиппокамп [18].

Таблица 3

Изменение содержания некоторых неuropeптидов (пмоль г ткани) в гиппокампе крыс после обучения животных условно-оборонительной реакции

Условия опыта	β -эндорфин	субстанция Р	Arg-вазопрессин
Контроль	$3,3 \pm 0,4$	$0,6 \pm 0,08$	$1,8 \pm 0,2$
После обучения	$1,3 \pm 0,2$	$0,08 \pm 0,01$	$2,4 \pm 0,3$

Количественный анализ некоторых неuropeптидов в гиппокампе с помощью ВЖЭХ показал, что при закреплении условно-оборонительной реакции происходит снижение содержания субстанции Р и β -эндорфина

и повышение Arg-вазопрессина (табл. 3). Концентрации остальных определенных нами пептидов либо не изменялись (АКТГ₁₋₃₈, соматостатин), либо не детектировались вообще (брадикинин, нейротензин, холецистокинин₁₋₈).

Учитывая, что β -эндорфин также, как и дофамин, действует через ингибиторные ГАМК-ергические интернейроны, а субстанция Р непосредственно снижает обмен АХ в дорзальной части гиппокампа [16], можно заключить, что уменьшение количества этих пептидов, наряду с понижением содержания дофамина и ГАМК, вызывает снятие действия тормозных механизмов гиппокампа при обучении.

Сдвиги в содержании указанных выше нейротрансмиттеров и чувствительности рецепторных белков должны приводить к изменению систем внутриклеточной регуляции, к активации ряда ключевых ферментов, участвующих в посттрансляционной модификации. Определение cAMP-зависимой и Ca^{2+} -кальмодулинзависимой протеинкиназы в гиппокампе показало, что в процессе обучения происходит выраженное изменение активности кальмодулинзависимого фермента (табл. 4). Активность же cAMP-зависимой протеинкиназы изменяется лишь в незначительной степени.

Таблица 4

Изменение активностей cAMP- и Ca^{2+} -CaM-зависимой протеинкиназы (нмоль Р/мг мин) в гиппокампе крыс после обучения животных условно-оборонительной реакции

Условия опыта	cAMP-зависимая протеинкиназа	Ca^{2+} -CaM-зависимая протеинкиназа
Контроль	2898	1177
После обучения	4025	5445

Ca^{2+} -кальмодулинзависимая протеинкиназа является ключевым ферментом, регулирующим обмен кальция в нервной ткани. Региональное и количественное распределение этого фермента в мозгу, особенности его регуляции позволяют предположить, что Ca^{2+} -кальмодулинзависимая протеинкиназа может участвовать в фиксировании информации на молекулярном уровне и обуславливать функциональные изменения, связанные с синаптической пластичностью [19,20]. Учитывая тот факт, что ионы кальция опосредуют основные физиологические феномены гиппокама, в том числе и длительную потенциацию [4], можно предположить, что увеличение активности Ca^{2+} -кальмодулинзависимой протеинкиназы сопряжено с усилением метаболической активности этой структуры и коррелирует с повышением способности запоминания.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что обучение крыс условнорефлекторному поведению сопровождается повышением метаболической активности гиппокампа через дофамин-ГАМК-холин и пептидергические системы, которые в конечном итоге приводят к усилению Ca^{2+} -зависимых процессов, возможно, лежащих в основе восприятия информации и закрепления следов памяти.

SOME NEUROCHEMICAL CORRELATES OF CONDITIONED REFLEX REACTION ACTIVITY IN RAT BRAIN HIPPOCAMPUS

Chogovadze I. S., Mikeladze D. G.

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

Determination of some active peptides, biogenic amines, GABA as well, as the sensitivity of some receptors in rat brain hippocampus was carried out after active avoidance paradigm in shuttle-box. It was obtained that training evokes arg-vasopressin and serotonin concentrations enhancement. In contrast to that the amount of dopamine, GABA, substance P and β -endorphin decreases after the training. Besides, D_2 -dopamine and GABA receptor density rise and amount of binding sites fall for M-cholinoreceptor ligands was observed. It was shown that training of animals was accompanied by cAMP- and Ca-calmodulin-dependent protein kinase activity amplification. It is proposed, that training induces the intensification of acetylcholin metabolism, regulated by inhibitory GABA-, dopamine- and peptidergic interneurons projecting from septal regions of brain.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кругликов Р.И. Нейрохимия механизмов обучения и памяти, М., Наука, 1981.
2. Matthies H. - In: Neuronal Plasticity and Memory Formation (eds. C.Ajmoné Marsan, H. Matthies), v.9, p.1-15, Raven Press, N-Y., 1982.
3. Grossman S.P. - In: Functions of the Septo-hippocampal System (eds. K. Elliot, J. Whelan), p.227-273, Elsevier/Nort-Holland, N-Y., 1978.
4. Lynch G., Larson J., Kelso S., Barrionuevo G., Sotthoff F. Nature, v.301, p.603-604, 1983.
5. Costa E., Panula P., Thompson H.K., Cheney D.L. Life Sci., v.32, p.165-179, 1983.
6. Collingridge G.L. Trends Pharmacol. Sci., v.6, p.407-411, 1985.
7. Greckch G., Matthies H. - In: Neuronal Plasticity and Memory Formation (eds. C.Ajmoné Marsan, H. Matthies), v.9, p.353-359, Raven Press, N-Y., 1982.
8. Panula P., Revaalta A.V., Cheney D.L., Wu J.Y., Costa E.J. Comp. Neurol., v.222, p.69-80, 1984.
9. Айпазашвили И.М., Иорданишвили Г.С. Сообщения АН ГССР, т.81, №1 с.181-184, 1976.
10. Чоговадзе И.С. Известия АН ГССР, Актуальные вопросы биологии и медицины, с.459-466, 1988.
11. Whittaker V.P., Ann. N. Y. Acad. Sci., v.137, p.952-960, 1966.
12. Johnson E.M., Maeno H., Greengard P.J. Biol. Chem. v.246, p.7731-7739, 1971.
13. Коменгачи П.А., Алексидзе Н.Г., Клейн Е.Э. — В кн: Нейрохимические аспекты памяти, Тбилиси, Мецниереба, 1980.
14. Kovacs G.L., Bohus B., Versteeg D.H.G. Progr. Brain Res. v.53 p.123-140, 1980.
15. Bohus B.L., Conti G.L., Kovacs G.L., Versteeg D.H.G. — In: Neuronal Plasticity and Memory Formation (eds. C.A. Marsan, H. Matthies), v.9, p.75-87, Raven Press, 1982.
16. Blaker W.D., Peruzzi G., Costa E., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v.81, p.1880-1882, 1984.
17. Кругликов Р.И. — В кн: Фармакология нейропептидов, с.112-124, 1982.
18. Wimersma Greidanus T.J.B., Bohus B., Kovacs G.L., Versteeg D.H.G., Burbach J.P.H., De Wied D. Neurosci. Behav. Rev. v.7, p.453-463, 1983.
19. Quinnet C.C., McGuinness T.L., Greengard P. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v.81, p.5604-5608, 1984.
20. Miller S.G., Kennedy M.B. Cell., v.44, p.861-870, 1986.

Поступила 13.04.1989

УДК 612.821.7+557.15/17+612.8.015

ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДА ДЕЛЬТА-СНА НА СОДЕРЖАНИЕ ПОЛИАМИНОВ В МОЗГУ И ПЕЧЕНИ КРЫС В НОРМЕ И ПРИ ДЕЙСТВИИ ХОЛОДОВОГО СТРЕССА

Бондаренко Т.И., Кричевская А.А.,
Черногубова Е.А.

Ростовский государственный университет

Однократное введение дельта-сон индуцирующего пептида в дозе 12 мкг/100 г массы животного на содержание полиаминов в печени интактных крыс не влияло, увеличивая его в мозгу в более отдаленные сроки после введения — через 1-3 суток. Введение дельта-сон индуцирующего пептида интактным животным приводило к увеличению содержания белка как в мозгу, так и в печени. Холодовой стресс вызывал уменьшение содержания белка в мозгу и печени крыс, содержание же полиаминов в мозгу при этом также снижалось, а в печени, наоборот, повышалось. Введение дельта-сон индуцирующего пептида «холодовым» животным нормализует содержание полиаминов в мозгу крыс, а также содержание путресцина и спермина в печени; содержание же спермидина при этом ниже контроля, что характерно для животных, адаптированных к действию холода.

* * *

В последние годы интенсивно изучается роль нейропептидов в модуляции процессов адаптации к меняющимся нагрузкам и условиям внешней среды [1]. Известен антистрессорный эффект вещества Р, дельта-сон индуцирующего пептида (ДСИП) и др. [2, 3]. Нами ранее показано антистрессорное действие ДСИП в дозе 12 мкг/100 г массы животного в условиях холодового стресса [4], механизм которого пока неизвестен. В ответную реакцию организма на экстремальные воздействия вовлекаются такие жизненно важные функции клеток, как воспроизведение генетической информации и процессы биосинтеза белка. Нарушения этих процессов могут быть опосредованы также сдвигами в системах регуляции. Большое значение придается низкомолекулярным регуляторам, осуществляющим тонкий контроль внутриклеточных процессов. Такими веществами, участвующими в регуляции биосинтеза белка и нуклеиновых кислот, являются низкомолекулярные азотистые соединения — полиамины, которые известны также как соединения, нормализующие метаболизм при действии на организм экстремальных факторов среды [5]. Установлено разнообразное влияние нейропептидов на синтез РНК и белков [6]. Пептидная природа ДСИП предполагает возможность его взаимодействия с разными регуляторными системами организма.

В связи с этим было исследовано влияние ДСИП на содержание белка и полиаминов — путресцина, спермидина и спермина в мозгу и печени крыс в норме и при действии холодового стресса.

Материалы и методы

Исследование выполнено на белых беспородных крысах-самцах массой 150-180 г в зимние месяцы (декабрь—февраль) в два этапа. На первом этапе изучали влияние ДСИП на содержание белка и полиаминов в мозгу и печени интактных крыс через различные сроки после введения пептида. Подопытные животные были разделены на шесть групп, которым за 1, 3, 6 ч, 1, 2 и 3 суток до декапитации внутрибрюшинно вводили ДСИП в дозе 12 мкг/100 г массы животного. Контролем служили интактные животные, которых содержали в условиях вивария при 20—22°. На втором этапе исследования изучали влияние холодового стресса на содержание белка и полиаминов в мозгу и печени крыс и эффект ДСИП в условиях холодового стресса. В этой серии опытов подопытных животных делили на две группы: а) животные, которых содержали 3 суток в холодовой камере при 0—2° (3 суток на холоде); б) животные, которым перед помещением их в холодовую камеру внутрибрюшинно вводили ДСИП в дозе 12 мкг/100 г (3 суток + ДСИП). В мозгу и печени животных всех исследуемых групп определяли содержание белка методом Lowry и соавт. (1951 г.) в модификации Schacterle, Pollack [7], содержание полиаминов — методом Inoue, Mizutani [8], используя ИОХ на Dowex 50W×8 и низковольтный электрофорез на бумаге в лимоннокислом буфере при pH 3,6.

Результаты и обсуждение

Средние результаты однократного введения ДСИП интактным крысам приведены в табл.1. Они показывают, что на содержание полиаминов в печени ДСИП не влиял. В то же время было установлено, что, не приводя к изменению содержания путресцина в мозгу крыс через 1, 3 и 6 ч после введения ДСИП, через 1 сутки содержание путресцина в мозгу крыс

Таблица 1

Влияние ДСИП на содержание полиаминов в мозгу и печени крыс через различные сроки после внутрибрюшинного введения пептида (в нмоль/г ткани, $M \pm m$, $n=8$)

Исследуемое соединение	Контроль	Контроль + ДСИП (время после введения)					
		1 ч	3 ч	6 ч	1 сутки	2 суток	3 суток
		Мозг					
Путресцин	21,68 ± 1,45	21,45 ± 2,31	20,38 ± 1,44	23,49 ± 1,96	27,12 ± 2,27*	31,47 ± 3,39*	32,51 ± 3,37*
Спермидин	131,94 ± 2,5	127,65 ± 7,23	126,44 ± 6,15	133,80 ± 6,64	136,15 ± 2,29	143,92 ± 2,47*	142,20 ± 2,50*
Спермин	52,07 ± 1,27	54,22 ± 2,73	52,71 ± 2,47	50,73 ± 2,06	51,33 ± 2,05	54,15 ± 1,73	61,58 ± 2,09*
Печень							
Путресцин	47,93 ± 1,93	50,07 ± 2,74	47,22 ± 4,16	45,55 ± 2,69	47,15 ± 2,13	44,54 ± 2,00	45,04 ± 1,46
Спермидин	803,51 ± 9,6*	795,49 ± 8,63	798,65 ± 10,75	790,84 ± 10,46	802,33 ± 6,83	802,68 ± 5,30	782,55 ± 7,97
Спермин	266,07 ± 1,7	257,04 ± 8,02	261,02 ± 6,05	269,34 ± 4,44	259,08 ± 4,17	261,12 ± 6,56	270,45 ± 4,50

Примечание. Здесь и в табл.3 звездочкой отмечены статистически достоверные различия по сравнению с контролем ($p < 0,01—0,001$)

увеличивалось на 25,3, через 2 суток — на 46, через 3 суток — на 50,8% по сравнению с контролем. Содержание спермидина при этом в мозгу этих же животных не изменялось по сравнению с контролем через 1, 3 и 6 ч и 1 сутки после введения ДСИП, а через 2 и 3 суток имело место увеличение содержания спермидина на 9,1 и 7,8% соответственно. Наименьшее влияние ДСИП при его периферическом введении оказывало на содержание спермина в мозгу крыс. Концентрация спермина в мозгу крыс не изменялась через 1, 3, 6 ч, 1, 2 суток после введения ДСИП, лишь через 3 суток оно увеличивалось на 18,3% по сравнению с контролем. Таким образом, наибольшее увеличение содержания полиаминов в мозгу при введении ДСИП интактным животным наблюдали в более отдаленные сроки после его введения (на 3 сутки). Особенно это характерно для путресцина, в меньшей степени — для спермина.

Tabor C., Tabor U. [9] отмечали, что при стимуляции роста в биосистемах также вначале возрастала концентрация путресцина, затем наблюдали параллельное накопление спермидина и РНК; концентрация спермина повышалась несколько позже. Высказано предположение, что сАМР может быть важным фактором, оказывающим влияние на биосинтез полиаминов, повышая активность орнитиндекарбоксилазы посредством сАМР-зависимой протеинкиназы [10]. Можно допустить, что эффекты ДСИП также могут опосредоваться аденилатциклазной реакцией.

Таблица 2

Влияние ДСИП на содержание белка в мозгу и печени крыс через различные сроки после внутрибрюшинного введения 12 мкг/100 г пептида и при действии холодового стресса (в мг/1г ткани. $\bar{M} \pm m$, $n=8$)

Исследуемая ткань	Контроль	Контроль + ДСИП						
		через 1 ч после введения	через 3 ч после введения	через 1 сут. после введения	через 2 суток после введения	через 3 суток после введения	3-е суток холода	3-е суток холода + ДСИП
Мозг	125,41 ± 2,67	133,99 ± 1,24	139,84 ± 2,87	147,76 ± 2,17	162,14 ± 2,61	182,43 ± 5,39	105,49 ± 2,05	137,33 ± 3,03
Печень	188,45 ± 2,72	200,28 ± 2,76	202,62 ± 3,48	214,23 ± 3,64	227,84 ± 4,73	260,66 ± 8,37	176,81 ± 2,44	206,25 ± 3,11

Примечание. Все различия по отношению к контролю статистически достоверны ($p < 0,01 - 0,001$)

Повышение содержания полиаминов должно повлечь за собой активацию синтеза как нуклеиновых кислот, так и белков в мозгу. Нами показано (табл. 2), что через 1 ч после введения ДСИП интактным животным содержание белка в мозгу увеличивается на 7, через 3 ч — на 11, через 1 сутки — на 18, через 2 суток — на 29%, через 3 суток наблюдается самое значительное увеличение содержания белка — на 45% по сравнению с контролем. Однократное введение ДСИП в дозе 12 мкг/100 г интактным животным приводит к увеличению содержания белка не только в мозгу, но и в печени этих же животных. Через 1 ч после введения 12 мкг/100 г ДСИП содержание общего белка в печени крыс увеличивается на 6, через 3 ч — на 7, через 1 сутки — на 14, через 2 суток — на 21, через 3 суток — на 38% по сравнению с контролем. Таким образом, введение ДСИП

приводит к повышению содержания белка как в мозгу, так и в печени интактных крыс, причем максимальное увеличение содержания белка и в мозгу, и в печени происходит через 3 суток после введения ДСИП. В связи с тем, что содержание белка увеличивается не только в мозгу, но и в печени, где уровень полиаминов при введении ДСИП не изменяется, можно предположить, что в регуляции биосинтеза белка при введении ДСИП включаются и другие механизмы регуляции биосинтеза белка.

Рассматривая эти данные, следует учитывать несколько возможных механизмов. Во-первых, объектом фосфорилирования протеинкиназами, «включаемыми» посредством регуляторных пептидов, могут быть белки-регуляторы трансляции и транскрипции. Во-вторых, значительные изменения содержания Ca^{2+} и других ионов, миграции которых возникают в результате модификации мембранных белков, могут порождать другие процессы, ведущие в конечном счете к изменению скорости транскрипции тех или иных генов или к изменениям скорости трансляции (менее специфичным) [11]. В-третьих, особого внимания заслуживает установленное недавно явление интернализации рецептор-лигандных комплексов и сведения о наличии в оболочке ядра и в хроматине соединений, способных специфически связывать регуляторные пептиды. Кроме того, эффект ДСИП в регуляции активности генома клеток может быть опосредован участием в этих процессах катехоламинов. Нами ранее показано резкое увеличение содержания катехоламинов в мозгу и печени крыс после введения ДСИП [12]. Что касается механизмов участия катехоламинов в регуляции активности генома клеток, то они общеизвестны [13]. Кроме того, в опытах *in vitro* показана способность полиаминов усиливать ацетилирование фракции гистонов, связанная либо с активацией ацетилирующих ферментов, либо с увеличением доступности этих фракций для ферментов [14]. Ацетилирование остатков лизина и аргинина приводит к уменьшению общего положительного заряда основного белка. Это должно ослаблять взаимодействие между гистонами и отрицательно заряженной ДНК и способствовать активации репрессированных генных локусов.

Меерсон [15], установив, что различные приспособительные реакции сопровождаются изменением активности синтеза нуклеиновых кислот и белков, считает, что именно эти процессы лежат в основе развития стресс-реакции и адаптации организма. Нарушение синтеза белков может быть опосредовано сдвигами в системах его регуляции, в которых важная роль принадлежит полиаминам.

При действии холодового стресса содержание общего белка в мозгу крыс уменьшается на 16, а в печени — на 6% по сравнению с контролем (табл.2). В первые дни холодового воздействия отмечается снижение содержания полиаминов в ткани мозга крыс; содержание путресцина снижается на 55,1, спермидина — на 13,8, спермина — на 32,7% по сравнению с контролем (табл.3). Так как стрессорные изменения в организме при действии холода сопровождаются увеличением основного обмена, то естественно было ожидать повышение содержания полиаминов в печени, являющейся важным регулятором обмена. Содержание полиаминов в печени крыс при действии холода увеличивается по сравнению с контролем. Следует отметить, что для спермина при действии холода

обнаружено самое значительное повышение концентрации в печени крыс — на 61,9% по сравнению с контролем. Очевидно, пул спермина в системе полиаминов наиболее чувствителен к действию холода. В меньшей степени холодное воздействие влияет на концентрацию путресцина и спермидина, содержание которых в печени крыс увеличивается на 16,7 и 27,8% по сравнению с контролем (табл.3). Не исключено, что поддержание повышенного уровня спермина осуществляется за счет его предшественников — спермидина и путресцина. Повышенный уровень спермина является, вероятно, одной из причин усиления синтеза ДНК и белка в печени, стимуляции деления ее клеток у животных, подвергнутых действию холода. Так, было показано [16], что выдерживание животных на холоде приводит к увеличению веса печени, количества клеток и содержания в ней ДНК. Использование ингибиторов синтеза полиаминов позволило установить, что увеличение синтеза полиаминов является не побочным эффектом, а необходимой предпосылкой деления клеток и выступает в роли инициатора синтеза ДНК [17]. Неодинаковая компартиментализация спермидина и спермина в клетках млекопитающих позволяет предположить различие их функций. Так, спермин в большей степени, чем спермидин, ассоциирован с ядрами, в частности с хроматином, что свидетельствует о его связи с метаболизмом ДНК, содержание спермина в ядрах клеток резко повышается при стимуляции синтеза ДНК [18].

Таблица 3

Влияние ДСИП на содержание полиаминов в мозгу и печени крыс при действии холодового стресса (в нмоль/г ткани, $M \pm m$, $n=8$)

Исследуемое соединение	Контроль	Контроль + ДСИП	3-е суток холода	3-е суток холода + ДСИП
Мозг				
Путресцин	$21,68 \pm 1,45$	$32,51 \pm 3,37^*$	$9,73 \pm 0,94^*$	$21,95 \pm 1,85$
Спермидин	$131,94 \pm 2,53$	$142,20 \pm 2,50^*$	$113,76 \pm 4,46^*$	$132,11 \pm 2,38$
Спермин	$52,07 \pm 1,27$	$61,58 \pm 2,09^*$	$35,17 \pm 2,67^*$	$55,20 \pm 1,68$
Печень				
Путресцин	$47,93 \pm 1,93$	$45,04 \pm 1,46$	$55,95 \pm 2,08^*$	$47,55 \pm 1,98$
Спермидин	$803,51 \pm 9,65$	$782,55 \pm 7,97$	$1027,01 \pm 36,96^*$	$529,41 \pm 7,23^*$
Спермин	$266,07 \pm 1,75$	$270,45 \pm 4,50$	$430,78 \pm 9,93^*$	$268,18 \pm 4,28$

Причины, обуславливающие изменение содержания полиаминов в мозгу и печени крыс, неизвестны, но можно предположить, что под действием холода изменяется активность ферментов синтеза полиаминов: орнитиндекарбоксилазы (ОДК), спермидинсинтазы и сперминсинтазы. Концентрация полиаминов в тканях регулируется сложной цепью ферментативных реакций, первым звеном которой можно считать расщепление аргинина. Активность аргиназы крыс при действии холода претерпевает глубокие органоспецифические изменения — в печени она возрастает, в мозгу, наоборот, снижается [19]. Это может привести к резкому повышению или понижению содержания орнитина, являющегося непосредственным предшественником полиаминов в мозгу. В этой связи привлекают внимание результаты исследования на линии клеток млекопитающих, в которых отсутствовала аргиназная активность; удаление из среды экзогенных орнитина и полиаминов приводило к полному исчезновению в этих клетках путресцина, спермидина, концентрация же спермина уменьшается

лишь в небольшой степени [20]. Поскольку на пути синтеза полиаминов ОДК находится ближе к спермидину, чем к спермину, содержание спермидина в большей степени зависит от активности этого фермента, чем содержание спермина, а устойчивость сперминсинтетазы больше по сравнению со спермидинсинтетазой.

Введение ДСИП «холодовым» животным нормализовало содержание полиаминов в мозгу крыс. Вероятно, в результате введения ДСИП запускается комплекс биохимических реакций, препятствующих резкому нарушению белкового синтеза в мозгу. Однократное введение ДСИП «холодовым» животным приводит к увеличению содержания белка в мозгу и печени на 9% по сравнению с контролем. Введение ДСИП «холодовым» животным нормализует также содержание путресцина в печени крыс, однако содержание спермидина остается на 34,1% ниже контроля. Это может быть связано с тем, что аргиназа печени в отличие от аргиназы мозга активируется гормонами системы гипофиз—надпочечники [19, 22], а ДСИП в свою очередь может выступать в качестве гормона и обладает выраженным симпатoadреналовым эффектом [3].

Адаптация к холоду у крыс в естественных условиях эксперимента достигается не ранее 45 суток. Полученные нами данные по содержанию полиаминов в мозгу и печени «холодовых» крыс при введении ДСИП совпадают с результатами исследования Цветненко [21] по содержанию полиаминов в мозгу и печени адаптированных к действию холода животных.

Таким образом, ДСИП в дозе 12 мкг/100 г при периферическом введении приближает животных к наступлению холодовой адаптации уже на 3 сутки действия холода. Адаптогенное действие ДСИП выражается в ускорении и модификации течения холодовой адаптации путем нормализации ряда биохимических процессов, в том числе и в нормализации содержания полиаминов в тканях крыс.

INFLUENCE OF DELTA-SLEEP INDUCING PEPTIDE ONE THE POLYAMINE LEVEL OF RAT BRAIN AND LIVER IN THE NORM AND UNDER COLD STRESS

Bondarenko T. I., Krichevskaya A. A.,
Chernogubova E. A.

*Department of Biochemistry and Biotechnology,
Rostov State University, Rostov*

Single administration of delta-sleep inducing peptide (DSIP) at a dose of 12 μ g per 100 g of rat body weight did not change polyamine level in rat liver. The increased polyamine level was observed 1—3 days after DSIP injection in intact rat brain. DSIP administration to intact rats increased the protein content both in brain and liver. Under cold stress conditions protein content decreased both in brain and liver, whereas concentration of polyamine decreased in brain and increased in liver. DSIP injection to animals kept under cold conditions restored the level of polyamine in rat brain as well as putrescine and spermine in liver. The spermidine level was lower by 34,1% in animals kept under cold stress conditions.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бахарева В.Д. — В кн.: Компоненты адаптационного процесса, с.53—69. Л., Изд-во ЛГУ, 1984.
2. Эме П., Бинерт М., Хехт К., Бергман Ю. Вещество Р. Некоторые проблемы химии, биохимии, фармакологии, физиологии и патофизиологии, Рига, Зинатне, 1984.
3. Graf M.V., Kastin A.J. Peptides, v.7, p.1165—1187, 1986.
4. Бондаренко Т.И., Кричевская А.А., Крупеникова Е.Ю., Михалева И.И. Физиол. журн. СССР, т.71, N3, с.279—282, 1985.
5. Кричевская А.А., Лукаш А.И., Шугалей В.С., Бондаренко Т.И. Аминокислоты, их производные и регуляция метаболизма, Ростов-на-Дону, Изд-во РГУ, 1983.
6. Ашмарин И.П., Каменская М.А. Нейропептиды в синаптической передаче. Итоги науки и техники. Сер. Физиология человека и животных, М., ВИНТИ, 1988.
7. Schacterle J.R., Pollack R.J. Anal. Biochem., v.51, N2, p.654—655, 1973.
8. Inoue H., Mizutani A.A. Anal. Biochem., v.56, N2, p.408—416, 1973.
9. Tabor C.W., Tabor U. Ann. Rev. Biochem., v.53, p.749—790, 1984.
10. Russell D.H., Durie B.G. Polyamines as biochemical markers of normal and malignant growth, New York, Raven Press, 1978.
11. Greenberg M.E., Ziff E.B., Green L.A. Science, v.234, N4772, p.80—83, 1986.
12. Бондаренко Т.И., Кричевская А.А., Шейкина И.В., Кирюхина Е.В. Физиол. журн. СССР, 1988.
13. Божко Г.Х. Нейрохимия, т.4, N4, с.442—455, 1985.
14. Moruzzi G., Caldarera C.M., Casti A. Mol. and Cell. Biochem., v.3, N2, p.153—161, 1974.
15. Meerсон Ф.З. Адаптация, стресс и профилактика, М., Наука, 1982.
16. Holeckova E., Bondusova M. Physiol. bohemoslov., v.24, N4, p.311—313, 1975.
17. Boynton A., Whitfield T., Isaacs R. Cell. phisiol., v.89, N3, p.441—448, 1977.
18. Mach M., Ebert P., Popp R., Ogilvie A. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v.104, N4, p.1327—1334, 1982.
19. Шугалей В.С., Козина Л.С. Физиол. журн. СССР, т.63, N8, с.1199—1202, 1977.
20. Pohjanpelto P. Exp. Cell. Res., v.141, N2, p.333—339, 1982.
21. Цаеценко Е.З. Полиамины мозга и печени животных при действии гипероксии и низкой температуры среды. Автореферат канд. дисс., Ереван, 1980.
22. Давтян М.А., Петросян Л.А. Биол. журн. Армении, т.23 N5, с.99—102, 1970.

Поступила 19.03.1989

УДК 577.112

ХАРАКТЕРИСТИКА КАРДИОАКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ МОЗГОВОГО СЛОЯ НАДПОЧЕЧНИКОВ БЫКА

Паронян З.Х., Срапионян Р.М., Абрамян С.С.,
Григорян Л.А., Галоян А.А.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Из мозгового слоя надпочечников выделены 8 коронароактивных факторов, ингибирующих ФДЭ сАМР. Исследовано влияние термообработки, протеолиза, а также кислотных и щелочных воздействий на их коронарорасширяющую способность и ингибирование ФДЭ сАМР.

Показано, что большинство из исследуемых соединений не проявляют присущих им указанных свойств в этих условиях. Лишь двое из них частично инактивируются (~ на 40—50%) и сохраняют в значительной степени (~ 75%) эффект ингибирования ФДЭ сАМР.

Установленный факт гликозилирования молекул этих соединений, обеспечивающий их большую стабильность, позволит объяснить определенную резистентность этих соединений к вышеописанным воздействиям, и в частности к протеолизу.

* * *

Впервые в 1973 году в мозговом слое надпочечников были обнаружены и идентифицированы 3 коронароактивных соединения [1]. В последующем из медуллы надпочечников удалось выделить уже 8 подобных соединений, условно обозначенных по параметрам выхода из колонок сефадекса G-10 и ДЭАЭ-ц как факторы $M_1, M_1, M_1, M_2, M_3, M_3, M_4$ и M_4 (M — медулла) [2]. Была допущена возможность их участия в реализации коронарорасширяющего эффекта гипоталамических нейрогормонов «К» и «С». Исследование возможной корреляции между действием этих соединений на изменение активности ФДЭ сАМР и коронарными эффектами обнаружило, подобно гипоталамическому нейрогормону «С» [3], зависимость коронарорасширяющего влияния этих факторов от степени ингибирования ФДЭ циклических нуклеотидов.

Целью данной работы было изучение физико-химических свойств новых факторов мозгового слоя надпочечников в сравнении с гипоталамическими кардиоактивными нейрогормонами, в частности с nC_{7a} (нейрогормон C_{7a}).

При этом основное внимание уделено трем факторам M_2, M_3, M_4 , которые при различных экстремальных условиях (рН, температура) в определенной степени сохраняют коронарные эффекты.

Методы исследования

Коронароактивные соединения выделяли из уксуснокислого экстракта мозгового слоя надпочечников быка по методу, описанному ранее [4].

Очистку и дифференциацию искоемых факторов осуществляли по схеме, приведенной в нашей предыдущей работе [2].

Кислотный и щелочной гидролиз проводили в 6 н. HCl при 110° 1н. NaOH при 90° и комнатной температуре в течение 1—24 ч.

Ферментативный гидролиз трипсином и химотрипсином проводили в аммоний-бикарбонатном буфере, pH — 8,0 в течение 1—24 ч, поддерживая соотношение фермент/субстрат 1:80.

Активность ФДЭ сАМР мозга крыс определяли по количеству гидролизованного субстрата при его инкубации с ферментом по методу Rbch, Kukowetz [5], модифицированному применением радиоизотопного микрометода, предусматривающего разделение продуктов гидролиза с помощью восходящей ТСХ на пластинах Silufol UV—254 [6]. В качестве источника ФДЭ сАМР использовали супернатант гомогената (2000 г, 20 мин) мозга крыс. Счет радиоактивности продуктов гидролиза сАМР проводили на жидкостном сцинтилляционном спектрофотометре SL—30 («Intertechnique», Франция). Детально методика описана ранее [3].

Аминокислотный состав кардиоактивных факторов определяли после гидролиза препаратов в стандартных условиях (5,7 н. HCl, 22 ч, 110°) в автоматическом анализаторе «Durrum Model 250» (США).

Биологическое тестирование — проверку на изменение коронарного оттока — проводили в условиях *in situ* на кошках под уретановым наркозом.

Результаты и обсуждение

Как показали результаты исследования зависимости изменения коронарной активности и способности ингибировать активность ФДЭ сАМР (рис. 1), шесть из восьми факторов надпочечников оказались нерезистентными к кислотным (6 н. HCl) и щелочным (1 н. NaOH) воздействиям, теряя полностью свою нативную активность. Факторы же МЗ, и М4, частично инактивировались, вызывая увеличение коронарного оттока на 60 и 20% после кислотного гидролиза. После щелочного гидролиза указанные соединения инактивировались в большей степени, изменяя коронарный отток лишь на 25 и 10%. Инактивация препаратов заметно увеличивалась при повышении температуры до 90°. В этих условиях сохранял коронароактивность только фактор МЗ, и то лишь на 20% (рис. 1, а).

Коррелирующие с изменением коронарорасширяющей активности данные были получены при изменении ингибирующего ФДЭ сАМР действия указанных факторов, подвергнутых кислотному гидролизу, проводимому в тех же условиях. Как видно из диаграммы (рис. 1, б), ингибирующая активность МЗ, и М4, факторов на ФДЭ сАМР уменьшалась от 33 (1,1Е) до 25% (0,7Е) и от 48,2 (1,6Е) до 44% (1,2Е) соответственно. При щелочном гидролизе ингибирующая ФДЭ сАМР активность М4, фактора заметнее понижалась до 18,2 (0,3Е), а у МЗ, — до 20% (0,5Е).

В отдельной серии экспериментов была изучена зависимость изменения коронароактивности искоемых факторов мозгового слоя надпочечников от действия протеолитических ферментов — трипсина и химотрипсина. Поскольку получены аналогичные результаты, на диаграмме (рис. 2)

приведены данные трипсинолиза. Как оказалось, в зависимости от продолжительности действия этих ферментов, фактор M2 значительно инактивировался (1 ч) либо полностью (5—24 ч) терял способность расширять коронарные сосуды. Активность факторов M3₁ и M4₁ уменьшалась вдвое через 1 ч после начала протеолиза, оставаясь почти на таком же уровне в последующие 24 ч. Остальные факторы (M1₁, M1₂, M1₃, M3₂ и M4₂) полностью теряли нативную коронароактивность через 1 ч после начала протеолиза.

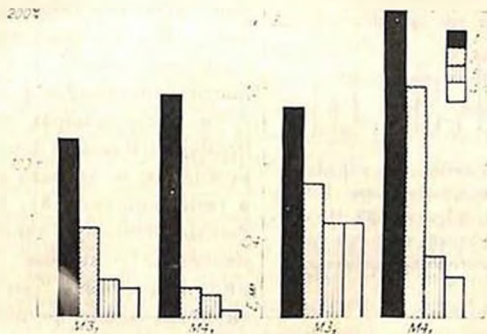


Рис. 1. Биологическая активность кардиоактивных факторов мозгового слоя надпочечников быка при воздействии различных факторов (а), ингибирующая ФДЭ сАМР мозга активность факторов надпочечника (б). За единицу активности принято то количество препарата, которое ингибирует 1 мЕ ФДЭ сАМР мозга за 1 мин. 1 — нативная форма препарата, 2 — гидролиз 6 н. НСl при 110°, 3 — щелочной гидролиз 1 н. NaOH при 22°, 4 — то же при 90°

Ингибирующая ФДЭ сАМР способность фактора M2 не изменялась в течение первого часа трипсинолиза (рис. 3), в последующие 5 ч она уменьшалась вдвое (от 0,4Е до 0,2Е) и исчезала полностью к концу протеолиза (24 ч). Таким же резким изменениям подвергался фактор M4₁, однако, в отличие от фактора M2, исчезновение его ингибирующего ФДЭ эффекта наблюдалось уже через 5 ч после начала протеолиза, а ингибирующий эффект фактора M3, в течение всей продолжительности трипсинолиза изменялся очень незначительно (от 0,7Е до 0,6Е).

При химотрипсинолизе (рис. 3) выявились различные сдвиги в изменении ингибирующей ФДЭ активности. Так, активность фактора M2 в течение первых 5 ч изменялась незначительно (от 0,4Е до 0,3Е), а ингибирующий эффект уменьшался вдвое лишь к концу протеолиза. Фактор M3, в течение 1 ч, как и при трипсинолизе, не подвергался изменениям, его ингибирующий эффект значительно уменьшался по сравнению с трипсинолизом в течение 5 ч и сохранялся до конца протеолиза. Действие химотрипсина на ингибирующее ФДЭ действие фактора M4, несколько слабее выражено по сравнению с трипсином в первый час после начала протеолиза. Если указанный фактор в последующие 5 ч и далее при трипсинолизе оказывался полностью нерезистентным к действию фермента, то при химотрипсинолизе он сохранял свою ингибирующую активность на

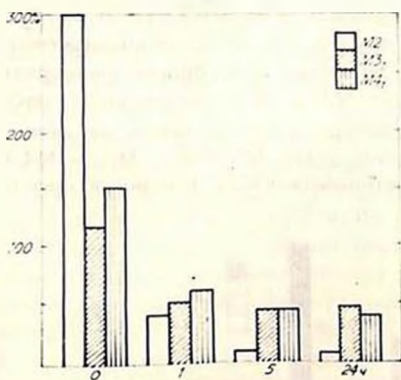


Рис. 2. Биологическая активность кардиоактивных факторов при трипсинолизе (в%), соотношение фермент/субстрат 1:80. По оси абсцисс — время инкубаций, ч; по оси ординат — изменение биологической активности, %

0,5Е, уменьшая ее к концу протеолиза до 0,3Е.

При интерпретации полученных данных, свидетельствующих о высокой резистентности кардиоактивных факторов надпочечников к описанным щелочным, кислотным воздействиям и протеолизу, необходимо отметить также ранее выявленные разнонаправленные действия этих соединений в отношении активности гликогенфосфорилазы в мозгу и висцеральных органах [7] и пресинаптической регуляции высвобождения и захвата катехоламинов в гипоталамусе [8]. Все описанные факты позволяют заключить, что выявляемые отличные биологические, биохимические, метаболические свойства идентифицированных факторов надпочечников, по-видимому, обусловлены их структурными различиями.

Безусловно, такое предположение нуждалось в экспериментальной аргументации. Определенный интерес в этой связи представляло изучение аминокислотного состава описанных кардиоактивных факторов. Сопоставление данных аминокислотного анализа факторов М2, М3, М4, свидетельствовало прежде всего об их сильно кислой природе. Остатки кислых

Безусловно, такое предположение нуждалось в экспериментальной аргументации. Определенный интерес в этой связи представляло изучение аминокислотного состава описанных кардиоактивных факторов. Сопоставление данных аминокислотного анализа факторов М2, М3, М4, свидетельствовало прежде всего об их сильно кислой природе. Остатки кислых

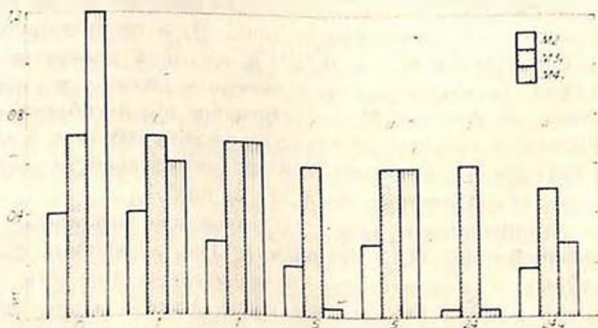


Рис. 3. Изменение инактивирующей ФДЭ сАМР мозга активности факторов надпочечника при воздействии трипсина (I) и химотрипсина (II). Обозначения те же, что на рис. 2

аминокислот в этих факторах составляют примерно 20, 33 и 38 моль/%, в то время как на долю основных аминокислот приходится примерно 9, 19 и 8 моль/% соответственно. Обращает на себя внимание, также как и в аминокислотном составе гипоталамического кардиотропного нейрогомо-

на «С», высокое содержание определенной группы аминокислот— глицина, серина, глутаминовой кислоты, составляющих в сумме примерно 50% от общей суммы аминокислотных остатков. В целом аминокислотный анализ выявил различия между факторами М2, М3₁ и М4₁ по трем аминокислотным остаткам — пролину, метионину и цистеину. Все три аминокислоты имеются в составе фактора М4₁ и, наоборот, отсутствуют в составе фактора М2. Фактор М3₁ не содержит остатков пролина и цистеина. Ароматические аминокислоты, фенилаланин и тирозин представлены главным образом в составе факторов мозгового слоя надпочечников, но выявляются также и в составе кардиотропного нейrogормона «С».

Величины М_r, скорректированные с помощью аминокислотного анализа, оказались примерно равными для М2, М3₁ и М4₁ факторов (900, 3600 и 3800 Д), которые коррелировали с полученными гель-фильтрацией на сефадексе G-10 данными (1200, 4100 и 4200 Д). Несколько заниженные величины М_r для факторов М2, М3₁ и М4₁ путем коррекции данных его аминокислотного анализа можно объяснить, по-видимому, наличием небелковых, в частности, углеводных групп в молекуле этих соединений. Такое предположение подтвердилось при анализе М3₁ фактора в присутствии стандартных аминсахаров, выявившего наличие глюкозаминов и галактозаминов. Наличие последних свидетельствовало о том, что молекулы этих факторов гликозилированы, чем и обусловлена, по-видимому, в определенной степени их резистентность к воздействию кислот, щелочей и протеолитических ферментов.

Полученные данные позволяют считать, что некоторые из обнаруженных в мозговом слое надпочечников кардиоактивных факторов, в частности М3₁ фактор, являются родственными гипоталамическому нейrogормону «С». Однако относительно абсолютной идентичности можно будет утверждать после полной расшифровки химической структуры названных соединений.

CHARACTERISTICS OF CARDIOACTIVE COMPOUNDS FROM BOVINE ADRENAL MEDULLA

Paronyan Z.Kh., Srapiionyan R.M.,
Abramyan S.S., Grigoryan L.A., Galoyan A.A.

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

Eight coronaro-active compounds inhibiting cAMP PDE were isolated from the bovine adrenal medulla. Their capacity to dilate coronary vessels and to inhibit cAMP PDE was studied as a function of temperature, proteolytic cleavage and pH. The majority of the studied compounds were inactivated under these conditions. Only two substances retained 40—50% of their initial activity and inhibited (75%) cAMP PDE. Glycosylation of these compounds resulting in higher stability could explain the experimental data, specifically partial resistance to proteolysis.

ЛИТЕРАТУРА

1. Галоян А.А., Срапионян Р.М., Саакян С.А. Докл. АН АрмССР, т.56, N2, с.102—105, 1973.
2. Срапионян Р.М., Паронян З.Х., Абрамян С.С., Григорян Л.А., Карапетян Р.О., Галоян А.А. Нейрохимия, т.7, N2, с.61—68, 1988.
3. Галоян А.А., Гурвиц Б.Я., Погосян М.А. Вopr. биохимии мозга, т 11, с. 89-97, Ереван Изд-во АН АрмССР, 1976.
4. Галоян А. А. Вopr. биохимии мозга, т. 8, с. 107—126, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1973.
5. Rösch G., Kukrweitz W. R. Life Sci., v. 10, p. 133—141, 1971.
6. Бериташвили Д. Р., Кафiani К. А. Вopr. мед. химии, т. 21, с. 322—329, 1975.
7. Абеян Ж. Г., Паронян З. Х., Срапионян Р. М. Биол. Журн. Армении, т. 41, N 11, с. 928—931, 1988.
8. Арменян А. Р., Аракелян Л. Н., Паронян З. Х., Абрамян С. С., Срапионян Р. М. Нейрохимия, т. 7, № 2, с. 78—82, 1988.

Поступила 19.03.1989

БЕРЕЗИН В.А., БЕЛИК Я.В. Специфические белки нервной ткани. — Киев: Наук. думка, 1990 (ПН). — 201 с. ил. — ISBN 5-12-001413-5 (в пер.): 4р. 30к.

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 нейрофизиологии 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 591.1.05

ИЗОЛИРОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ БИОСИНТЕЗА ПРОЛИНА МОЗГА КРЫС И ИХ РЕГУЛЯТОРНЫЕ СВОЙСТВА

Манукян И.П., Агаджанян А.Х., *Арутюнян А.В.

Ереванский государственный университет;

**Институт биохимии АН АрмССР, Ереван*

Разработан способ частичной очистки орнитинтрансаминазы и пирролин-5-карбоксилат-редуктазы мозга крыс. Получена орнитинтрансаминаза со степенью очистки 62,5 и с выходом 8,7%. Используя фракционирование на ципокроне (голубая сефароза), удалось получить пирролин-5-карбоксилатредуктазу со степенью очистки 684, с выходом 5,4%. АТФ, п-хлормеркурибензоат, йодацетат и некоторые аминокислоты (аспартат, аспарагин, аланин) заметно ингибируют процесс биосинтеза пролина с участием очищенных орнитинтрансаминазы и пирролин-5-карбоксилатредуктазы. Ингибирующий эффект АТФ значительно ослабевает при функционировании пирролин-5-карбоксилатредуктазы с кофактором NADPH. Мощным ингибитором процесса биосинтеза пролина мозга крыс является NADP.

* * *

Превращение орнитина в пролин через пирролин-5-карбоксилат доказано многочисленными исследованиями, выполненными на инфузориях, молочной железе крыс, дождевом черве, фасольевой зерновке [1—3]. Биосинтез пролина этим путем осуществляется путем последовательного действия двух ферментов — L-орнитин: 2 оксокислота-аминотрансферазы (КФ 2.6.1.13) и 1-пирролин-5-карбоксилат: NAD⁺ - оксидоредуктазы (КФ 2.6.1.13).

Выявлено, что в мозгу мышей аргинин транспортируется внутрь синапсом с дальнейшим превращением в орнитин, служащий предшественником для синтеза ГАМК, глутамата и пролина [4]. Имеются сведения, что активность орнитинтрансаминазы (ОТ) высока в отделах мозга крыс, ответственных за память (кора больших полушарий, гипоталамус, гиппокамп), в то время как значительная активность пирролин-5-карбоксилатредуктазы (П5КР) обнаруживается во всех участках мозга [5].

Имеется ограниченное число работ по выделению и характеристике ОТ и П5КР. Очищена и получена в кристаллическом состоянии ОТ из печени крыс [6], и изучены ее некоторые физико-химические свойства.

Получена также ОТ из пекарских дрожжей со степенью очистки 10 и выходом 7%. Слабыми ингибиторами фермента являются аминокислоты с разветвленной цепью и, в первую очередь, L-валин. K_m для орнитина и α -КГ соответственно равны 12,2 и 6,7 мМ [7].

Очищена П5КР сетчатки глаз быка, кофактором которой являются как NADH, так и NADPH. Фермент ингибируется АТФ [8]. Указанный фермент выделен также из хрусталика глаз крысы и очищен почти до гомогенного состояния [9]. Установлено, что фермент представляет из

себя октомер с величиной M , каждого мономера 30 кД. Ингибитором П5КР из хрусталика глаз крыс являются ионы Hg , Cu , n -хлормеркурибензоат (n -ХМБ), NADP и АТР.

Целью настоящей работы является очистка ферментов биосинтеза пролина (ОТ и П5КР) мозга крыс и изучение их регуляторных свойств.

Материалы и методы

Объектом исследования служили белые крысы линии *Wistar* массой 150—180 г.

Для выявления изоэнзимного спектра ферментов биосинтеза пролина гомогенизировали 4—5 г мозга крыс в 0,1 М калий-фосфатном буфере pH 7,5. Гомогенат центрифугировали при 27000 g в течение 30 мин и надосадочную жидкость после ряда промежуточных этапов обработки подвергали гель-фильтрации на сефадексе G-150.

Активность ОТ и П5КР, а также содержание пролина определялось по методу, описанному нами ранее [10]. При исследовании влияния адениловых нуклеотидов и аминокислот на процесс биосинтеза пролина реакционная смесь (3 мл) содержала 50 мкмоль орнитина, 20 мкмоль α -КГ, 100 мкмоль калий-фосфатного буфера pH 7,4, 1 мкмоль пиридоксаль-5-фосфата, 0,5 мл ферментного препарата, адениловые нуклеотиды — $2 \cdot 10^{-4}$ М, аминокислоты — $2,6 \text{—} 15,6 \cdot 10^{-3}$ М. Содержание белка в пробах определяли по методу Lowry [11].

При определении активности ОТ по количеству образующегося из П5К пролина к препаратам ОТ добавляли фракции, обладающие наибольшей активностью П5КР.

Результаты и обсуждение

Ранее нами сообщалось, что ферменты биосинтеза пролина в основном локализованы в осадке, полученном после центрифугирования гомогената при 27000 g , в то время как в надосадочной фракции обнаруживается менее 20% этой активности [12]. С целью дальнейшей солиubilизации ферментов нами был испытан ряд приемов.

Таблица 1

Влияние различных сред гомогенизации на степень экстракции ферментов биосинтеза пролина (орнитинтрансминаза и пиридоксаль-5-карбоксидатредуктаза) мозга крыс, в мкмоль пролина/г ткани/ч

Условия опыта	Гомогенат	%	Надосадочная жидкость	%	Осадок	%
Калий-фосфатный буфер (0,1М)	$8,52 \pm 0,52$	100	$1,66 \pm 0,10$	19,2	$6,02 \pm 0,51$	70,6
Калий-фосфатный буфер (0,02М) ЭДТА (0,5мМ), глицерин 10% (v/v)	$8,89 \pm 0,52$	100	$4,82 \pm 0,21$	54,2	$3,95 \pm 0,18$	44,4

Наиболее удовлетворительные результаты получаются при применении калий-фосфатного буфера (0,02М), содержащего ЭДТА и глицерин. При этом, как видно из данных, приведенных в табл.1, в растворимой фракции обнаруживается более половины ферментативных активностей (ОТ и П5КР).

Последующими экспериментами удалось доказать, что добавлением к среде ЭДТА и глицерина из осадка гомогената солюбилизируется дополнительное количество идентичных ферментов, не отличающихся поведением при гель-фильтрации на сефадексе G-150. На рис. 1 и 2 показано, что при гель-фильтрации надосадочной жидкости гомогената, приготовленного на 0,1 М калий-фосфатном буфере, также как и экстракта осадка, полученного добавлением к среде ЭДТА и глицерина, проявляются по одному пику активности ОТ (максимальная активность во фракциях 6,7). Характерно, что активность П5КР осадка значительно превышает ОТ активность, тогда как в растворимой фракции отмечается обратная закономерность, что указывает на то, что П5КР в отличие от ОТ является преимущественно партикулярным ферментом.

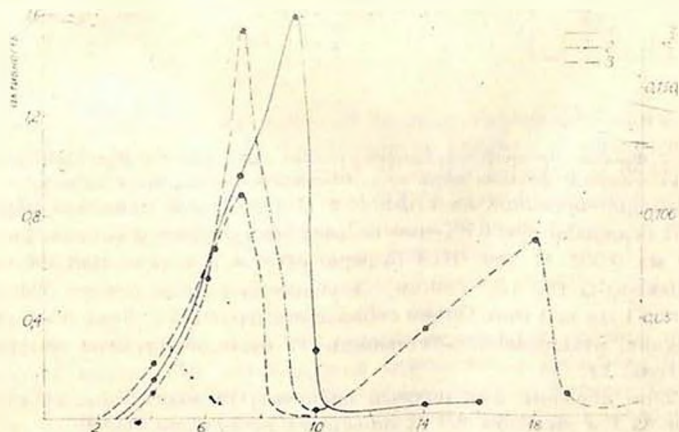


Рис. 1. Фракционирование орнитинотрансминазы и пирролин-5-карбоксилатредуктазы надосадочной жидкости мозга крыс на сефадексе G-150. 1—активность орнитинотрансминазы; 2—активность пирролин-5-карбоксилатредуктазы; 3—белок. По оси ординат слева—содержание пролина в мкмоль/мг белка/ч.; справа—содержание белка. По оси абсцисс—номера фракций

В дальнейшем мы осуществляли очистку указанных ферментов.

Очистка ОТ мозга крыс. Очистка ОТ осуществлена с использованием следующих процедур, выполненных при 0—4° (табл.2).

Экстракция фермента. 4-5 г мозга гомогенизировали в 15 мл 0,1М калий-фосфатного буфера pH 7,5, и гомогенат центрифугировали при 27000g, в течение 30 минут.

Высаливание сульфатом аммония. Активность фермента сосредотачивалась в осадке, полученном в интервале насыщения 50-60%. При этом, в результате удаления балластных белков, У.А. повышалась более чем в 3 раза.

Диализ и термообработка. Препарат подвергали диализу в течение ночи против 0,1 М калий-фосфатного буфера pH 7,5. Белковый осадок удаляли центрифугированием при 12000g в течение 10 мин, а надосадочную жидкость (7 мл) обрабатывали 1 мин в присутствии 50 мкг пиридоксаль-5-фосфата и 5 мкМ α -КГ при 60°. При этом У.А. фермента увеличивалась почти вдвое.

Рис. 2. Фракционирование орнитинтрансаминазы и пирролин-5-карбоксилатредуктазы из осадочной фракции мозга крыс. Обозначения те же, что и на рис. 1.

Фракционирование на сефадексе G-150. После тепловой обработки фермент осаждали при 65%-ном насыщении сульфата аммония, растворяли в 3 мл 0,005 М трис-HCl буфера, pH 7,4 и переносили на колонку с сефадексом G-150 (2,5×40 см). Элюцию проводили тем же буфером со скоростью 1 мл за 3 мин. Объем собираемых фракций— 5 мл, было собрано 21 фракция, максимальная активность ОТ была обнаружена во фракциях 8 и 9 (рис. 1).

Таким образом, был получен препарат ОТ мозга крыс со степенью очистки 62,5 и выходом 8,7%, лишенной активности П5КР.

Очистка П5КР мозга крыс. Очистка П5КР осуществлена следующими этапами при температуре 22°.

Экстракция фермента. 4—5 г мозга гомогенизировали в 15 мл 0,02М калий-фосфатного буфера pH 7,4, содержащего 0,5 мМ ЭДТА и 10%-ный глицерин (V/V) и центрифугировали при 12000 g в течение 30 мин.

Фракционирование на голубой сефарозе (Cibachron blue). Для этого фермент предварительно осаждали сульфатом аммония в интервале 60—80%. При 60%-ном насыщении суспензию выдерживали 1 ч на магнитной мешалке, после чего осадок удаляли центрифугированием, насыщение надосадочной жидкости доводили до 80% и выдерживали опять на магнитной мешалке 1 ч. Полученный осадок растворяли в минимальном количестве 0,02 М калий-фосфатного буфера pH 7,4, содержащего 0,5 мМ ЭДТА и 10%-ный глицерин, и переносили на колонку с голубой сефарозой (1 × 20 см), уравновешенную 0,02 М калий-фосфатным буфером pH 7,4,

содержащим 0,5 мМ ЭДТА и 10%-ный глицерин. Элюцию проводили 0,02М калий-фосфатным буфером pH 7,4 со скоростью 0,5 мл/мин. Были собраны 20 фракций по 3 мл. В результате удалось повысить активность фермента почти в 35 раз.

Таблица 2

Очистка орнитинтрансаминазы мозга крыс

Этапы очистки	Общий белок (мг)	Общая активность (мкмоль пролина/ч)	У.А. (мкмоль пролина/мг белка/ч)	Выход фермента (%)	Степень очистки
Гомогенат	54,1	8,62	0,15	100	
Надосадочная жидкость, полученная при центрифугировании гомогената при 27000 g	15,3	5,84	0,38	67,7	2,53
Высаливание 50-65% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,24	2,85	1,27	33,0	8,46
Тепловая обработка при 60°	1,21	2,98	2,46	34,5	16,4
Высаливание 65% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и фракционирование на сефадексе G-150 (фракции 8 и 9)	0,08	0,75	9,37	8,7	62,5

Фракционирование на сефадексе G-150. Активные фракции с колонки с ципокроном (фракции 5,6) переносили на колонку с сефадексом G-150 (2,5 × 40 см), уравновешенную 0,02 М калий-фосфатным буфером (pH 7,4), содержащим 0,2 М KCl и 0,5 мМ ЭДТА. Элюцию проводили этим же буфером со скоростью 0,35 мл/мин. Собрана 21 фракция, объем каждой — 5 мл. П5КР выходила в основном во фракциях 6, 7 (рис. 1).

Из данных табл. 3 следует, что получена П5КР мозга крыс со степенью очистки 684 и выходом 5,4%.

Ранее нами сообщалось, что процесс биосинтеза пролина на уровне гомогената мозга крыс ингибируется адениловыми нуклеотидами (АТР, АДР, АМР) [12]. Ингибирующий эффект АТР на процесс биосинтеза пролина был значительно более выражен, если в качестве кофактора П5КР использовали NADH, а не NADPH. Аналогичное влияние на активность фермента оказывали аспартат, аспарагин, α-аланин. Ингибирующий эффект последних сохранялся также, когда в инкубационную среду вносили кетокислоты, трансаминирование или реаминирование которых приводило к синтезу указанных аминокислот (в частности пируват, оксалоацетат или пируват с сульфатом аммония).

Интересно было выяснить, каково влияние указанных соединений на очищенные ОТ и П5КР, изолированные из надосадочной фракции мозга крыс. Полученные экспериментальные данные, приведенные на рис. 3 а, б, свидетельствуют о том, что влияние АТР и аминокислот (аспартат, аспарагин и α-аланин) на очищенные ферменты биосинтеза пролина аналогично ингибированию фермента на уровне гомогената мозга крыс. Характерно, что в отличие от экспериментов, проведенных на гомогенатах мозга, АМР и АДР не оказывали влияния на биосинтез пролина при участии очищен-

ных ОТ и ПСКР. Из этого следует заключить, что наблюдаемое при использовании гомогенатов ингибирование процесса в присутствии АМР и АДР, вероятно, обусловлено их фосфорилированием с образованием АТР.

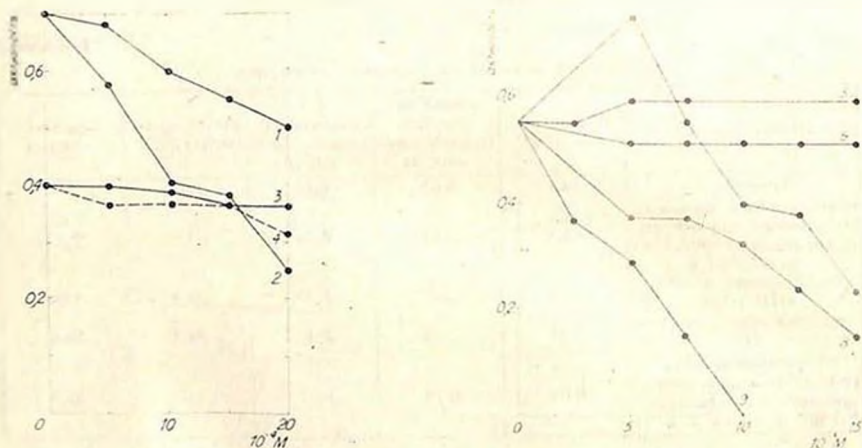


Рис. 3. Влияние адениннуклеотидов (а) и некоторых аминокислот (б) на биосинтез пролина при использовании частично очищенных препаратов орнитинтрансминазы и пирролин-5-карбоксилатредуктазы. 1 — АТР (кофактор NADPH), 2 — АТР (кофактор NADH), 3 — АДР, 4 — АМР, 5 — β -аланин, 6 — серин, 7 — аспарагин, 8 — аспарат, 9 — α -аланин. По оси абсцисс — концентрация ингибитора, по оси ординат — содержание пролина (мкмоль/мг белка/ч)

Очистка пирролин-5-карбоксилатредуктазы мозга крыс

Таблица 3

Этапы	Общий белок (мг)	Общая активность (мкмоль пролина/мг, ч)	Удельная активность (мкмоль пролина/белка/ч)	Выход фермента (%)	Степень очистки
Гомогенат	61,2	12,1	0,19	100	
Надосадоочная жидкость	18,3	7,0	0,38	57,8	2
Высаливание (NH_4), SO_4 при 60-80%-ном насыщении	7,1	3,3	0,46	27,2	2,4
Фракционирование на циклокроне (фракции 5,6)	0,25	1,7	7,0	14,4	36,8
Фракционирование на сефадексе G-150 (фракции 6,7)	0,005	0,65	130	5,4	684

Ингибирование процесса биосинтеза пролина АТР, очевидно, имеет важное значение в регуляции балансирования процессов энергообразования и биосинтеза пролина. Не исключено, что в условиях максимального биосинтеза, АТР, когда насыщается электронно-транспортная система митохондрий, накапливается NADH и создаются оптимальные условия для

биосинтеза пролина. Можно полагать, что с целью предотвращения избыточного биосинтеза пролина в указанных условиях процесс ингибируется АТР.

Изучено влияние *n*-ХМБ и йодацетата на процесс биосинтеза пролина с использованием очищенных ОТ и П5КР (табл. 4). Показано, что *n*-ХМБ и йодацетат ингибируют процесс биосинтеза пролина очищенными ферментами мозга крыс, что свидетельствует о тиоловом характере мозговой П5КР, по аналогии с ферментом из хрусталика глаза [13].

Таблица 4

Влияние *n*-хлормеркурибензоата (*n*-ХМБ) и йодацетата на процесс биосинтеза пролина в мозгу крыс (кофактор пирролин-5-карбоксилатредуктаза — NADH; $n=5$)

Ингибитор	Концентрация 10^{-4} М	Активность (мкмоль/пробу)	Ингибирование (%)
Без ингибитора		0,37	0
<i>n</i> -ХМБ	1,72	$0,21 \pm 0,05$	43,3
	3,43	$0,18 \pm 0,05$	51,4
	6,86	$0,10 \pm 0,025$	73,0
	10,2	$0,09 \pm 0,025$	75,7
	17,1	$0,09 \pm 0,03$	75,7
	34,3	0	100
Йодацетат	1,72	$0,75 \pm 0,14$	33,1
	3,43	$0,61 \pm 0,08$	45,5
	6,86	$0,61 \pm 0,10$	45,5
	10,2	$0,54 \pm 0,09$	51,8
	17,1	$0,54 \pm 0,09$	51,8
	34,3	$0,33 \pm 0,05$	70,5

Так же, как и на уровне гомогената, при использовании частично очищенных ферментов биосинтеза пролина нами установлено сравнительно слабое ингибирование активности П5КР под влиянием АТР (рис. 3, а) и других испытанных нами соединений при функционировании в качестве кофактора фермента NADPH по сравнению с NADH.

Таблица 5

Влияние окисленных нуклеотидов на процесс биосинтеза пролина (мкмоль/пробу)

Окисленный нуклеотид	Кофакторы пирролин-5-карбоксилатредуктазы	
	NADH	NADPH
NAD	$0,40 \pm 0,04$	$0,25 \pm 0,03$
NADP	$0,25 \pm 0,03$	$0,10 \pm 0,05$
	0	0

Окисленные коферменты (NAD и NADP), добавленные в эквимольных с восстановленным NADP концентрациях (по 4 мкМ), вызывали выраженное ингибирование П5КР, конкурируя с NADPH, причем NAD в этом отношении значительно уступал NADP (табл. 5). Эти данные находятся в полном соответствии с результатами исследований, выполненных на дождевом черве, фасолевой зерновке и молочной железе крыс [1, 13], а также данным литературы, касающимся активности П5КР в гомогенате листьев сои [14] и очищенного до гомогенного состояния фермента из хрусталика глаз крысы [9]. По данным Shiono и соавт. [9], окисленный NAD, в отличие от NADP, на П5КР хрусталика глаза ингибирующего эффекта почти не оказывает. Проведенный при этом кинетический анализ

позволил заключить, что NADP ингибирует активность фермента конкурентным механизмом. Другими исследователями, наоборот, было показано, что NADP оказывает неконкурентное ингибирование П5КР печени крыс [15].

THE ISOLATION OF PROLINE BIOSYNTHESIS ENZYMES FROM RAT BRAIN AND THEIR REGULATORY PROPERTIES

Manukyan I. P., Agadzanyan A. Ch., *Haroutunian A. V.

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

The enzymes of proline biosynthesis ornithine transaminase and pyrroline-5-carboxylate reductase were partially purified from rat brain. The enzymes isolated had degree of purification 62,5 and 684, and yeld 8,7 and 5,4% correspondingly.

It is shown that proline biosynthesis by purified enzyme preparations markedly inhibited by thiol reagents, ATP and some aminoacids (aspartate, asparagine and alanin). The inhibitory action of ATP sufficiently decreased by use of NADPH as coenzyme of pyrroline-5-carboxylate reductase. Oxidized nicotinamide adenine nucleotides, especially NADP, are effective inhibitors of proline biosynthesis, competetive to NADPH.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арутюнян Л. М. О взаимосвязи аргиназы и биосинтеза пролина в различных органах крыс, Автореф. канд. дис., Ереван, 1984.
2. Арутюнян Л. М., Агаджанян А. Х., Биол. журн. Армении, т.34, с.176—182, 1981.
3. Заробян Т. Я., Агаджанян А. Х., Давтян М. А. Биол. журн.Армении, т.29, с. 44—50, 1976.
4. Johnson J. L., Roberts E. S. Neurochem., v. 42, p.1123—1126, 1984.
5. Hersfeld A., Mezl V. A., Knox W. E. Biochem. J., v. 166, p. 95—103, 1977.
6. Strecker H. J. J. Biol. Chem., v. 240, p.1225—1230, 1965.
7. Matsuzawa T., Wakatsuki T. Vitamins (Japan), v.52, p.7—10, 1977.
8. Mutsuzawa T. Biochem. Biophys. Acta, v.717, p. 215—219, 1982.
9. Shiono T., Kador P. F., Kinoshita J. J. Biochem. Biophys. Acta, v. 881, p. 72—78, 1986.
10. Агаджанян А. Х. Биол. журн. Армении, т. 37, с.40—50, 1985.
11. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. T. J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
12. Манукян И. П., Агаджанян А. Х., Арутюнян А. В. Нейрохимия, т. 6, с. 384—389, 1987.
13. Гаспарян Х. Г. Изoenзимы аргиназы и биосинтеза пролина у дождевого червя *Lumbricus terrestris*, канд. дис., Ереван, 1983.
14. Miller R. M., Stewart R. Phytochemistry, v. 15, p. 1855—1957, 1976.
15. Smith M. E., Greenberg D. M. J. Biol. Chem., v. 226, p. 317—327, 1957.

Поступила 10.06.1989

УДК 577. 15:612.82:612.014.1

СВОЙСТВА МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ КРЕАТИНКИНАЗЫ МОЗГА ПРИ ИЗМЕНЕНИИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С МИТОХОНДРИАЛЬНЫМИ МЕМБРАНАМИ

Хватова Е. М., Семенова Т. С., Якобсон Л. И.

Горьковский медицинский институт им. С. М. Кирова

Креатинфосфокиназа в митохондриях мозга находится в растворимом и мембраносвязанном состоянии. Активность ее распределена поровну между мембранами и межмембранным пространством. Под действием электролитов (NaCl, фосфатного буфера, ADP) с ионной силой от 0,1 до 1,75 теряет связь с мембраной 45% адсорбированного на ней фермента. Эффективность солюбилизации мембранной креатинкиназы зависит не только от ионной силы электролита, но и его природы. Стабильная активность креатинкиназы на мембранах достигается повторной обработкой электролитами.

Солюбилизованная креатинкиназа не утрачивает способности вновь восстанавливать связь с мембраной.

Взаимодействие фермента с мембранами митохондрий изменяет его кинетические свойства, снижая максимальную скорость образования креатина АТР, что может указывать на возможность регуляции фермента в естественных условиях за счет изменения связи с мембранами.

* * *

Согласно современным представлениям, центральная роль в регуляции окислительного фосфорилирования и передаче энергии от митохондрий к местам ее потребления принадлежит креатинкиназе [1—3].

Представляется важным изучение свойств митохондриальной креатинкиназы мозга. Для мозговой ткани характерна высокая скорость окислительных процессов и полная зависимость функции нервных клеток от синтеза и доставки АТР. Анализ данных, накопленных к настоящему времени, свидетельствует о том, что свойства митохондриальной креатинкиназы мозга изучены недостаточно. До сих пор среди исследователей нет единого мнения по вопросу о сходстве и различии свойств митохондриального изофермента в мозгу и сердечной мышце [4, 5].

Если для сердечной мышцы природа электростатического взаимодействия креатинкиназы с митохондриальными мембранами считается выясненной [6], то для мозга сведения о характере взаимодействия фермента со структурами митохондрий весьма отрывочны [1, 7, 8].

В проблеме митохондриальной креатинкиназы интерес представляет изучение влияния митохондриальных мембран на кинетические свойства фермента. В исследованиях Липской и соавт. [6] показано, что взаимодействие митохондриальной креатинкиназы сердца с мембранами митохондрий изменяет сродство фермента к субстрату и максимальную скорость реакции. Для митохондриальной креатинкиназы нервной ткани подобные сведения отсутствуют.

Целью настоящей работы было изучение условий солюбилизации и обратной адсорбции митохондриальной креатинкиназы мозга, оценка кинетических свойств ферментов в зависимости от взаимодействия с мембранами митохондрий.

Материалы и методы

Митохондрии мозга беспородных крыс-самцов выделяли методом дифференциального центрифугирования [9]. Митохондриальную фракцию трижды промывали, чтобы удалить цитоплазматические примеси и суспендировали в среде выделения. Наружную мембрану митохондрий мозга нарушали гипотонической обработкой [6] с последующим осаждением мембран центрифугированием (10000 g в течение 15 мин).

Экстракцию креатинкиназы из митохондрий, лишенных наружной мембраны (митопластов), проводили растворами NaCl, K^+ , Na^+ — фосфатным буфером, ADP с различной ионной силой в пределах 0,1—1,75.

После 20-минутной инкубации митопластов с электролитом, центрифугированием (100000 g, 15 мин) разделяли растворимую (солюбилизат) и мембранную (осадок) фракции креатинкиназы. Способность креатинкиназы к солюбилизации под действием электролитов оценивали по распределению активности фермента в осадке и супернатанте. Солюбилизацию митохондриальной креатинкиназы электролитом повторяли до постоянной активности фермента в осадке.

Для оценки способности креатинкиназы к повторной адсорбции на мембранах митохондрий, последние обрабатывали 0,2 M раствором NaCl до постоянной креатинкиназной активности. Митохондриальный солюбилизат, содержащий креатинкиназу, диализировали против раствора 0,25 M сахарозы, содержащей 0,1 M дитиотрейтола. Мембраны суспендировали в солюбилизате, поддерживая соотношение белка солюбилизат : мембраны, равное 10:1 и после 20-минутной инкубации центрифугировали при 100000 g, 15 мин. По разности креатинкиназной активности в мембранной фракции до и после ее инкубации с митохондриальным экстрактом, судили о способности фермента повторно ассоциировать с мембранами.

Определение креатинкиназной активности проводили по скорости образования креатина модифицированным [11] методом Еппог [12]. Начальные скорости обратной креатинкиназной реакции исследовали в условиях стационарной кинетики. Концентрация Mg-ADP была насыщающей (2,0 mM) и постоянной. Активность фермента выражали в мкмоль креатина на мг белка в мин.

Результаты и обсуждение

Гипотоническая обработка, вызывая нарушение целостности наружной мембраны митохондрий, сама по себе не экстрагирует креатинкиназу [8]. Инкубация митохондрий мозга в воде и последующее центрифугирование показали, что в осадке митохондриальных мембран активность креатинкиназы равна $2,89 \pm 0,31$ мкМ/мг белка в мин, что составляет 46% от остальной креатинкиназной активности митохондрий (6,24 мкмоль/мг

белка в мин). Остальные 54% активности связаны с растворимой фракцией фермента. Практически равное распределение активности фермента между мембранной и жидкой фракциями митохондрий позволяет предположить, что в физиологических условиях только часть креатинкиназы мозга связана с мембранами митохондрий, а другая — находится в свободном состоянии в межмембранном пространстве.

Под влиянием однократного действия фосфатного буфера с ионной силой 0,1 дополнительно теряет связь с мембраной 25% адсорбированной креатинкиназы (табл. 1). С нарастанием ионной силы фосфатного буфера солиubilизация креатинкиназы увеличивается. При максимальной ионной силе фосфатного буфера (1,75) митохондриальные мембраны теряют более 40% активности фермента. Такой же солиubilизирующий эффект достигается при действии на мембраны электролитов другой природы (NaCl и ADP) с меньшей ионной силой — 0,2—0,3.

Таблица 1

Креатинкиназная активность в мембранной фракции митохондрий мозга после действия электролитов с различной ионной силой ($n=6$)

Солиubilизирующий эффект	Активность (%)
Контроль (H ₂ O)	100
K ⁺ Na ⁺ - фосфатный буфер (M)	
0,1	75
0,7	66
1,75	58
NaCl (0,2M)	58
ADP (0,3M)	58

Из полученных результатов следует, что эффективность солиubilизации мембраносвязанной креатинкиназы мозга зависит не только от ионной силы электролита, но и его природы.

Таблица 2

Эффективность солиubilизации митохондриальной креатинкиназы при повторной обработке мембран фосфатным буфером ($n=5$)

Условия опыта	Активность (%)
Контроль (H ₂ O)	100
0,1 M фосфатный буфер	
1-кратная обработка	75
2-кратная обработка	68
3-кратная обработка	56
4-кратная обработка	56
0,7 M фосфатный буфер	
2-кратная обработка	66
3-кратная обработка	55
1,75 M фосфатный буфер	
2-кратная обработка	55
	56

Изучено повторное действие электролитов на солиubilизацию креатинкиназы (табл. 2). При повторном действии фосфатного буфера с ионной силой 0,1 максимальная солиubilизация фермента и постоянство его активности на мембранах достигается после 3-кратной обработки. С повышением ионной силы фосфатного буфера от 0,7 до 1,75 тот же результат достигается после двух- и однократного его действия соответственно. Следовательно, конечный результат солиubilизирующего действия электролита может достигаться изменением ионной силы или повтор-

ностью его действия.

Сравнительная оценка эффективности солюбилизирующего действия ADP, NaCl и фосфатного буфера на креатинкиназу из митохондрий мозга и сердца показала, что в мозгу максимально солюбилизируется до 40% адсорбированной креатинкиназы, тогда как в сердце при однократном действии перечисленных выше электролитов с ионной силой в пределах 0,02—0,1 с мембран солюбилизируется более 90% активности мембраносвязанного фермента [8]. Это позволяет предположить, что неэлектростатические взаимодействия креатинкиназы с мембранами митохондрий в мозгу составляют большую долю, чем в сердце.

Инкубация митохондриального экстракта, содержащего креатинкиназу с фракцией отмытых электролитом мембран повышает в последних активность креатинкиназы более чем на 30% (табл. 3). Эта величина активности адсорбированного фермента не имеет достоверных отличий от

Таблица 3

Повторная адсорбция митохондриальной креатинкиназы на митохондриальных мембранах (n = 5)

Условия опыта	Активность креатинкиназы (в мкмоль креатината / мг белка / мин)
Митохондриальные мембраны (MM), обработанные H ₂ O	2,90 ± 0,03
MM, обработанные 0,2 M NaCl	1,82 ± 0,02
MM после инкубации с солюбилизатором	2,55 ± 0,05

активности креатинкиназы в мембранах, обработанных водой. Заметный прирост активности в мембранах и приближение ее к исходному уровню свидетельствуют об отсутствии необратимых изменений митохондриальной креатинкиназы при ее солюбилизации.

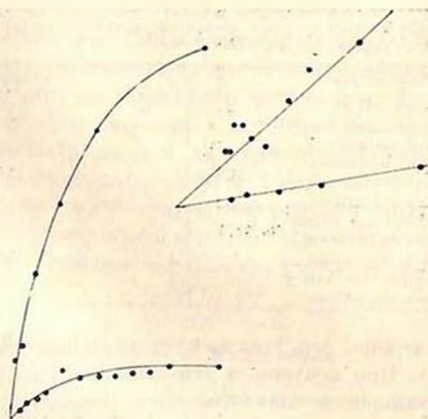


Рис. Кинетика креатинкиназной реакции в прямых и обратных величинах (n=7); 1 — в экстракте из митохондрий, 2 — в препарате митохондриальных мембран

Изучена кинетика креатинкиназной реакции в осадке митохондриальных мембран и в солюбилизате из митохондрий. У митохондриальной креатинкиназы, связанной с мембранной фракцией, зависимость начальной скорости реакции от концентрации креатинфосфата подчиняется уравнению Михаэлиса-Ментен (рисунок). Найденная в координатах Лайнуивера-Берка константа Михаэлиса по креатинфосфату равна 1,0 мМ. Средняя величина константы сродства, полученная из 4 опытов вполне удовлетворительна, поскольку показатель точности определения равен 3,6% [15].

При переходе митохондриальной креатинкиназы в растворимое состояние сохраняется классический тип кинетики для креатинфосфата. Отличительным признаком солюбилизованного фермента является увеличение максимальной скорости реакции при неизменном сродстве фермента к субстрату (рисунок). Наличие двух кинетически различных форм креатинкиназы, отличающихся по активности, показано также на митохондриальной креатинкиназе из сердечной мышцы [6]. Максимальная скорость митохондриальной креатинкиназы, связанной с мембранами, по данным авторов, составляет только половину максимальной скорости в экстракте [6]. По мнению ряда исследователей [16—18], регуляция митохондриальной креатинкиназы может осуществляться через изменение соотношения ди-, гексо- и октомеров. Олигомеризация молекулярных форм фермента сопровождается снижением ее активности [19], однако молекулярная природа этого явления требует дополнительного исследования.

Таким образом, полученные результаты показывают, что креатинкиназа в митохондриях мозга находится в свободном и связанном состояниях. Активность фермента в растворимой и мембранной фракциях после гипотонической обработки митохондрий распределена поровну.

Под влиянием ионной силы электролитов различной природы с мембранами теряет связь дополнительно еще половина адсорбированной на них креатинкиназы. Эффективность солюбилизации зависит от ионной силы электролитов и его природы. Оставшаяся на мембранах креатинкиназа не чувствительна к солюбилизирующему действию испытанных электролитов.

Взаимодействие с мембранами изменяет кинетические свойства креатинкиназы, снижая максимальную скорость обратной реакции.

Существование митохондриальной креатинкиназы в двух взаимобратимых состояниях, отличающихся по кинетическим свойствам, указывает на реальную возможность регуляции ее активности за счет структурных компонентов клетки.

THE BRAIN MITOCHONDRIAL CREATINEKINASE

Khvatova E.M., Semenova T.S., Yakobson L.I.

Kirov Medical Institute, Gorky

Solubilization of creatine kinase and its bindig with mitochondrial membranes in phosphate buffer solutions of various ionic strength was studied. Rat brain creatine kinase is found in the soluble and membrane-bound forms in equal proportion. Enzyme dissociation from membranes depends on ionic

strength and number of treatment cycles with the solubilization medium. Full restoration of the creatine kinase ability to bind with membrane testifies to the absence of solubilization-induced irreversible changes of the enzyme. Interaction with membrane alters kinetic properties of the enzyme lowering the maximal rate of creatine and ATP formation. The existence of two mutually convertible states of rat brain creatine kinase points out to a possibility of the enzyme control through its binding with membranes in the cell.

ЛИТЕРАТУРА

1. Jacobus W.E., Lehninger A.Z. J. Biol. Chem., v.248, p.4803—4810, 1973.
2. Сакс В.А. Успехи биол. химии, т.23, с.40—64, 1983.
3. Jacobus W.E. Ann. Rev. Physiol., v.47, p.707—725, 1985.
4. Watts D.C. In the Enzymes (ed. F.D. Boyer), v.8, p.383—455, Acad. Press, N.Y., 1973.
5. Weves R.A. Reuteligreger C.P.M., Dam B. Clin. Chim. acta, v.119, p.209—223, 1982.
6. Липская Т.Ю., Молокова Е.В. -В кн.: Биохимия и биофизика мышц (под ред. С.Е. Северина), с.118—129, М., Наука, 1983.
7. Swanson P.D. J. Neurochem., v.14, p.343, 1967.
8. Lapin E.P., Maker H.S., Lehrer G.M. J. Neurochem., v.23, p.465—469, 1974.
9. Fonye A., Somogyi J. Acta Physiol. Acad. Sciens Hung., v.18, N3, p.191—198, 1960.
10. Sacs V.A., Chernusova G.B., Voroncov J.J., Smirnov N., Chazov E. Circ Res., suppl.111, v.34, p.138—149, 1974.
11. Ennor A.N., Morrison I.R. Physiol. Acad. Sciens Hung., v.38, p.613, 1958.
12. Лызлова С.Н., Тааме Н., Стефанов В.Е., Южкова Т.А. -В кн.: Структурные основы и регуляция биологической подвижности, с.108, 1980.
13. Booth F.J., Clarc J.B. Biol. J., v.170, N1, p.145—151, 1978.
14. Липская Т.Ю., Белоусова А.В. Биохимия, т.45, вып.7, с.1155—1164, 1980.
15. Корниш-Боуден Э. -В кн.: Основы ферментативной кинетики, с.251, 1979.
16. Липская Т.Ю., Кедишвили Н.Ю., Каленоса М.Е. Биохимия, т.50, вып.10, с.1571—1581, 1985.
17. Marcillat O., Goldshmidt D. Biochim. et biophys. acta: Bioenergetics, v.890, N2, p.233—241, 1987.
18. Hall N., Addis P., Deluco M. Biochem. et Biophys. Res. Commun., v.76, p.950—956, 1977.
19. Федосов С.Н., Белоусова А.В. Биохимия, т.54, вып.1, с.54—67, 1989.

Поступила 24.02.1989

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 577. 152. 24

(ADP-РИБОЗА)ПОЛИМЕРАЗА ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС:
ВЫДЕЛЕНИЕ И СВОЙСТВА

Заалишвили Т. М., Сабелашвили Д. Ш.

Институт молекулярной биологии и биологической
физики АН ГССР, Тбилиси

В эукариотической клетке ядерный фермент поли (ADP-рибоза) полимеразы, субстратом которой является NAD, ковалентно модифицирует различные белки [1, 2]. Изучение NAD-зависимого ADP-рибозилирования макромолекул и функционального значения данного процесса в последнее время выдвинулось в число интенсивно разрабатываемых научных проблем. Накопленные в литературе данные указывают на участие обратимой посттрансляционной модификации белков путем ADP-рибозилирования в клеточной пролиферации, дифференцировке, репарации ДНК и т.д. [2]. Изучение закономерностей функционирования очищенной (ADP-рибоза)полимеразы *in vitro* несомненно окажет значительное влияние на установление ее биологической функции.

(ADP-рибоза)полимераза выделена из различных органов, однако методика очистки фермента из нервной ткани в доступной нам литературе не встречалась. Ранее нами был предложен метод очистки поли (ADP-рибоза)полимеразы из неочищенных ядер головного мозга крыс [3].

Целью настоящей работы были разработка более простого и доступного метода получения (ADP-рибоза)полимеразы из очищенных ядер головного мозга крыс, позволяющего получить ферментный препарат за короткий период времени, и изучение некоторых его свойств.

(ADP-рибоза)полимеразную активность определяли в среде, содержащей: 50 mM трис-HCl (pH 8,0), 20 mM $MgCl_2$, 50 mM NaCl, 5mM β -меркаптоэтанол, 0,9 nM $[^{14}C]NAD$ (280 мКи/мм), по 40 мкг ДНК и тотального гистона тимуса теленка и препарат фермента [3, 4]. Конечный объем реакционной среды был равен 0,4 мл. Инкубацию проб проводили при 25° в течение 10 мин. Реакцию останавливали охлаждением и одновременным добавлением 10-кратного объема 10%-ной ТХУ. Кислотонерастворимый осадок собирали на стеклянные фильтры GF/C («Whatman», Англия) и промывали холодной 10%-ной ТХУ и 95%-ным этиловым спиртом. Радиоактивность измеряли в жидкостном сцинтилляционном счетчике SL-4000 («Intertechnique», Франция) в толуоле, содержащем 0,5% PPO и 0,03% POPOP.

Метилирование ДНК тимуса теленка проводили в 5 mM трис-HCl (pH 7,4), 0,4 мкг ДНК/мл инкубировали с 1 mM диметилсульфатом в течение 1 ч при 25°, после чего ДНК осаждали этиловым спиртом. Осадок ДНК растворяли в 5 mM трис-HCl (pH 7,4) и диализовали против этого же

буфера.

Апуриновую ДНК получали инкубированием раствора ДНК в 0.1 н. HCl при 60° в течение 25 мин.

Денатурацию ДНК проводили путем обработки в 5 мМ трис-HCl (pH 7.4) при 98° в течение 5 мин и последующим быстрым охлаждением [7].

Белок определяли по модифицированному методу Lowry [5] и по Bradford [6], а ДНК спектрофотометрически и по Burton [7].

Для получения ДНК-агарозного геля использовали процедуру, описанную Bendich, Bolton [8].

Ядра из цельного головного мозга крыс массой 120 — 150 г выделяли методом Chauveau и соавт. [9].

Все растворы содержали фенилметилсульфонилфторид в концентрации 0.1 мМ. pH буферных растворов доводили при 25°. Все процедуры проводили при 2—4°.

(ADP-рибоза)полимеразу экстрагировали добавлением к ядерному препарату буферного раствора, содержащего 50 мМ трис-HCl (pH 7.6), 0.35M NaCl, 1 мМ β-меркаптоэтанол, 1 мМ NaN₃ (буфер А), и постоянным перемешиванием в течение 40 мин. Суспензию центрифугировали при 15000g в течение 30 мин. Надосадочную жидкость использовали для аффинной хроматографии на колонке ДНК-агарозы (1.2 × 5 см), которая содержала 8 мг ДНК. Для удаления нуклеиновых кислот экстракт ядер наносили со скоростью 20 мл/ч на колонку ДЭАЭ-ц (2 × 4 см), которая была уравновешена буфером А, содержащим 0.3 М NaCl. К колонке с ДЭАЭ-ц была непосредственно присоединена колонка с ДНК-агарозой, куда поступал элюат с первой колонки для дальнейшей аффинной хроматографии. Колонка ДНК-агарозы была также уравновешена буфером А, содержащим 0.3 М NaCl. Белки, связавшиеся с ДНК-агарозой, элюировали буфером А, содержащим 1 М NaCl, порциями по 1 мл. Фракции, обладающие поли(ADP-рибоза)полимеразной активностью, объединяли и анализировали против буферного раствора А, содержащего 0.2 М NaCl.

Таблица 1

Очистка (ADP-рибоза) полимеразы головного мозга крыс

Стадия очистки	Количество белка (мг)	Активность		Степень очистки	Выход, %
		общая, ед.	удельная, ед./мг белка		
0.35 М NaCl экстракт очищенных ядер	35	665	19	1	100
Хроматография на ДНК-агарозе	0.96	184	192	10.1	27.7
Хроматография на гелевой сепарации Cl-6B	0.032	74.6	2330	123	11.2

Примечание. *За единицу ферментативной активности принимали включение 1 пмоль NAD в кислотонерастворимый материал за 1 мин.

Как видно из табл. 1, где представлены результаты, полученные в процессе очистки (ADP-рибоза)полимеразы, после хроматографии на колонке ДНК-агарозы удельная ферментативная активность возрастает в 10.1 раз, а выход фермента по активности составляет 27.7 % по

сравнению с ядерным экстрактом.

Для дальнейшей очистки (ADP-рибоза)полимеразы диализат наносили со скоростью 10 мл/ч на колонку голубой сефарозы CL-6B ($1,2 \times 3$ см), уравновешенную буферным раствором А, содержащим 0,2 М NaCl. (ADP-рибоза)полимеразу элюировали с колонки буферным раствором А, содержащим 1 М NaCl, порциями по 0,5 мл. На этой стадии удельная полимеразная активность возрастает в 123 раза, а выход фермента составляет 11,2%.

На рисунке представлено влияние ионов магния (а) и спермина (б) на (ADP-рибоза)полимеразную активность. $MgCl_2$ при концентрации 10—20 мМ стимулирует (ADP-рибоза)полимеразную активность приблизительно в 3 раза, тогда как спермин при оптимальных концентрациях (2,5—5 мМ) активирует фермент приблизительно на 150%. Как видно из рисунка, (ADP-рибоза)полимераза проявляет достаточно высокую активность и в отсутствие в реакционной среде катионов, что говорит о том, что они не являются необходимыми компонентами для функционирования полимеразы.

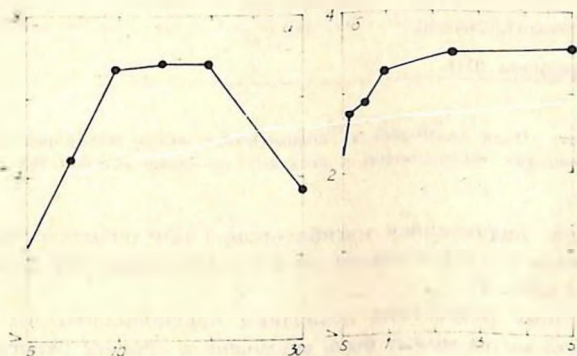


Рис. Влияние концентрации $MgCl_2$ (а) и спермина (S, мМ) (б) на (ADP-рибоза)полимеразную активность (V, включение $[^{14}C]NAD$ имп/мин $\cdot 10^{-3}$)

(ADP-рибоза)полимераза проявляет оптимум действия при pH 8,0—8,5 и температуре 25° (данные не представлены).

Хранение при 4° очищенной поли(ADP-рибоза)полимеразы в течение недели приводит к понижению ферментативной активности приблизительно на 40%.

Поскольку (ADP-рибоза)полимераза ассоциирована в ядре с хроматином [1,2], представляло определенный интерес исследовать влияние различных форм ДНК и гистонов на (ADP-рибоза)полимеразную активность. Как видно из табл. 2, без внесения в реакционную среду ДНК тимуса телят, полимераза не проявляет активности, тогда как суммарная фракция гистонов тимуса телят частично стимулирует фермент. Денатурированная и метилированная ДНК стимулируют поли(ADP-рибоза)полимеразную активность значительно слабее по сравнению с нативной. В

присутствии апуриновой ДНК (ADP-рибоза)полимераза, также как и в случае отсутствия нативной ДНК, в реакционной среде не проявляет каталитическую активность.

Интересным представляется и значительная стимуляция поли(ADP-рибоза)полимеразной активности при фрагментации ДНК ДНКазой I (табл.2). При внесении в реакционную среду панкреатической ДНКазы (У.А. 2000 ед/мг белка) полимеразная активность увеличивается на 81,5%.

Таблица 2
Потребность (ADP-рибоза) полимеразы в различных компонентах реакционной системы

Условия проведения поли(ADP-рибоза) полимеразной реакции	Ферментативная активность ^о	
	Включение [¹⁴ C] NAD в кислотонерастворимый продукт, пмоль	о
Полная реакционная среда	7,00	100
+ Тимидин (5 мМ)	0	0
+ ДНКаза I (1 ед)	12,7	181,5
- ДНК	0	0
- гистоны	4,19	59,9
- ДНК - гистоны	0	0
- ДНК + денатурированная	2,86	40,9
- ДНК - метилированная	2,69	38,5
- ДНК - апуриновая ДНК	0	0

Примечание. *Поли (ADP-рибоза) полимеразную активность определяли в условиях, описанных в методах исследований, в реакционную среду вносили 0,3 мкг очищенного фермента.

Тимидин, являющийся ингибитором (ADP-рибоза)полимеразы различных органов [1, 10], в нашем случае также подавляет ферментативную активность (табл. 2).

Полученные результаты позволяют предположить, что (ADP-рибоза)полимераза мозга может быть вовлечена в процесс репарации ядерной ДНК, поскольку различные повреждения в ДНК модулируют полимеразную активность.

POLY(ADP-RIBOSE)POLYMERASE OF RAT BRAIN: ISOLATION AND PROPERTIES

Zaalishvili T. M., Sabelashvili D. Sh.

*Institute of Molecular Biology and Biological Physics,
Georgian Academy of Sciences, Tbilisi*

A simple procedure for the purification of poly(ADP-ribose)polymerase from rat brain was developed. Polymerase was purified using affinity chromatography on DNA-agarose and Blue Sepharose CL-6B. The degree of purification was 123 with respect to the initial nuclear extract and the enzyme yield 11,2%. The optimal activity of poly(ADP-ribose)polymerase was observed at 25° and pH 8,0—8,5. Mg²⁺ and total histone fraction did not necessarily accompany polymerase activity, though their addition intensified enzymatic

activity to a certain extent. The rat poly(ADP-ribose)polymerase had absolute requirement for DNA. DNA with single-strand breaks stimulated poly(ADP-ribose)polymerase effectively, whereas denatured, methylated and apurinic DNA inhibited enzymatic activity.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mandel P., Okazaki H., Niedergang C. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, v. 27, p. 1—51, 1982.
2. Gaal J.C., Peerson C.K. *Biochem. J.*, v. 230, p. 1—18, 1985.
3. Заалишвили Т.М., Маргуани Д.О., Тамазян А.С. *Сообщения АН ГССР*, т. 106, N 2, с.397—400, 1982.
4. Ito S., Shizuta Y., Hayaishi O. *J. Biol. Chem.*, v. 254, p. 3647—3651, 1979.
5. Markwell M. K., Haas S. M., Bieber L. L., Tolbert N. E. *Anal. Biochem.*, v. 87, p. 206—210, 1978.
6. Bradford M.M. *Anal. Biochem.*, v. 72, p. 248—254, 1976.
7. Георгиев Г.П. — В кн.: *Химия и биохимия нуклеиновых кислот* (под ред. И. Б. Збарского, С. С. Дебова), с. 74—120, Л., Медицина, 1968.
8. Bendich A.J., Bolton E.T. *Methods in Enzimology*, v. 12 B, p. 635—640, 1968.
9. Chauveau J., Moule Y., Rouiller Ch. *Exp. Cell Res.*, v. 11, p. 317—321, 1956.
10. Holtlund J., Kristensen T., Ostvold A., Laland S.G. *Eur. J. Biochem.*, v. 119, p. 23—29, 1981.

Поступила 21.02.1989.

УДК612.82:577.1

ВЛИЯНИЕ МИКРОИНЪЕКЦИЙ ФЕНАМИНА В ПРИЛЕЖАЩЕЕ ЯДРО И БИКУКУЛЛИНА В ЧЕРНУЮ СУБСТАНЦИЮ НА СИНАПТИЧЕСКИЙ ВЫБРОС ДОФАМИНА В СТРИАТУМЕ КРЫС

Саульская Н.Б., Якимовский А.Ф., Карпова И.В.

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

В 1977 г. Iverzen и Koob выдвинули гипотезу о пусковой роли дофаминергической системы прилежащего ядра (n. accumbens) в обеспечении активности nigro-стриатной дофаминергической системы [1]. Идея координированной работы мезолимбической и nigro-стриатной дофаминергических систем мозга впоследствии была дополнена экспериментальными фактами [2—4]. Первые нейрохимические доказательства существования влияний прилежащего ядра на дофаминергическую систему стриатума были получены нами с использованием метода прижизненного внутримозгового диализа [5]. Было продемонстрировано, что введение фенамина в прилежащее ядро снижает содержание дофамина (ДА) в диализате стриатума наркотизированных крыс. Морфологическим субстратом обнаруженного взаимодействия могут являться проекции ГАМК-ергических нейронов прилежащего ядра на клетки медиального отдела компактной зоны черной субстанции [6, 7]. Проверке этого предположения была посвящена данная работа, где методом прижизненного внутримозгового диализа мы исследовали воздействие микроинъекций фенамина в прилежащее ядро на синаптический выброс стриатного ДА при блокаде ГАМК-ергических рецепторов медиального отдела черной субстанции бикикуллином.

Работа выполнена на 32 крысах-самцах линии *Wistar* массой 200—350 г в условиях полухронического эксперимента. Животных наркотизировали гексеналом в дозе 280 мг/кг с периодическим доведением 90 мг/кг каждые 40 мин. Унилатерально в область дорзального стриатума вживляли перфузионные канюли, имеющие U-образный диализный участок длиной 5 мм (рис.1). Сочленение подводящих полиэтиленовых и диализной трубок осуществляли методом тугой посадки. Использовали диализные трубки с наружным диаметром 125 мкм и проницаемостью 7 кД («Gambro», Швеция, ФРГ). Координаты вживления: кпереди от брегмы на 0,8 мм, латеральнее стреловидного шва на 2,5 мм. Глубина погружения канюли — 5,5 мм от поверхности черепа. Кроме того, в прилежащее ядро и медиальный отдел компактной зоны черной субстанции ипсилатерально по отношению к диализной канюле вживляли стальные направляющие наружным диаметром 1 мм для проведения микроинъекций. Координаты вживления направляющих: для прилежащего ядра — кпереди от брегмы на 2,7мм, латеральнее стреловидного шва на 1,2 мм, глубина погружения — 6,5 мм от

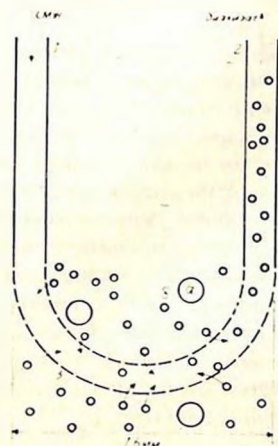


Рис.1. Принципиальная схема диализной канюли: 1,2—полиэтиленовые трубки внутренним диаметром около 130 мкм, 3—диализная трубка, СМЖ—искусственная спинномозговая жидкость; а,б—крупные и мелкие молекулы, соответственно проникающие и непроникающие сквозь поры диализной трубки.

в прилежащее ядро и 0,2 мкг бикукуллина в черную субстанцию в 0,2 мкл СМЖ. После инъекции в течение 50 мин собирали последнюю порцию диализата. В процессе сбора в каждую пробу добавляли по 3 мкл стабилизатора (раствор N10 из набора «Catechol», ЧССР), содержащий восстановленный глутатион. Пробы хранили до анализа не более двух недель при -20° . По окончании экспериментов мозг животных подвергали морфологическому контролю (рис.2). В каждой порции диализата радиоэнзиматически определяли содержание ДА [8]. Разделение метилированных производных катехоламинов проводили методом ТСХ на силуфоловых пластинках UV-254 (ЧССР). Радиоактивность проб анализировали на жидкостном сцинтилляционном счетчике Rack Beta II («LKB WALLAC», Финляндия). Данные обрабатывали статистически по *t*-критерию Стьюдента.

В работе показано, что введение 0,5 мкг фенамина в прилежащее ядро снижало содержание ДА в диализате стриатума как по отношению к фону, так и по отношению к этому параметру при введении СМЖ (рис.3). Введение 0,2 мкг бикукуллина в медиальную черную субстанцию, напротив, увеличивало уровень ДА в диализате стриатума. Одновременные микроинъекции фенамина в прилежащее ядро и бикукуллина в черную субстанцию приводили к снижению содержания ДА в диализате стриатума до уровня,

поверхности мозга; для черной субстанции — назад от брегмы на 5 мм, латеральное стреловидного шва на 1,5 мм, глубина погружения — 6,8 мм от поверхности мозга. Во время проведения микроинъекций иглу микрошприца вводили в мозг на 1 мм глубже направляющих. На следующий день крыс повторно наркотизировали гексеналом в тех же дозах и проводили перфузию стриатума искусственной СМЖ, содержащей (в мМ): NaCl—140, KCl—3,5, CaCl₂—1,3, MgCl₂—1,0, NEPES («Serva», ФРГ)—5,0, pH 7,4. Для перфузии использовали насос шприцевого типа, работающий от двигателя СД-54. Скорость перфузии — 1,8 мкл/мин. Диализат, полученный в течение первого часа перфузии, не анализировали. Затем в течение 50 мин собирали фоновую порцию диализата, после чего всех крыс разбивали на 4 группы, по 8 крыс в каждой. Первой группе животных вводили СМЖ в прилежащее ядро и черную субстанцию в объеме 0,2 мкл, второй группе вводили 0,5 мкг фенамина отечественного производства в 0,2 мкл СМЖ в прилежащее ядро и 0,2 мкл СМЖ в черную субстанцию. Третьей группе вводили 0,2 мкг бикукуллина («Serva», ФРГ) в 0,2 мкл СМЖ в черную субстанцию и 0,2 мкл СМЖ в прилежащее ядро. Четвертой группе вводили 0,5 мкг фенамина

наблюдаемого после изолированных микроинъекций фенамина в прилежащее ядро.

По существующим представлениям уровень ДА в диализате стриатума отражает экстраклеточное содержание ДА в этой структуре и является показателем синаптического выброса указанного нейромедиатора [9]. Показано, что фенамин, вводимый в прилежащее ядро, на 30—40 мин повышает уровень ДА в экстраклеточном пространстве названного образования [10]. То есть длительная моноаминергическая стимуляция прилежащего ядра приводит, по нашим данным, к торможению синаптического выброса ДА в стриатуме. Этот факт находится в полном соответствии с данными, полученными нами ранее в острых экспериментах с использованием трансстриатных диализных канюль [5] и свидетельствует о существовании влияний прилежащего ядра на ДА-ергическую систему стриатума. Изучаемые влияния могут обеспечиваться проекциями ГАМК-ергических нейронов прилежащего ядра на ДА-ергические клетки медиального отдела компактной зоны черной субстанции, иннервирующие стриатум [6, 7].



Рис.2. Пример локализации направляющих А, Б и диализной канюли В в структурах мозга крыс: а — прилежащее ядро (уровень 11в), б — стриатум (уровень 13в), в — медиальная черная субстанция (уровень 44в). Локализация дана по König, Klippel [11]

Если это так, то блокада ГАМК-входа медиального отдела черной субстанции бикикуллином, блокатором ГАМК-ергических рецепторов А-типа, должна хотя бы частично предотвращать влияние введенный в прилежащее ядро на синаптический выброс ДА в стриатуме. Однако было показано, что одновременное введение фенамина в прилежащее ядро и бикикуллина в черную субстанцию оказывает такое же влияние на выброс ДА в стриатуме, как и введение фенамина в прилежащее ядро. Таким образом, по нашим данным, ГАМК-А рецепторы медиального отдела черной субстанции не вовлечены в механизмы, обеспечивающие участие прилежащего ядра в регуляции активности нигро-стриатной ДА-ергической системы.

Из полученных данных можно сделать важный вывод. В работе установлено, что микроинъекции фенамина в прилежащее ядро нивелируют действие бикикуллина, вводимого в черную субстанцию, на уровень ДА в экстраклеточном пространстве стриатума. То есть синаптический выброс ДА в стриатуме находится под контролем прилежащего ядра, и этот механизм управления ДА-ергической системой стриатума реализуется с большим преимуществом, по сравнению с нигральными ГАМК-зависимыми влияниями. Такое заключение созвучно с данными Kelly, Moore [2], показавшими, что блокада ДА рецепторов прилежащего

ядра галоперидолом или разрушение ДА-ергических терминалей этой структуры 6-гидрокси-ДА предотвращает вращение, вызываемое системным введением фенамина у крыс с унилатеральными повреждениями nigro-стриатного пути.

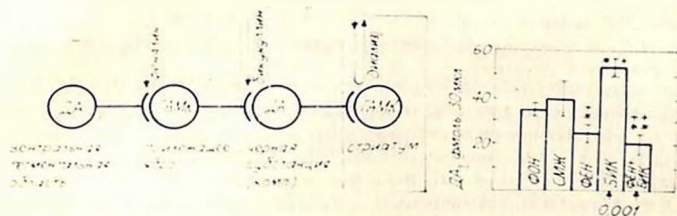


Рис.3. Уровень дофамина в диализате стриатума: ФОН — до воздействия, СМЖ — после введения искусственной СМЖ в прилежащее ядро и медиальную черную субстанцию; ФЕН — после введения фенамина в прилежащее ядро и искусственной СМЖ в медиальную черную субстанцию; БИК — после введения биккукуллина в медиальную черную субстанцию и искусственной СМЖ в прилежащее ядро; ФЕН+БИК — после введения в прилежащее ядро и искусственной СМЖ в медиальную черную субстанцию; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$, где p — доверительная вероятность при сравнении с фоном; $p < 0,05$, $p \leq 0,01$, где p — доверительная вероятность при сравнении с введенным искусственной СМЖ. В левой части рисунка приведена схема опыта

Все эти факты свидетельствуют о важной роли прилежащего ядра в регуляции активности ДА-ергического входа стриатума. Механизм, лежащий в основе этой регуляции, и ее функциональное значение пока остаются невыясненными.

THE EFFECT OF AMPHETAMINE INJECTIONS IN NUCLEUS ACCUMBENS AND BICUCULLINE INJECTIONS IN SUBSTANTIA NIGRA ON RELEASE OF STRIATAL SYNAPTIC DOPAMINE

Saulskaya N.B., Yakimovsky A.F., Karpova I.V.

Pavlov Institute of Physiology, USSR Academy of Sciences, Leningrad

Anaesthetized male *Wistar* rats were subjected to *in vivo* intracranial dialysis followed by radioenzymatic analysis of dopamine. Injections of amphetamine (0,5 μg) in *n. accumbens* decreased the extracellular dopamine level. The administration of bicuculline (0,2 μg) in the medial part of *substantia nigra pars compacta* did not inhibit the effect of amphetamine. *Nucleus accumbens* was suggested to affect the release of striatal synaptic dopamine. This phenomenon is not mediated by GABA-A-receptors of the medial part of *substantia nigra*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Iversen S.D., Koob G.F. Adv. Biochem. Psychopharmacol., v. 16, p. 209—214, 1977.
2. Kelly P.H., Moore K.E. Psychopharmacol. v. 55, p. 35—41, 1977.
3. Mogenson G.J., Jones D.L., Yim C.Y. Prog. Neurobiol., v. 14, p. 69—97, 1980.
4. Шаповалова К.Б. Физиол. журн., т. 71, N5, с. 537—553, 1985.
5. Саульская Н.Б., Якимовский А.Ф. Физиол. журн., т. 75, N1, с. 148—150, 1989.
6. Walaas I., Fonnum F. Neurosci., v. 5, p. 63—72, 1980.
7. Somogyi P., Bolam J.P., Totterdell S., Smith A.D. Brain Res., v. 217, p. 245—263, 1981.
8. Peuler J.D., Johnson G.A. Life Sci., v. 1, p. 625—626, 1977.
9. Ungerstedt U. — In: Measurement of neurotransmitter release in vivo (eds. C.A. Marsden, J. Wiley, S.A. Wiley), p. 81—105, Interscience Publication, Chichester, New-York, 1984.
10. Hernandez L., Lee F., Hoebel B.G. Brain Res. Bul., v. 16, p. 623—628, 1987.
11. König J.F.R., Klippel R.A. The rat brain. A stereotaxic atlas. The Williams & Wilkins company, Baltimore, 1963.

Поступила 10.04.1989

УДК577.352.46

ВЛИЯНИЕ НЕЙРОАКТИВНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ 4-ФЕНИЛПИРИДИНА И 4,4'-ДИПИРИДИЛА НА ОБРАТНЫЙ ЗАХВАТ ДОФАМИНА В СИНАПТОСОМАХ МОЗГА МЫШЕЙ

Соляков Л.С., Петрова Л.Н., Калашников В.В.,
Ткаченко С.Е., Бачурин С.О.

*Институт физиологически активных веществ
АН СССР, Черноголовка*

Недавно было установлено, что 1-метил-4-фенилтетрагидропиридин (МФТП) — побочный продукт химического синтеза аналога опиата мепиридина способен вызывать у людей и приматов клинические симптомы и биохимические изменения в мозгу, характерные для случаев заболевания паркинсонизмом [1]. Возможность получения экспериментальной модели паркинсонизма путем воздействия относительно простого химического соединения на лабораторных животных (мыши и приматы) привлекает пристальное внимание к изучению механизма действия МФТП и структурно близких ему веществ. К настоящему времени считается установленным, что нейротоксическим действием обладает не сам МФТП, а продукт его метаболизма — 1-метил-4-фенилпиридиний (МФП), образующийся в астроцитах под действием МАО типа Б [2]. В результате последующих процессов МФП транспортируется системой обратного захвата дофамина (ДА) в ДА-ергические нейроны, где депонируется в виде комплекса с нейромеланином [3]. Одной из главных причин, лежащих в основе дегенеративных процессов, развивающихся в ДА-ергических нейронах, считают ингибирование МФП окислительного фосфорилирования, приводящего к нарушению метаболического баланса клеток [4]. Взаимодействие с системой обратного захвата ДА представляется, таким образом, как ключевой этап, обеспечивающий высокую селективность действия в отношении ДА-ергических нейронов МФП, а также его возможных эндогенных и экзогенных аналогов.

В настоящей работе нами были исследованы структурно-функциональные закономерности взаимодействия системы обратного захвата ДА с близкими структурными аналогами МФП в ряду N-замещенных 4-фенилпиридинов (ФП) и 4,4'-дипиридилов (ДП), которые рассматриваются в последние годы в качестве возможного экологотоксического фактора, способствующего развитию паркинсонизма у людей [5].

Работа была проведена на Р₂-фракции синапсом, полученных по методу Najos [6] из мозга мышей. Обратный захват ДА проводили в растворе Кребса-Хенселейта следующего состава (в mM): NaCl — 132,

KCl — 5; MgCl₂ — 1,2, CaCl₂ — 1,2, глюкоза — 10, HEPES — 5, в который вносили аскорбиновую кислоту (1мМ), ниазамид (12,5 мкМ) и ЭДТА (70 мкМ) с целью предотвращения неспецифического окисления ДА [7]. Концентрацию [¹¹C]ДА в инкубационном растворе варьировали в интервале 0,1—2,0 мкМ. Для определения неспецифического захвата [¹¹C]ДА синапсосомами параллельно проводили контрольные эксперименты, в которых инкубационная среда содержала LiCl вместо NaCl. Каждая проба ставилась в трех параллелях, а каждый препарат исследовался в 2—3-х независимых экспериментах. Конечный результат выражался графически в двойных обратных координатах Лайнуивера-Берка, значения K_m определяли из графика зависимости K_m от [I]. Значения IC₅₀ определяли при конечной концентрации [¹¹C]ДА, равной 5 · 10⁻⁸ М. Концентрацию препаратов подбирали таким образом, чтобы ингибирование обратного захвата [¹¹C]ДА составляло от 20 до 80%, по отношению к контролю. Все вещества, приведенные в таблице, кроме соединения УП («Sigma», США), были синтезированы в ИФАВ АН СССР.

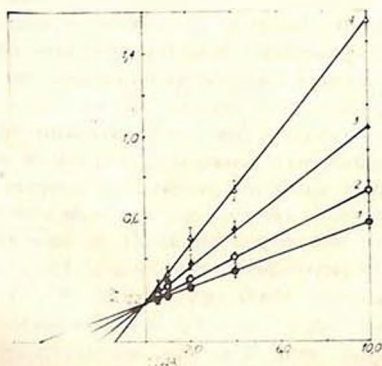
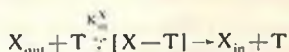
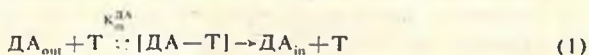


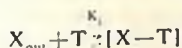
Рис. Ингибирование обратного захвата [¹¹C]ДА синапсосомами мозга мышей 1-метил-4-фенилпиридинием. Захват [¹¹C]ДА в отсутствие 1-метил-4-фенилпиридиния (1), в присутствии 1-метил-4-фенилпиридиния: 0,1 мкМ (2); 0,5 мкМ (3); 1,0 мкМ (4). Каждая точка получена как результат 2—3 независимых экспериментов, проведенных в 3-х параллелях. Кривые представлены в координатах Лайнуивера-Берка. Аналогичные по характеру зависимости были получены для всех исследованных соединений. По оси абсцисс — [I/ДА], мкМ; по оси ординат — 1/V, μмоль · мг белка · мин.

Одним из важнейших этапов в механизме нейротоксичности МФТП и его метаболитов, во многом определяющем высокую избирательность действия этого соединения в отношении ДА-ергических нейронов ЦНС, является взаимодействие с системой обратного захвата ДА. Исследование обратного захвата радиоактивно меченных препаратов показало, что МФТП практически не транспортируется в изолированные нервные окончания. В отличие от МФТП, его метаболит МФП активно захватывается синапсосомами мозга. Имеющиеся в литературе данные [8, 9] по взаимному конкурентному ингибированию меченых ДА и МФП указывают на

практически полное совпадение соответствующих параметров: для ДА $K_m^{DA} = 150 \pm 15 \text{ нМ}$, а $K_i^{МФП} = 160 \pm 16 \text{ нМ}$; для МФП $K_m^{МФП} = 170 \pm 17 \text{ нМ}$, $K_i^{DA} = 140 \pm 14 \text{ нМ}$. Это дает основание рассмотреть в качестве наиболее общей следующую кинетическую схему процесса:



а также с учетом возможности «непродуктивного» связывания:



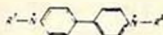
где T — транспортная система, а X — вещество (в данном случае МФП), взаимодействующее с этой транспортной системой. Зависимость Михаэлиса-Ментен при этом описывается уравнением:

$$V = \frac{V_{max} [DA]}{[DA] + K_{m(экз.)}} \quad (2),$$

$$\text{где } K_{m(экз.)} = K_m^{DA} + K_m^{DA} \frac{[X]}{K_i^{DA}} \quad (3), K_i^{DA} = \left(\frac{1}{K_i} + \frac{1}{K_m^X} \right)^{-1} \quad (4).$$

Таблица

Ингибирование обратного захвата [3 C]ДА в синапсомы мозга мышей производными 4-фенилпиридина и 4,4'-дипиридина.



№	R	R	$K_{i(экз.)}$, мкМ	№	R	R	$K_{i(экз.)}$, мкМ
I	Ph		81,3 ± 4,3	VI		CH ₃	19,65 ± 1,38
II	Ph	CH ₃	0,37 ± 0,04	VII	CH ₃	CH ₃	28,30 ± 2,10
III	Ph	C ₂ H ₅	2,42 ± 0,18	VIII	CH ₃ Ph	CH ₃ Ph	4,76 ± 0,34
IV	Ph	CH ₃ Ph	9,86 ± 2,70				
V	H	CH ₃ Ph	8,42 ± 2,8				

Очевидно, что если процесс «непродуктивного» связывания препарата X характеризуется значительно более низкой аффинностью по сравнению с процессом собственного транспорта ($K_i^X \gg K_m^X$), то значение экспериментально определенной эффективной величины K_i обратного захвата [3 C]ДА будет соответствовать значению константы Михаэлиса процесса собственного транспорта, то есть $K_{i(экз.)}^{DA} \approx K_m^X$ (5), что и отмечается в случае МФП и ДА. Таким образом, проведенный кинетический анализ подтверждает, что захват МФП первыми окончаниями осуществляется специфической системой обратного захвата ДА и может быть адекватно описан схемой (1) и уравнениями (2) — (5). С целью выяснения специфичности системы обратного транспорта ДА к соединениям, структурно близким МФП, нами было исследовано ингибирование обратного захвата ДА рядом пиридиновых производных, имеющих различие в заместителях в 1 и 4 положениях, а также их 4,4'-дипиридиновых аналогов. Результаты исследования представлены в таблице. Установлено, что все исследованные соединения обратимо и конкурентно ингибируют обратный захват ДА (рисунок). Наиболее

сильным ингибитором является МФП, значение K_i для которого близко к соответствующей величине для ДА. Для N-замещенных производных ФП (таблица, соединения II—IV) ингибирующая активность уменьшается с увеличением липофильности соединений, что согласуется с имеющимися в литературе данными об обратной взаимосвязи между липофильностью и аффинностью соединений в отношении переносчиков биогенных аминов [10]. Близкая по характеру закономерность была показана ранее и в отношении производных МФТП, имеющих разные заместители по атому азота [11]. Очень низкая ингибирующая способность ФП (таблица, соединение I) объясняется, по-видимому, тем, что в условиях эксперимента при pH 7,4 атом азота в пиридинильном фрагменте практически не протонирован ($pK_{\text{Фп}}=5.5$) [12], в то время как система обратного захвата ДА высоко специфична в отношении моноаминов, которые при pH 7,4 содержат протонированную аминогруппу (pK_a около 10) [13]. В ряду производных ДП сродство к переносчику ДА менее выражено и фактически не зависит от липофильности соединений. При этом соединения, содержащие общий структурный элемент — 1-бензилпиридиний, характеризуются близкими значениями K_i (таблица, соединения IV, V, VIII), которые не зависят от природы заместителя в 4-м положении пиридиниевого кольца. Таким образом, в целом система обратного захвата ДА проявляет значительно более высокую степень избирательности в отношении N-алкилзамещенных производных ФП, которые можно рассматривать как циклические аналоги биогенных аминов, по сравнению с соответствующими дипиридилными аналогами, что может также свидетельствовать о различных механизмах взаимодействия с системой переносчика ДА данных рядов соединений. Хотя в настоящей работе исследовалось лишь ингибирование обратного захвата ДА рядом аналогов МФП, представляется целесообразным сделать некоторые предположения относительно возможности их собственного транспорта в нервные терминалы через эту транспортную систему. Используемые нами соединения являются гомологами или близкими структурными аналогами МФП и все они конкурентно и обратимо ингибируют обратный захват ДА в синапсомы. Это дает основание считать, что данные соединения взаимодействуют с переносчиком ДА по схеме (1) с учетом возможности «непродуктивного» связывания. В этом случае кинетика транспорта соединений в нервные окончания должна описываться уравнениями (2) — (4). Из уравнения (4) следует, что $K_m^x \geq K_i^{\text{эфф}}$, то есть в условиях реализации данного механизма значения констант Михаэлиса собственного транспорта исследованных соединений могут только превышать наблюдаемые величины кажущейся константы K_i обратного захвата ДА. Таким образом, для всех изученных соединений процесс транспорта в нервные терминалы системой обратного захвата ДА будет осуществляться со значительно меньшим сродством к переносчику, чем в случае МФП. Ранее подобное соотношение было показано для МФТП, который практически не захватывается в синапсомы (менее 5% от захвата МФП), а его ингибирующее действие почти на порядок слабее чем у МФП как по нашим данным (для МФП $IC_{50}=6.3 \cdot 10^{-7}$, для МФТИ $IC_{50}=4 \cdot 10^{-6}$), так и по данным других авторов [11].

EFFECT OF NEUROACTIVE DERIVATIVES OF 4-PHENYLPYRIDINE AND 4,4'-BIPYRIDINE UPON DOPAMINE UPTAKE BY MICE SYNAPTOSOMES

Soljakov L.S., Petrova L.N., Kalashnikov V.V.,
Tkachenko S.E., Bachurin S.O.

*Institute of Physiologically Active Substances, USSR
Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow Region*

The effect of neuroactive derivatives of 4-phenylpyridine (PP) and 4,4'-bipyridine (BP) upon the murine dopamine (DA) uptake system was studied. All compounds were reversible competitive inhibitors of [14 C]DA uptake. 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (an agent provoking clinical symptoms of Parkinson disease in humans and laboratory animals) had the highest specificity toward the DA-transport system ($K_i=0,37\pm0,04$ mM). The inhibitory capacity of a series of N-substituted PP was inversely proportional to their lipophilicity. DA transporter had higher affinity to PP-derivatives as compared to BP-derivatives. Analysis of reciprocal competitive inhibition of DA and MPP uptake was used to formulate a kinetic model of DA-transporter interaction with these compounds. We also estimated the potential of MPP structural analogues uptake by nerve endings.

ЛИТЕРАТУРА

1. Langston J. W., Ballard R., Tetrud J. W., Irwin I. Science, v. 219, p. 979-980, 1983.
2. Markey S. P., Johannessen J. N., Chiueh C. C., Burns R. S., Herkenham M. A. Nature, v. 311, p. 464-467, 1984.
3. D'Amato R. J., Alexander G. M., Schwartzman R. J., Kitt C. A., Price D. L., Snyder S. H. Nature, v. 327, p. 324-326, 1987.
4. Singer T. P., Castagnoli N., Ramsay R. R., Trevor A. J. J. Neurochem., v. 49, p. 1-8, 1987.
5. Lewin R. Science, v. 229, p. 257-258, 1985.
6. Hajos F. Brain Res., v. 93, p. 485-489, 1975.
7. Жариков С.И., Жарикова А.Д., Буданцев А.Ю. Докл. АН СССР, т. 292, с. 1494-1497, 1987.
8. Javitch J. A., D'Amato R. J., Strittmatter S. M., Snyder S. H. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci., v. 82, p. 2173-2177, 1985.
9. Chiba K., Trevor A. J., Castagnoli N. Jr. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 128, p. 1228-1232, 1985.
10. Ross S. B. TIPS, v. 8, p. 227-321, 1987.
11. Heikkila R. E., Youngster S. K., Manzino L., Cabbat F. S., Duvoisin R. C. J. Neurochem., v. 44, p. 310-313, 1985.
12. Katritzky A. R. Handbook of Heterocyclic Chemistry. Oxford, New York, Toronto, Sydney, Frankfurt, Pergamon Press, p. 153, 1985.
13. Mc Ewen C. M., Jr., Sasaki G., Jones D. C. Biochemistry, v. 8, p. 3952-3962, 1969.

Поступила 16.12.1988

УДК 612. 815. 1. 577. 354

ВЛИЯНИЕ БИЦИКЛИЧЕСКИХ ЭФИРОВ КИСЛОТ ФОСФОРА И ПИКРОТОКСИНА НА СВЯЗЫВАНИЕ ГАМК

Первухин Г. Я., Маслов А. А., Соколов В. Б.

Фетисов В. И., Мартынов И. В.

*Институт физиологически активных веществ
АН СССР, п. Черноголовка Московской области*

Рецептор ГАМК широко представлен в мозгу млекопитающих и играет важную роль в регуляции нейрональной активности [1, 2]. В результате многочисленных биохимических исследований сложилось представление о структуре постсинаптического рецептора ГАМК как мультикомпонентного комплекса, включающего участки специфического связывания для ГАМК и прямых агонистов, антагонистов ГАМК, бензодиазепинов, β -карболинов, барбитуратов, пикротоксина, а также хлор-ионофорного канала [3]. Производные бициклических эфиров кислот фосфора — 4-алкилпроизводные 2,6,7-триокса-1-фосфо-бицикло [2. 2. 2] октаны (бициклофосфиты) и соответствующие октан-1-оксиды (бициклофосфаты), относящиеся к группе не прямых ГАМК-антагонистов клеточной структуры, действуют подобно пикротоксину, а их [^{35}S] меченый аналог трет-бутил-бициклофосфат ([^{35}S] ТБФТ) является наиболее специфичным радиолигандом для этого места связывания [4].

Недавно нами на основании собственных экспериментальных данных было высказано предположение о том, что бициклические эфиры кислот фосфора (БЦФ) являются высокоэффективными блокаторами потенциал- и хемотропных хлорных каналов [5].

В работе Harris, Allman [6] было показано, что ГАМК-зависимая проницаемость для Cl^- в синаптической мембране, выделенных из мозга мышей, блокируется бикукуллином и пикротоксином (ПТ). Для БЦФ таких данных нет.

В последнее время появились работы, направленные на изучение проявления аллостерических взаимодействий между участками специфического связывания в структуре ГАМК-зависимого рецептор-канального комплекса в процессе парных конкурентных взаимодействий [7—9]. Исследование такого рода взаимодействий наряду с данными о влиянии изучаемых веществ на ГАМК-зависимую проницаемость $^{36}\text{Cl}^-$ позволяют обнаружить существующие различия в популяциях специфических мест связывания.

Целью настоящей работы было изучение влияния одного из представителей ряда БЦФ 4-пропил-бициклофосфата на ГАМК-зависимую проницаемость $^{36}\text{Cl}^-$ и изучение взаимодействия мест связывания для триады веществ: БЦФ—ПТ—[^3H] ГАМК.

Грубую фракцию мембран выделяли из мозга крыс-самцов линии

Wistar массой 200—250 г. Целый мозг гомогенизировали при 2° в 10 объемах 0,32 М сахарозы в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком. Затем гомогенат центрифугировали при 1000 g 10 мин, а супернатант — при 30000 g 30 мин. Осадок отмывали ледяной водой центрифугированием при 30000 g, суспендировали в 100 объемах деионизованной воды и замораживали при —24° на 12 ч. После этого суспензию повторно гомогенизировали и центрифугировали при 30000 g 30 мин. Осадок суспендировали в 50 мМ трис-цитратном буфере, pH 7,4, с 0,05%-ным Тритоном X-100 и снова центрифугировали при 30000 g 30 мин. Затем осадок трижды отмывали в деионизованной воде центрифугированием (30000 g, 30 мин). Полученную таким образом грубую фракцию мембран мозга разводили в 10 мМ трис-HCl буфере, pH 7,4 до конечной концентрации белка 1 мг/мл. Содержание белка определяли по методу Lowry и соавт. [10].

Для выделения синапсом головного мозг из двух особей гомогенизировали в 30 мл ледяного 20 мМ HEPES-трис буфера, pH 7,4 следующего содержания (в мМ): NaCl — 118, KCl — 4,7, MgSO₄ — 1,18, CaCl₂ — 2,5. Гомогенизацию проводили в мягких условиях в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком (5—7 поднятий пестика без поворота). Затем гомогенат дважды фильтровали через капроновую сетку с диаметром пор 150—300 мкм. После фильтрования препарат центрифугировали при 1000 g 12 мин и температуре 2°. Супернатант удаляли, а осадок центрифугировали в тех же условиях. Полученный осадок доводили буфером до конечной концентрации белка в пробе 20 мг/мл и использовали в качестве синапсом.

Определение связывания [³H]ГАМК и количества ³⁶Cl⁻. Связывание [³H]ГАМК определяли на нитроцеллюлозных фильтрах «Synpor» (ЧССР) с диаметром пор 0,6—0,8 мкм, используя метод, описанный Кузнецовым и соавт. [11]. Конечные концентрации используемых веществ были следующие (в М): [³H]ГАМК — 10⁻⁸, БЦФ — 10⁻⁵—10⁻⁸, ПТ — 3,15 · 10⁻⁶. Для определения неспецифического связывания использовали 10 мМ немеченой ГАМК. Специфическое связывание определяли как разность между общим и неспецифическим связыванием.

Пробы, содержащие 0,5 мл препарата синаптонейросом и соответствующее количество ПТ и БЦФ, инкубировали при перемешивании 20 мин при температуре 30°. За 5 с до фильтрации в каждую пробу добавляли 0,5 мКи ³⁶Cl⁻ и 10⁻⁵ М ГАМК. Фильтрацию проводили под вакуумом на фильтрах «Whatman» GF/B с диаметром пор 24 мкм. После промывки (3 раза по 2 мл ледяным буфером) фильтры помещали в сцинтилляционные флаконы.

Активность определяли в толуольной сцинтилляционной жидкости на счетчике «Intertechnique» (Франция). Каждое определение вели в 3-х параллельных пробах. Опыт повторяли 4—5 раз.

4-метил, 4-этил, 4-пропил-2,6,7-триокса-1-фосфобикло[2. 2. 2] октаны и соответствующие октан-1-оксиды синтезированы по методике Verkade, Reynolds [12].

Первоначально нами была получена зависимость специфического связывания [³H]ГАМК от концентрации ПТ, параметры которого были

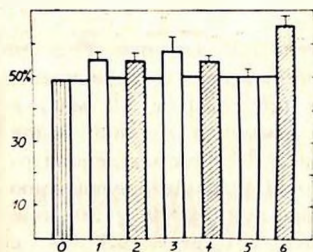


Рис. 1. Гистограмма зависимости специфического связывания $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ (в % к контролю) от присутствия в среде: 0-пикротоксина, 1-пикротоксина + 4-метил-бициклофосфата, 2-пикротоксина + 4-метил-бициклофосфата, 3-пикротоксина + 4-этил-бициклофосфата, 4-пикротоксина + 4-этил-бициклофосфата, 5-пикротоксина + 4-пропил-бициклофосфата, 6-пикротоксина + 4-пропил-бициклофосфата. Концентрация бициклических эфиров кислот фосфора $4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$

связывающие участки (для бициклофосфитов подобных данных нет). Дело в том, что исследование зависимости структура—активность в ряду бициклофосфатов показало корреляцию между их активностью как антагонистов ГАМК, конвульсантной активностью и способностью замещать $[^3\text{H}]\text{ДГП}$ из его мест связывания [13, 14].

следующими: $V_{\text{max}} = 0,4 \text{ нМ/мг белка}$, $K_d = 9 \text{ нМ}$. Концентрация ПТ, при которой наблюдали 50%-ное уменьшение специфического связывания $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$, равна $3,15 \times 10^{-6} \text{ M}$, в то же время БЦФ в концентрации до 10^{-4} M не изменяли связывания $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$.

На рис. 1. представлены результаты изучения влияния смеси ПТ и каждого взятого в отдельности БЦФ (всего шесть веществ) на специфическое связывание $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$. В этих опытах ПТ был использован в концентрации, при которой наблюдали 50%-ное ингибирование связывания $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$.

При совместном использовании ПТ и каждого из шести исследованных веществ эффективность ингибирующего влияния уменьшается, за исключением опытов с 4-пропил-бициклофосфатом. Наблюдаемый эффект нельзя объяснить конкурентным замещением ПТ из его мест связывания БЦФ, так как величина этого эффекта не совпадает со способностью бициклофосфатов конкурировать с меченым аналогом пикротоксина $[^3\text{H}]\text{дигидропикротоксином}$ $[^3\text{H}]\text{ДГП}$ за свя-

Таблица
Влияние пикротоксина и 4-пропил-бициклофосфата на ГАМК-зависимую проницаемость $^{36}\text{Cl}^-$

Название вещества	Концентрация (в М)	Ингибирующий эффект (в %)
Пикротоксин	10^{-6}	70 ± 10
4-пропил-бициклофосфат	10^{-4}	70 ± 13

Примечание. $p < 0,01$

В таблице представлены результаты изучения влияния ПТ и представителя ряда БЦФ 4-пропил-бициклофосфата на ГАМК-зависимую проницаемость $^{36}\text{Cl}^-$ в синаптонейросомы. Хотя ПТ и 4-пропил-бициклофосфат имеют сравнительно близкие характеристики специфического связывания [16], их влияние на проницаемость $^{36}\text{Cl}^-$ неодинаково. По-видимому, БЦФ являются более активными блокаторами хлорной проводимости, чем ПТ, что объясняет более выраженную конвульсантную активность БЦФ [14]. Этот факт позволяет предположить не только частичное совпадение мест связывания БЦФ и ПТ, но и то, что БЦФ взаимодействуют непосредствен-

но с ионофорной частью комплекса. Необходимо отметить, что изучение кинетики диссоциации комплекса рецептор— $[^{35}\text{S}]$ ТБФТ в присутствии пикротоксина также указывает на несовпадение мест связывания $[^{35}\text{S}]$ ТБФТ и ПТ [15].

Мы считаем, что полученные нами результаты можно объяснить, предположив существование двойной аллостерии в триаде БЦФ—ПТ—ГАМК (рис. 2). Данный вывод дает основание для уточнения гипотетической структуры ГАМК-А-рецепторного комплекса. Вероятно,

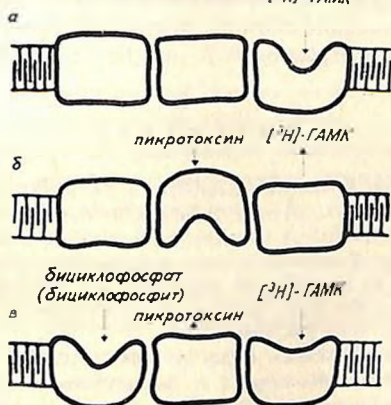


Рис.2. Взаимодействие мест связывания бициклических эфиров кислот фосфора, пикротоксина и $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$: а — связывание $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ с рецепторным комплексом, б — связывание $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ в присутствии пикротоксина, в — связывание $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ в присутствии пикротоксина и бициклических эфиров кислот фосфора

места связывания ГАМК и БЦФ взаимодействуют через несколько участков, в частности, через участок связывания, специфичный к ПТ (рис. 2, в), причем место связывания БЦФ, по-видимому, расположено так, что способно влиять непосредственно на проницаемость ионов хлора.

THE INTERACTION OF BINDING SITES FOR BICYCLIC PHOSPHORUS ESTERS, PICROTOXIN AND $[^3\text{H}]\text{-GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID}$ IN THE GABA-A RECEPTOR IONOPHORE COMPLEX

Pervukhin G. Ya., Maslov A. A.,
Socolov V. B., Fetisov V.I., Martynov I. V.

Institute of Physiologically Active Substances,
USSR Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow Region

Experiments on binding of isotopically labelled substances with brain membrane fraction provide evidence for the complex structure of the GABA postsynaptic receptor (GABA-A receptor). Individual components of the receptor are capable of allosteric interactions with one another. In this study allosteric interactions between the specific binding sites in the GABA-dependent

receptor-channel complex were investigated. Pairwise competitive comparisons for three substances — bicyclic phosphorus esters (BPE), picrotoxin and [^3H] GABA — were performed. Also, the effects of BPE and picrotoxin on the GABA-dependent permeability for $^{36}\text{Cl}^-$ in vitro were examined. In experiments with the combined use of picrotoxin and 4-methyl, 4-ethyl and 4-propyl derivatives of BPE the inhibitory effect of picrotoxin on [^3H] GABA binding diminishes. In addition, differences in the effect of BPE and picrotoxin on the transport of $^{36}\text{Cl}^-$ into synaptoneurosomes were found. These results are discussed in terms of possible allosteric interactions between the binding sites for BPE, picrotoxin and [^3H]GABA.

ЛИТЕРАТУРА

1. Enna S. J., Gallacher J. P. *Int. Rev. Neurobiol.*, v. 24, p. 181—212, 1983.
2. Johnston G. A. R., Allan R. D., Skerrett Handbook of Neurochemistry (ed. A. Lajtha), v. 6, p. 213—237, 1984.
3. Olsen R. W. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, v. 22, p. 245—277, 1982.
4. Squires R. F., Casida J. E., Richardson M., Salderup E. *Mol. Pharmacol.*, v. 23, p. 326—336, 1983.
5. Фетисов В. И., Редкозубов А. Е., Любимов В. С., Соколов В. Б., Мартынов И. В. *Биол. мембраны*, т. 73, с. 968—970, 1986.
6. Harris R. A., Allan A. M. *Science*, v. 228, p. 1108—1110, 1985.
7. Trifiletti R. W., Snowman A. M., Snyder S. H. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 106, p. 441—447, 1985.
8. Gallo V., Wise B. C., Vavarino F., Guidotti A. J. *Neurosci.*, v. 5, p. 2422—2438, 1985.
9. Пераухин Г. Я., Маслов А. А., Котельников С. А., Соколов В. Б., Фетисов В. И., Мартынов И. В. *Докл. АН СССР*, т. 293, с. 736—739, 1987.
10. Lowry D. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randell R. J. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265—275, 1951.
11. Кузнецов В. И., Тонких А. К., Ким О. Н., Асланов Х. А. *Укр. биохим. журн.*, т. 54, с. 428—531, 1982.
12. Verkade J. G., Reynolds L. T. *J. Org. Chem.*, v. 25, p. 663—665, 1960.
13. Ticku M. K., Olsen R. W. *Neuropharmacology*, v. 18, p. 315—318, 1979.
14. Bowery N. G., Collins J. E., Hill R. G., Pearson S. *Brit. J. Pharmacol.*, v. 57, p. 435—456, 1976.
15. Maksay G., Ticku M. K. *J. Neurochem.*, v. 44, p. 480—486, 1985.

Поступила 1.02.1988

УДК 616.831.4.013-0.89.843

ЗАХВАТ НЕЙРОМЕДИАТОРОВ В ТРАНСПЛАНТИРОВАННОЙ ЭМБРИОНАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ ТКАНИ

Шифман М. И., Шуляк Л. И., Бабийчук Г. А.

*Институт проблем криобиологии и
криомедицины АН УССР. Харьков*

Изучение механизмов восстановления синаптических связей после трансплантации эмбриональной нервной ткани занимает важное место в экспериментах по нейротрансплантации [1]. В основном для этого используются различные нейроанатомические (ретроградное и anterogradное мечение нейронов флуоресцентными красителями, пероксидазой хрена и т.п.) и нейрофизиологические методы. Ценным дополнением к этим методам может служить изучение захвата нейромедиаторов синапсосомами, выделенными из ткани трансплантата. Эффективность этого метода доказана его широким применением в современной нейроанатомии [2]. Серотонин- и норадренергические аксоны поступают в гипоталамус из ядер шва и голубого пятна (*locus ceruleus*), а также ствола мозга соответственно. Таким образом, изучая захват [^3H]серотонина и [^3H]норадреналина синапсосомами, выделенными из трансплантированной в область разрушенного переднего гипоталамуса эмбриональной нервной ткани, можно судить о восстановлении межнейрональных связей между мозгом реципиента и трансплантатом.

Опыт проводили на крысах-самцах линии *Wistar* массой 180—200 г. Исследовали захват [^3H]нейромедиаторов в трех группах животных: 1) контрольная группа крыс; 2) крысы, у которых стереотаксически разрушали область переднего гипоталамуса; 3) крысы с разрушенным передним гипоталамусом, которым трансплантировали передний гипоталамус 17-дневных эмбрионов.

Животных наркотизировали внутривенными инъекциями тиопентала натрия (0,3 мл 5%-ного раствора) и 1,2 мл 20%-ного раствора ГОМК (гамма-оксимасляная кислота), помещали в стереотаксический прибор СЭЖ-3 и по координатам AP:0; L — 2 мм; H — 9 мм под углом 24° разрушали передний гипоталамус методом вакуумной аспирации через стеклянную канюлю. Часть крыс после этого оставляли как контроль с разрушением, а оставшимся после полной остановки кровотечения пересаживали ткань гипоталамуса 17-дневных эмбрионов. Животных забивали через 30 дней после пересадки (или разрушения) и из мозга иссекали область переднего гипоталамуса, из которого выделяли синапсосомы.

Выделение «неочищенной» фракции синапсом и последующее изучение захвата [^3H]нейромедиаторов проводили согласно Storm Mathisen [3]. Белок определяли по методу Lowry [4]. Статистическую обработку прово-

дили с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Таблица

Захват [^3H]нейромедиаторов синапсосомами, выделенными из гипоталамуса в норме и после нейротрансплантации

	[^3H]серотонин (пикомоль · мг белка ⁻¹ · мин ⁻¹)	[^3H]норадреналин (пикомоль · мг белка ⁻¹ · мин ⁻¹)
Норма	0,166 ± 0,03 (0,021 ± 0,01)	0,232 ± 0,042 (0,059 ± 0,014)
Разрушение	0,052 ± 0,01 (0,043 ± 0,02)	0,078 ± 0,016 (0,062 ± 0,003)
Трансплантация	0,149 ± 0,004 (0,015 ± 0,009)	0,207 ± 0,006 (0,071 ± 0,013)

Примечание. Цифры в скобках — захват [^3H]серотонина в присутствии 50 мкМ имипрамина и [^3H]норадреналина в присутствии 50 мкМ дезимипрамина.

Результаты, представленные в таблице, показывают, что у животных с трансплантатом идет захват [^3H]серотонина и [^3H]норадреналина синапсосомами, выделенными из пересаженной в разрушенный передний гипоталамус нервной ткани. Следует отметить, что этот процесс осуществляется практически на том же уровне, что и у контрольных животных. Добавление в среду инкубации ингибитора нейронального захвата серотонина имипрамина вело к подавлению процесса захвата на 80%, что свидетельствует о специфичности наблюдаемого процесса. Сходные данные были получены при изучении действия специфического блокатора захвата норадреналина дезимипрамина (таблица) — подавление захвата [^3H]норадреналина на 66%. Интересно, что в случае выделения синапсосом из ткани разрушенного переднего гипоталамуса специфического захвата не наблюдалось (таблица). Это может быть следствием того, что область разрушения зарастает не нервной, а соединительной и глиальной тканью, как видно при гистологическом изучении.

Таким образом, наличие захвата [^3H]серотонина и [^3H]норадреналина синапсосомами в трансплантате может указывать на восстановление специфических функций серотонин- и норадренергических аксонов, проросших в трансплантат из мозга хозяина.

THE UPTAKE OF NEUROTRANSMITTERS IN TRANSPLANTATED NERVE TISSUE

Shifman M. I., Shulak L. I., Babiychuk G. A.

*Institute of Cryobiology and Cryomedicine Problems,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kharkov*

The uptake of neurotransmitters by synaptosomes prepared from embryonic nerve tissue transplanted into the brain was studied. It has been shown that highly effective uptake of [^3H]serotonin and [^3H]noradrenaline practically achieves the control level after transplantation. These data testify to the sprouting of corresponding axons from the host's brain into transplantant.

ЛИТЕРАТУРА

1. Полежаев Л. В., Александрова М. А. Трансплантация ткани мозга в норме и патологии, М., Наука, 1986.
2. Kuhar M.J. Life Sci. , v. 13, p. 1623—1634, 1973.
3. Storm Mathisen J. Brain Res. , v. 120, p. 379 — 386, 1977.
4. Lowry O. H. , Rosebrough N. J., Farr A.L. J. Biol. Chem., v. 193, p.265—275, 1951.

Поступила 4.05.1989

УДК 591.481.1+612.8

ОСОБЕННОСТИ ФРАКЦИОННОГО СОСТАВА ПОЛИПЕПТИДОВ ТРЕХ ГРУПП НЕЙРОНОВ МОЗГА КРЫСЫ

Веретенников Н.А., Леонтович Т.А.

Институт мозга ВНЦ психического здоровья АМН СССР, Москва

В последнее время получены данные о наличии белков, специфичных для идентифицированных нейронов беспозвоночных животных [1, 2], для нейронов определенного типа мозга млекопитающих (крысы) — клеток Пуркинье [3—5] и показана антигенная неоднородность разных видов нейронов некоторых образований мозга млекопитающих [6—11] с использованием иммунологических и биохимических методов.

Целью настоящего исследования было определение особенностей фракционного состава полипептидов функционально различных классов нейронов: релейных—сенсорных—(ННКТ) наружного коленного тела, гигантских мультиполярных (НГЯ) — интегративно-пусковых — [12] гигантоклеточного ретикулярного ядра продолговатого мозга и пирамидных (НСА)— ассоциативных — CA_3 — CA_1 полей гиппокампа.

Нейроны из ткани мозга 64 взрослых крыс линии *Wistar* извлекали при помощи модифицированного нами [13] метода микроманипуляции по Hyden [14]. Экстракцию полипептидов производили в одинаковых условиях: нейроны помещали в 0,5 мкл буфера, содержащего 2% ДДС-Na и 5% 2-меркаптоэтанола, приготовленных на 0,0625 М трис-HCl с pH 6,8. Для каждого анализа требовалось по 20 НГЯ, или 25 НСА, или 30 ННКТ. Образцы термостатировали 30 мин при 60°.

Фракционирование образцов, сканирование электрофореграмм, обсчет полученных денситограмм и статистическую обработку проводили, как было описано ранее [15]. Всего были проанализированы 24 денситограммы для НГЯ, 22 — для НСА и 18 — для ННКТ.

При фракционировании на 15%-ных ПААГ определено 17 фракций полипептидов у НГЯ и по 15 фракций — у НСА и ННКТ (рисунок, табл. 1, 2).

При экстракции полипептидов в идентичных условиях найден целый ряд фракций, различающихся у каждого из исследованных классов нейронов по относительным концентрациям полипептидов в них и локализующихся также в низкомолекулярном диапазоне. Так, фракции с величиной M_r 20,3 кД (4) и с величиной M_r 10,8 кД (7) в НСА достоверно больше соответствующих им фракций (4) и (7) в НГЯ (более чем в 1,8 раз), не имея достоверных различий от тех же фракций у ННКТ. Фракции с M_r 16,2 кД (5) и с величиной M_r 12,3 кД (6) у НСА достоверно превосходят соответствующие им фракции у ННКТ и НГЯ (достоверно не различаю-

щихся) более чем в 1,6 раз. Достоверно больше содержится полипептидов

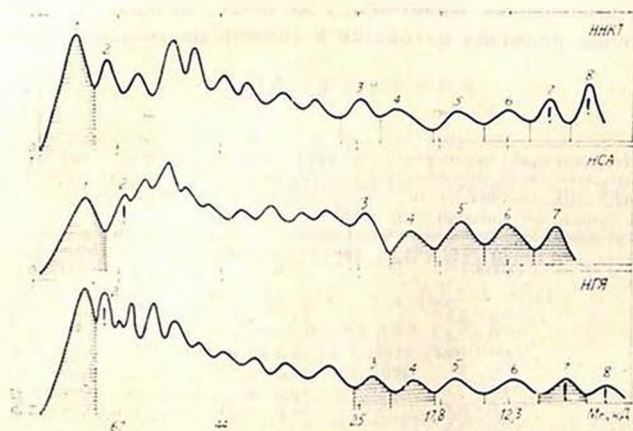


Рис. Специфические для указанных классов нейронов полипептиды найдены в основном в низкомолекулярных фракциях. В НГЯ это полипептиды с M_r 8,8 кД из фракции (8), а ННКТ — с M_r 9,5 кД (8). В НГЯ преобладают полипептиды с M_r 10,7 кД из фракции (7), а в ННКТ — с M_r 11,2 кД (7); НСА в большей мере присущи полипептиды с M_r 64,6 кД (2), а для НГЯ — 70,6 кД (2).

Таблица 1

Подвижности R , полипептидных фракций гигантских мультиполярных нейронов продолговатого мозга, релейных нейронов таламуса и пирамидных нейронов гиппокампа (в относительных единицах $\times 10^{-3}$, получены делением миграционных расстояний каждой полипептидной фракции к таковому цитохрома С).

№ пика	Релейные нейроны (ННКТ)	Пирамидные нейроны (НСА)	Гигантские мультиполярные нейроны (НГЯ)
1	83,0 $\pm$ 11,3	106,0 $\pm$ 8,1	98,0 $\pm$ 9,1
2	148,0 $\pm$ 14,4 (2)	176,0 $\pm$ 11,0 (2)	132,0 $\pm$ 9,8 (2)
3	211,0 $\pm$ 16,3	221,0 $\pm$ 12,8	162,0 $\pm$ 9,9
4	290,0 $\pm$ 17,0	271,0 $\pm$ 12,8	192,0 $\pm$ 10,6
5	331,0 $\pm$ 15,6	306,0 $\pm$ 12,9	236,0 $\pm$ 11,6
6	388,0 $\pm$ 16,4	350,0 $\pm$ 12,3	276,0 $\pm$ 12,0
7	445,0 $\pm$ 20,3	418,0 $\pm$ 11,7	333,0 $\pm$ 10,3
8	521,0 $\pm$ 21,1	476,0 $\pm$ 14,3	380,0 $\pm$ 10,0
9	590,0 $\pm$ 20,4	546,0 $\pm$ 16,1	448,0 $\pm$ 10,9
10	679,0 $\pm$ 18,7	609,0 $\pm$ 15,3	523,0 $\pm$ 12,7
11	756,0 $\pm$ 20,1	682,0 $\pm$ 14,0	610,0 $\pm$ 12,0
12	891,0 $\pm$ 16,1	790,0 $\pm$ 11,1	697,0 $\pm$ 11,4
13	1000 $\pm$ 0	904,0 $\pm$ 7,1	793,0 $\pm$ 7,9
14	1087,0 $\pm$ 7,9 (7)	1000 $\pm$ 0	893,0 $\pm$ 6,2
15	1176,0 $\pm$ 12,2 (8)	1104,0 $\pm$ 7,5 (7)	1000 $\pm$ 0
16			1113,0 $\pm$ 8,4 (7)
17			1214,0 $\pm$ 11,9 (8)

в фракциях с величиной M_r 24,4 кД (3) у НСА и ННКТ (достоверно не различающихся) по сравнению с таковой НГЯ. И, наконец, достоверно различаются по относительным концентрациям полипептидов фракции M_r 75,3 кД (1) всех трех классов нейронов: максимальна она у НГЯ, меньше —

у ННКТ и минимальна — у НСА.

Наши данные подтверждают работы [1, 2] на идентифицированных нейронах беспозвоночных животных, у которых основные качественные и количественные различия находятся в области низкомолекулярных

Таблица 2

Относительные концентрации полипептидов во фракциях у гигантских мультиполярных нейронов продолговатого мозга, релейных нейронов таламуса и пирамидных нейронов гиппокампа (в относительных единицах $\times 10^{-3}$, получены делением площади каждого пика на денситограмме к суммарной площади всей денситограммы).

№ пика	Релейные нейроны (ННКТ)	Пирамидные нейроны (НСА)	Гигантские мультиполярные нейроны (НГЯ)
1	143,0 $\pm$ 10,7 (1)	87,0 $\pm$ 11,1 (1)	184,0 $\pm$ 11,3 (1)
2	92,0 $\pm$ 8,8	84,0 $\pm$ 5,5	105,0 $\pm$ 7,3
3	77,0 $\pm$ 7,2	88,0 $\pm$ 9,6	75,0 $\pm$ 5,6
4	135,0 $\pm$ 10,4	99,0 $\pm$ 5,5	94,0 $\pm$ 8,5
5	112 $\pm$ 9	83,0 $\pm$ 8,7	96,0 $\pm$ 10,0
6	74,0 $\pm$ 7,7	80,0 $\pm$ 6,3	91,0 $\pm$ 7,8
7	63,0 $\pm$ 6,1	55,0 $\pm$ 3,5	63,0 $\pm$ 6,1
8	50,0 $\pm$ 5,8	60,0 $\pm$ 6,2	49,0 $\pm$ 3,4
9	44,0 $\pm$ 5,3	54,0 $\pm$ 4,7	48,0 $\pm$ 4,7
10	42,0 $\pm$ 5,3 (3)	56,0 $\pm$ 4,2	43,0 $\pm$ 4,0
11	30,0 $\pm$ 4,7 (4)	54,0 $\pm$ 5,3 (3)	44,0 $\pm$ 5,2
12	26,0 $\pm$ 5,3 (5)	37,0 $\pm$ 3,6 (4)	28,0 $\pm$ 2,7 (3)
13	29,0 $\pm$ 5,2 (6)	49,0 $\pm$ 6,1 (5)	20,0 $\pm$ 2,3 (4)
14	31,0 $\pm$ 4,3 (7)	46,0 $\pm$ 4,5 (6)	24,0 $\pm$ 2,9 (5)
15	42,0 $\pm$ 6,6	42,0 $\pm$ 7,2 (7)	27,0 $\pm$ 3,0 (6)
16	—	—	21,0 $\pm$ 2,8 (7)
17	—	—	12,0 $\pm$ 2,0

белков и менее выраженные — в высокомолекулярных. В работах по определению особенностей белкового состава иммунологическими и биохимическими методами клеток Пуркинье крысы и мыши также была показана их локализация преимущественно в низкомолекулярной области — M_r 23 кД [3] и M_r 27 кД [5], и в меньшей степени — высокомолекулярной с M_r 74 кД [3]. Таким образом, данные литературы в сочетании с результатами нашего исследования развивают положение о том, что специфика фракционного состава полипептидов нейронов различных классов связана с их морфофункциональными особенностями.

SOME PECULIARITIES OF COMPOSITION OF THREE DIFFERENT GROUPS NEURONS OF RAT BRAIN

Veretennikov N.A., Leontovich T.A.

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

Specific polypeptides were identified in three different groups of rat brain neurons: magnocellular multipolar neurons of *n. reticularis gigantocellularis*, relay sensory neurons of *corpus genicularis lateralis* and pyramidal neurons of the pyramidal layer of CA₃-CA₅ fields of hippocampus. Material was collected by modified free hand neuron dissection method and analyzed by SDS slab gel microelectrophoresis. Specific polypeptides were detected for every class of

investigated neurons. Their molecular masses were mostly in the range 8.8-24.3 kD, though a small fraction with molecular weights of 64.6-75.3 kD was also detected.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gainer H. *Anal. Biochem.*, v. 44, N2, p. 589—605, 1971.
2. Loh Y.P., Peterson R.P. *Brain Res.*, v. 78, N 1, p. 83—96, 1974.
3. Schlichter D.J., Detre J.A., Asward D.W., Chehra I.B., Greengard P. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci.*, v. 77, N 9, p. 5537—5541, 1980.
4. De Camilly P., Miller P.E., Levitt P., Walter U. *Neuroscience*, v.11, N4, p.761—817, 1984.
5. Yamakuni T., Usui H., Iwanaga T., Odani S., Takahashi Y. *Neurosci. Lett.*, v. 45, N 3, p. 235—240, 1984.
6. Barnstable C. *Nature*, v. 286, N 570, p. 231—235, 1980.
7. McKay R., Hockfield S. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 79, N 21, p. 6747—6751, 1982.
8. Herrup K. *Trends Neurosci.*, v. 223, N 10, p. 361—362, 1984.
9. Levitt P. *Science*, v. 7, N 4633, p. 299—301, 1984.
10. Fujita S.C., Mori K., Imamura K., Obata K. *Brain Res.*, v. 326, N 21, p. 192—196, 1985.
11. Yats C.M., Laslo I., Pink G., Hastings I., Boyd J., James K. *Neuroscience*, v. 18, N 1, p. 183—191, 1986.
12. Леонтович Т.А. Нейронная организация подкорковых образований переднего мозга, М., Медицина, 1978.
13. Микичур Н.И., Веретенников Н.А. — В сб.: Новые методы для медицинской практики и медико-биологических исследований (под ред. Ю.П. Никитина), с. 50—52, Новосибирск, ред.-изд. отдел СО АМН СССР, 1983.
14. Hyden H. *Nature*, v. 184, N 4684, p. 433—435, 1959.

Поступила 20.03.1989

УДК 612.82.3.018:612.822.3.001.6

ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ГАСТРИНОПОДОБНОГО ПЕПТИДА В МОЗГУ КРОЛИКОВ ПРИ ПИЩЕВОМ ПОВЕДЕНИИ, ВЫЗВАННОМ СТИМУЛЯЦИЕЙ ЛАТЕРАЛЬНОГО ГИПОТАЛАМУСА

Громов А. И., Громова Н.В., Судакова С.К.

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

В ЦНС множества видов животных, стоящих на разных эволюционных ступенях (от червей до человека), обнаружена иммунореактивность к антисывороткам, реагирующим с гастрином [1—5]. Однако функции гастриноподобного материала в ЦНС до настоящего времени остаются до конца не выясненными.

На основании электрофизиологических и поведенческих экспериментов было сделано предположение, что пищевое мотивационное возбуждение, достигая нервных клеток коры мозга, вызывает активацию их генетического аппарата и синтез гастриноподобного пептидного фактора [6]. Нарушение данного процесса либо при подавлении реализации генетической информации в ЦНС внутрижелудочковым введением блокаторов синтеза белка [7], либо при связывании гастриноподобного фактора введением антигастриновых антител [8] приводит к подавлению возможности формирования пищевого поведения. Исходя из этого, можно думать о том, что уровень гастриноподобного фактора ЦНС изменяется в зависимости от состояния функциональной системы питания.

Задачей данной работы было определение гастриноподобной иммунореактивности в сенсомоторной коре мозга и гипоталамусе кроликов после стимуляции латерального гипоталамуса, вызывающей пищевое поведение, а также после внутрижелудочкового введения блокатора синтеза циклогексимида. Гастриноподобную иммунореактивность определяли также в жидкости, перфузируемой через боковые желудочки мозга кроликов до и во время пищевого поведения, вызванного стимуляцией латерального гипоталамуса.

Эксперименты были проведены на 3 группах кроликов-самцов породы шиншилла массой 2,5 кг (по 3 животных в каждой группе): 1 — кролики, имевшие свободный доступ к пище; 2 — кролики, имевшие свободный доступ к пище, которым в течение 40 мин перед извлечением мозга наносили электрические стимуляции латерального гипоталамуса; 3 — предварительно накормленные кролики, которым в боковые желудочки мозга вводили 85 мкг/кг циклогексимида и наносили электрические стимуляции латерального гипоталамуса до полного подавления пищевых реакций животного. Известно, что введение такой дозы антибиотика оказывает

наиболее выраженное действие на пищевые реакции кроликов [7] при подавлении синтеза белка в мозгу через 1 ч после введения на 70—90% [9—10].

У всех кроликов извлекали мозг и выделяли по 0,1—0,2 г ткани сенсомоторной коры и гипоталамуса. Затем к ткани мозга добавляли мединаловый буфер (рН 8,4) из расчета 1 мл на 100 мг ткани и гомогенизировали до получения тонкой суспензии. После этого гомогенат помещали в водяную баню на 10 мин, после чего производили центрифугирование при 4500 g в течение 5 мин. Дальнейшее исследование проводили в сериях разведения надосадочной жидкости 1 : 100, 1 : 100 и 1 : 1000 методом конкурентного радиоиммунного анализа по следующей схеме: 1) приготовление трех групп растворов — «Т групп» — 100 мкл раствора ^{125}I гастрина; «С групп», содержащих 100 мкл раствора ^{125}I гастрин, 100 мкл стандартного раствора гастрин и 300 мкл антигастриновой антисыворотки; «Сх групп», содержащих 100 мкл раствора ^{125}I гастрин, 100 мкл раствора, приготовленного ранее из мозга исследуемых кроликов и 300 мкл антигастриновой антисыворотки; 2) инкубация в течение 2 ч при температуре 18—25°; 3) добавление во все пробирки (кроме «Т групп») 1 мл преципитирующего раствора, содержащего полиэтиленгликоль, азид натрия, буфер и нерастворимый комплекс из овечьих антикроличьих γ -глобулинов и неиммунных γ -глобулинов кролика; 4) инкубация в течение 15 мин при температуре 18—25°; 5) центрифугирование пробирок (кроме «Т групп») при 4000 g в течение 15 мин и отделение супернатанта; 6) измерение радиоактивности преципитата на γ -счетчике; 7) расчет содержания гастриноподобного пептида в исследуемых пробах.

Данный раздел работы выполнен с использованием методики, реактивов и оборудования, представленного фирмой «Орис индустри С.А.» (Франция). Эксперименты по определению гастриноподобной иммунореактивности в перфузируемой через желудочки мозга жидкости проведены на 3 сытых кроликах-самцах массой 2,5 кг. Каждому кролику вживляли биполярные нихромовые электроды в латеральный гипоталамус слева и двустольную стальную канюлю (диаметр кончиков 0,6 мм) в боковой желудочек мозга справа. По одному из каналов канюли в желудочки мозга кролика при помощи микронасоса подавали раствор Рингера со скоростью 30 мкл/мин. По второму каналу канюли с такой же объемной скоростью выводили содержимое желудочков. Через 1 ч после начала перфузии производили стимуляцию латерального гипоталамуса (10 мин), что приводило к постоянному потреблению в это время находящейся перед кроликами моркови. Из отводящего ствола внутрижелудочковой канюли собирали перфузат в течение 10 мин до начала стимуляции латерального гипоталамуса (I проба) и во время стимуляции (II проба). Далее определяли содержание в пробах гастриноподобного материала по методу «Орис индустри С. А.», описанному выше.

Результаты обрабатывали на персональном компьютере «Apriko KZEN-A 45 SD» (Англия), используя пакет программ «Microstat» (США).

Было обнаружено, что в сенсомоторной коре мозга интактного кролика содержится $100 \pm 5,5$ пг/г гастриноподобного материала, в ткани гипоталамуса — $45 \pm 3,2$ пг/г ткани. Стимуляции латерального гипотала-

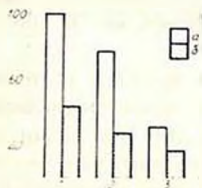


Рис. Уровень гастриноподобного пептида в сенсомоторной коре (1) и гипоталамусе (2) intactных кроликов (I) после стимуляции гипоталамуса (II) и у кроликов, которым был введен циклогексимида (III). По оси ординат — количество иммунореактивного материала в пг/г ткани

муса, сопровождающиеся пищевыми реакциями, приводили к снижению уровня гастриноподобного фактора как в коре, так и в гипоталамусе соответственно на 24 и 39% ($p < 0,05$). Значительное снижение уровня гастриноподобного материала (в 3,3 раза в коре и в 2,8 в гипоталамусе) было обнаружено у животных, у которых в результате введения 85 мкг/кг циклогексимида происходило полное подавление пищевых реакций на стимуляцию латерально-го гипоталамуса (рисунок).

В перфузируемом через боковые желудочки мозга сытых кроликов растворе Рингера нами не было обнаружено гастриноподобной иммунореактивности. Тем не менее, в перфузате, собранном во время потребления животными пищи, вызванного стимуляциями латерального гипоталамуса, было выявлено гастриноподобного фактора $53,5 \pm 22,1$ пг/мл, что соответствует выделению в боковые желудочки мозга гастриноподобного фактора со скоростью 1,8 пг/мин.

Таким образом, из полученных данных можно заключить, что в ЦНС сытого животного имеется запас гастриноподобного фактора, который быстро расходуется при реализации пищевого поведения. Под влиянием пищевого мотивационного возбуждения происходит синтез гастриноподобного фактора как в нервных клетках коры, так и гипоталамуса. Блокада белкового синтеза препятствует образованию достаточного количества гастриноподобного пептида и в результате этого становится невозможной реализация пищевого поведения. Наши эксперименты позволяют предположить, что при стимуляции латерального гипоталамуса происходит выделение гастриноподобного фактора из ткани мозга в перинейрональное пространство и СМЖ, что и обеспечивает совершение животными пищевого поведения, направленного на удовлетворение исходной метаболической потребности.

VARIATION OF GASTRIN-LIKE PEPTIDE LEVEL IN RABBIT BRAIN DURING FEEDING BEHAVIOUR INDUCED BY STIMULATION OF LATERAL HYPOTHALAMUS

Gromov A. I., Gromova N. V., Sudakov S. K.

Anokhin Institute of Normal Physiology,
USSR Academy of Medical Sciences, Moscow

The level of gastrin-like immunoreactivity was studied in rabbit brain by concurrent radioimmunoassay method. Stimulation of lateral hypothalamus, which produced feeding behaviour, led to decreased level of gastrin-like immunoreactivity in sensorimotor cortex and hypothalamus. A significant decrease in gastrin-like immunoreactivity was observed after ICV administration of cycloheximide, which inhibited hypothalamus-induced feeding reaction.

Gastrin-like immunoreactivity was detected in the fluid perfused through lateral ventricles during continuous feeding induced by stimulation of lateral hypothalamus. There was no gastrin-like material in the liquor of fed rabbits in the absence of hypothalamic stimulation or feeding.

ЛИТЕРАТУРА

1. Van der Haegen J.J., Signeau J.C., Gepts W. *Nature*, v. 256, p. 604—609, 1975.
2. Rehfeld J.F. *J. Biol.Chem.*, v. 253, p. 4022—4030, 1978.
3. Larson L.I., Rehfeld J.F. *Brain Res.*, v. 165, p. 201—218, 1979.
4. Dockray G.J., Duve H., Thorpe A. *Gener. Compar. Endocrin.*, v. 45, p. 491—496, 1981.
5. Nachman R.J., Holman G.M., Cook W.J., Haddon W.F., Ling N. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.140, p.357—364, 1986.
6. Судаков С.К. *Вестн. Акад. мед. наук*, N 2, с. 40—46, 1985.
7. Судаков С.К. *Журн. высш. нервн. деят-сти*, т. 35, с. 465—472, 1985.
8. Судаков С. К. *Журн. высш. нервн. деят-сти*, т. 36, с. 391—393, 1986.
9. Ашмарин И.П., Ключарева Л.А. *Ингибиторы синтеза белка*, Л, Медицина, 1975.
10. Takamatsu K., Tsukada Y. *Neurochem. Res.*, v. 10, p. 1371—1391, 1985.

Поступила 14.02.1989.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 612.8.015

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ ЭПР-СПИНОВОГО
ЗОНДИРОВАНИЯ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ
ТЕРМОИНДУЦИРОВАННЫХ ПЕРЕХОДОВ В ЛИПИДНОМ
МАТРИКСЕ МЕМБРАН СИНАПТОСОМ

Горбунов Н.В.

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

Для описания термоиндуцированных фазовых переходов в интактных мембранах синапсом мозга крысы были применены различные методические подходы, основанные на использовании липотропных спиновых зондов. Различие этих методических подходов обусловлено особенностью распределения молекулярных зондов (2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксил, 12-имоксилстеариновая кислота, этиловый эфир 7-имоксилстеариновой кислоты, метиловый эфир 5-доксилстеариновой кислоты) между водной фазой инкубационной среды, а также фазой «жидких» липидов и фазой геля липидного матрикса мембран. При сравнительном анализе показано, что наиболее информативным оказывается использование таких зондов, которые обладают способностью равномерно распределяться между различными областями липидного матрикса мембран (метиловый эфир 5-доксилстеариновой кислоты и этиловый эфир 7-имоксилстеариновой кислоты). Предлагается способ адекватной оценки изменения доли «жидких» липидов в интактных мембранах синапсом с помощью метода спиновых зондов, который может быть использован для изучения динамики микрогетерогенного состояния мембран в процессе реализации их специфических функций.

* * *

Исследования в различных направлениях мембранологии связаны с изучением микроструктурных изменений в биомембранах, что наблюдается при изменении физиологического состояния клетки. На основании полученных данных стало возможным создать модифицированную метаморфную жидко-мозаичную модель (metamorphik fluid mosaik model) [1], согласно которой образование и распад липидных доменов и кластеров является динамическим процессом, играющим важную роль в термоадаптации [2], пролиферации и адгезии клеток [1, 3, 4]; изменение микрогетерогенности липидного бислоя происходит также при воздействии различных химических агентов (иммуномодуляторов, анестетиков, канцерогенов, агонистов гормонов и нейромедиаторов).

Использование методов ЯМР-спектроскопии высокого разрешения и методов электронной микроскопии позволило установить, что сепарация липидов в клеточных мембранах связана с формированием мицелл из так называемой «гексагональной фазы II» [3, 4], образованием кластеров — особых структур с ограниченной подвижностью липидов (подобной их подвижности в фазе геля) [8, 9], а также появления доменов из нейтральных липидов и доменов, подобных липопротеиновым комплексам [1, 4].

Обширная информация о структурной организации биомембран полу-

чена методами молекулярного зондирования. Так, применение флуоресцентных зондов позволило продемонстрировать важную роль изменений микрогетерогенного состояния мембранных липидов в реализации специфических функций возбудимых клеток [7, 10]. Менее разработанными для данных целей остаются методы ЭПР-спектроскопии ввиду сложности интерпретации спектров спиновых зондов, локализованных в мембранных структурах, образованных липидами, различными по своей степени подвижности. Распространенный способ оценки [11] доли «жидких» липидов в бислое (то есть липидов с высокой подвижностью), кластеризованных и иммобилизованных белками липидов, основанный на специфике распределения зонда между водной фазой среды и «жидкой» фазой мембран, требует проведения дополнительных исследований на реконструированных мембранах.

Задача нашей работы состояла в проведении сравнительного анализа различных методических подходов, основанных на спиновом зондировании, к изучению динамики термоиндуцированных переходов в интактных мембранах. Для решения поставленной экспериментальной задачи был разработан и предложен способ оценки изменения доли «жидких» липидов в мембранах синапсом в условиях изменяющейся температуры среды.

Материалы и методы

Исследование проводили на мембранах синапсом мозга крыс линии *Wistar* массой 200—250 г. Для сравнения были использованы синапсомные мембраны из головного мозга минтая (*Theragra chalcogramma*), отловленного на глубине около 100 м в заливе Пасъет Японского моря (температура среды обитания 4°). Выделение мембран синапсом проводили по ранее отработанному методу [12]. Содержание мембранного белка в исследуемом методом спинового зондирования образце составляло 3 мг. Липосомы из яичного лецитина («Koch Light», Англия) получали методом впрыскивания микролитровым шприцем («Hamilton») спиртового раствора (0,1 г/мл) липида в буферный раствор (40 мМ трис-HCl, 100 мМ NaCl, pH 7,2) с последующим отмыванием диализом в течение 5 ч. Спиновые зонды вводили в мембранную суспензию в спиртовом растворе из расчета 1 моль зонда на 200 моль липидов; содержание спирта не превышало 0,2%. Спектры ЭПР регистрировали на малогабаритном спектрометре типа СЭПР-03 (ЛОЭП «Светлана», Ленинград).

Для зондирования липидного матрикса мембран были использованы липотропные зонды на основе НР: 2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксил (ТЕМПО), метиловый эфир 5-доксилстеариновой кислоты (М5ДС) — («Sigma», США), а также 12-имоксилстеариновая кислота, этиловый эфир 7-имоксилстеариновой кислоты* (12ИС, Э7ИС).

При оценке термоиндуцированных изменений фазового состояния липидов в мембранах использовали общепринятые параметры, рассчитанные из спектров ЭПР [3, 13—15] и характеризующие: 1 — упорядочен-

* Автор благодарит М.Л.Борина (МИТХТ, Москва) за предоставленные для проведения данной работы спиновые зонды на основе имоксильного фрагмента.

ность липидных ацилов (параметр A_{II}) в мембранном матриксе; 2 — температурозависимый уровень распределения зонда между водной фазой среды и «жидкой» фазой мембран (параметры α и $1 - \frac{A}{A_0}$); рис. 1, б, 2.

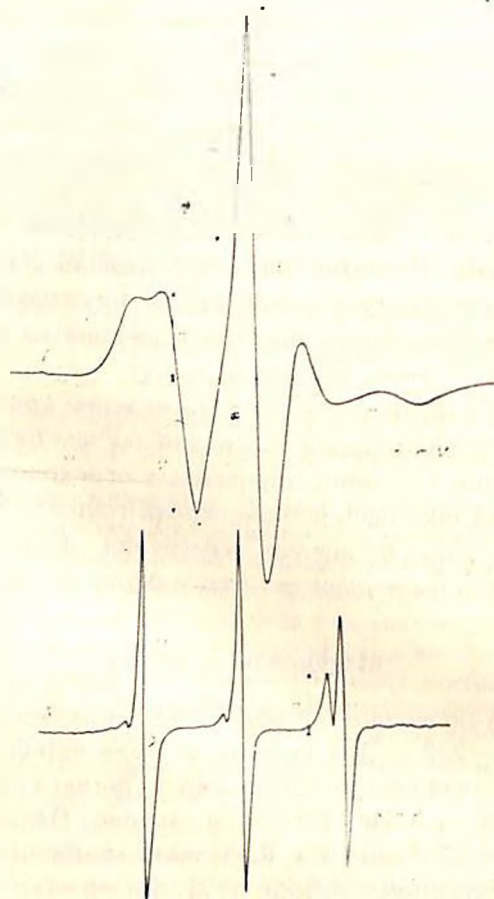


Рис. 1. Спектры ЭПР нитроксильных зондов в липосомах и мембранах синапсом: а — зонды на основе эфиров жирных кислот, б — ТЕМПО.

Непосредственную информацию о соотношении пулов липидов с высокой и низкой подвижностью можно получить при использовании липотропных зондов, обладающих способностью равномерно распределяться по всем зонам липидного матрикса мембран (например, М5ДС, Э7ИС). В этом случае спектр ЭПР будет представлять собой суперпозицию двух или более спектров спиновых зондов, локализованных в разных (по фазовому состоянию) зонах мембраны [3]. Анализ такого сложного сигнала представляется возможным в рамках математической модели, позволяющей оценить вклад каждого пула молекул зонда в интегральном спектре ЭПР [3], и требует дополнительных расходов на привлечение вычислительной техники.

В предварительных исследованиях, проведенных на липосомах из яичного лецитина, нами было показано, что для оценки доли «жидких» липидов в мембранах возможно использование параметра ϕ , который определяется (рис. 1) как отношение амплитуд спектральных линий «м» (зонд в «жидкой» липидной фазе [3]) и «М» (общее количество зонда

в липидном матриксе). Температурозависимая динамика изменения спектров ЭПР М5ДС в липосомах представлена на рис. 3; она отражает адекватным образом модификацию фазового состояния липидов, обусловленную изменением температуры среды. Действительно, как следует из рис. 4, где представлены кривые «плавления» лецитина в липосомах, построенные с использованием параметров α и φ , оценка доли «жидких» липидов в липосомах дает близкие значения при использовании этих независимых способов зондирования. Подобные термоиндуцированные переходы в аналогичной системе наблюдались ранее другими авторами, производившими измерение параметра A_{II} [14] и α [13].

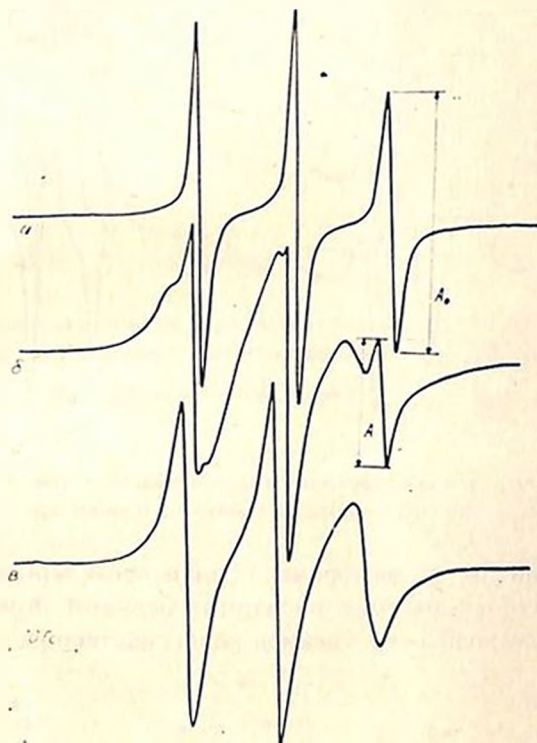


Рис. 2. Спектры ЭПР 12-имоксилстеариновой кислоты в суспензии мембран синапсом: *а* — при отсутствии в мембранах липидов с высокой степенью подвижности; *б* — при условиях термоиндуцированного фазового перехода в мембранах; *в* — при температурах выше термоиндуцированных фазовых переходов липидов в бислой мембран

Результаты и обсуждение

Как следует из данных, полученных для синапсом мозга крысы и представленных на рис. 5, характер температурных зависимостей параметров α , $1 - \frac{A}{A_0}$ и φ , позволяющих оценивать относительную долю «жидких» липидов в матриксе мембран, имеет сходство в широком интервале температур. Следует отметить, что величина параметра φ при температуре 40° (физиологическая температура крысы) не достигает своего максималь-

ного значения — 1,0, которое характерно для мембранных структур, образованных исключительно «жидкими» липидами, что имеет место при температурах выше фазового перехода липидов [15]. Это может свидетель-

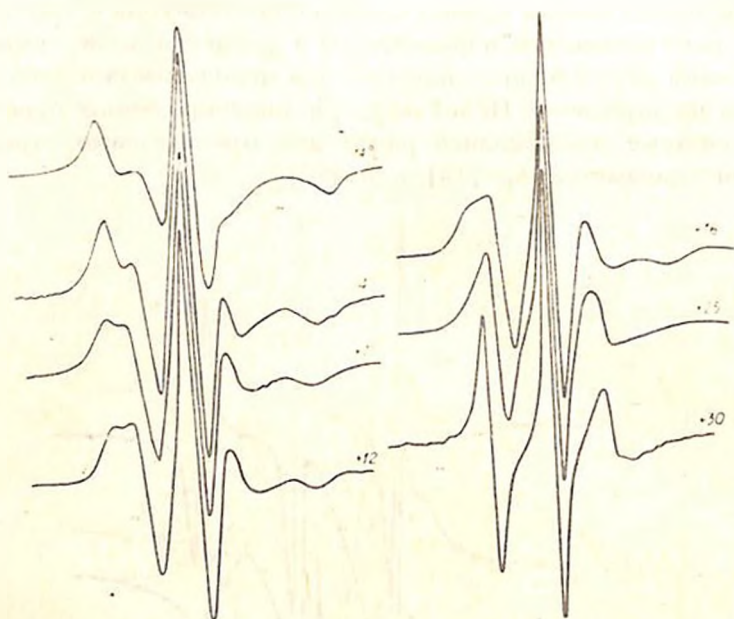


Рис. 3. Динамика температурозависимых изменений в спектре ЭПР метилового эфира 5-доксилстеариновой кислоты, включенного в липосомы из яичного лецитина.

ствовать о наличии в мембранах синапсом крысы некоторой доли липидных кластеров и иммобилизованных белками липидов, уровень содержания которых невозможно оценить непосредственно, используя зонды

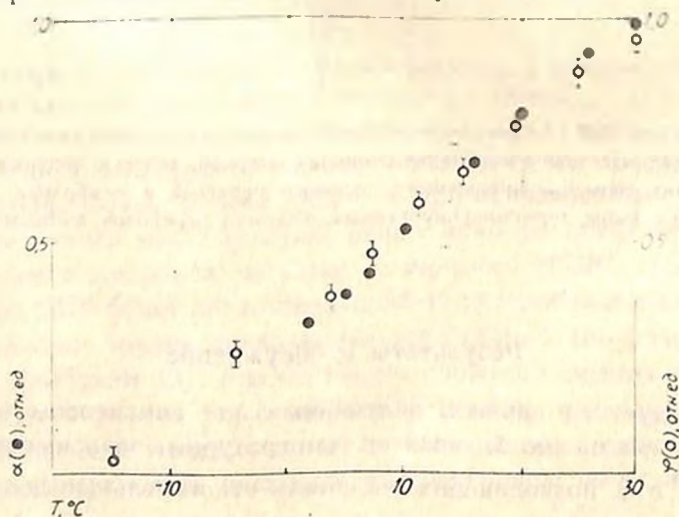


Рис. 4. Температурная зависимость параметра α (●) — для ТЕМПО и ϕ (○) — для метилового эфира 5-доксилстеариновой кислоты, введенных в суспензию липосом из яичного лецитина.

ТЕМПО и 12ИС (то есть определяя параметры α и $1 - \frac{A}{A_0}$), ввиду

распределения этих зондов в липидном матриксе мембран [13, 15].

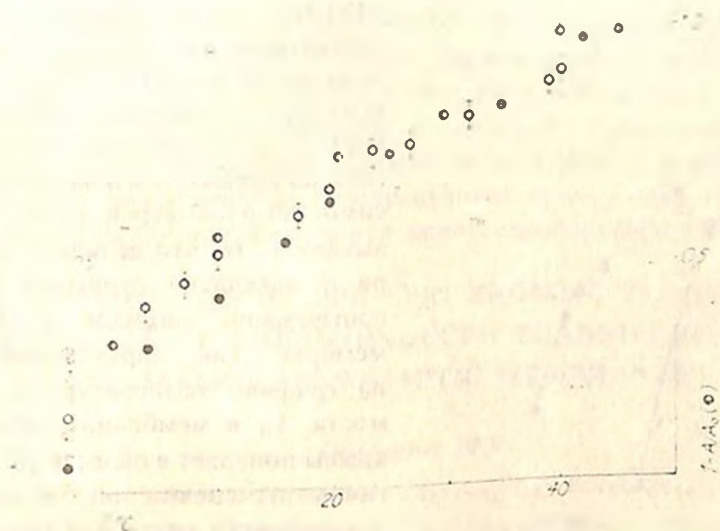


Рис. 5. Температурные зависимости характеристических параметров зондов, введенных в суспензию мембран синапсом мозга крысы α (◇) — для ТЕМПО; ϕ (○) — для этилового эфира 7-имоксилстеариновой кислоты; $1 - \frac{A}{A_0}$ (◐) — для 12-имоксилстеариновой кислоты

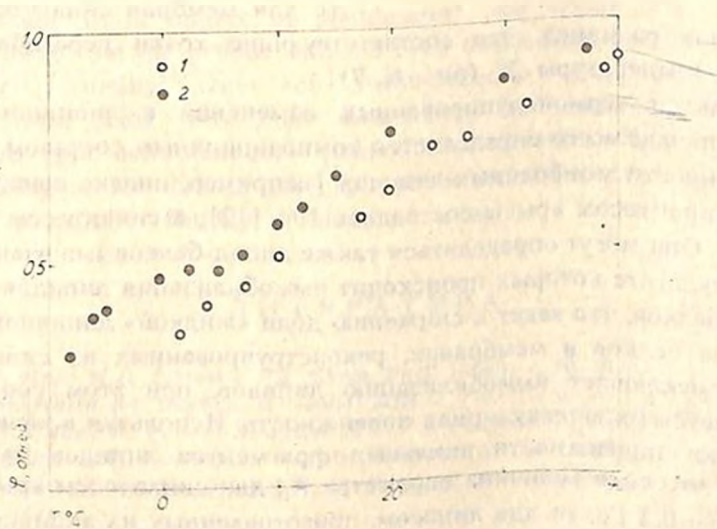


Рис. 6. Температурная зависимость параметра ϕ этилового эфира 7-имоксилстеариновой кислоты в мембранах синапсом мозга крысы (1) и мяты (2)

Сравнительная оценка температурозависимого изменения параметр ϕ для мембран синапсом крысы и мяты (рис. 6), характеризующихся различным липидным составом [16] и различиями температурных переходов в мембранах (рис. 6, 7), свидетельствует о чувствительности указанного параметра к различиям фазового соотношения мембранных липидов.



Рис. 7. Температурозависимое изменение параметра A_{II} этилового эфира 7-имоксилстеариновой кислоты в мембранах синапсом мозга крысы (1) и минтая (2)

с той лишь разницей, что соответствующие точки перегиба попадают в область температуры 2° (рис. 6, 7).

Характер термоиндуцированных изменений в липидном матриксе мембран прежде всего определяется композиционным составом и степенью ненасыщенности мембранных липидов (например, индекс ненасыщенности липидов синапсом крысы составляет 194 [12], а синапсом минтая — 311 [16]). Они могут определяться также липид-белковыми взаимодействиями, в результате которых происходит иммобилизация липидов в микроокружении белков, что ведет к снижению доли «жидкой» липидной фазы [3]. Отсутствие белков в мембранах, реконструированных из синапсомных мембран, исключает иммобилизацию липидов, при этом соответственно увеличивается их молекулярная подвижность. Используя в качестве критерия оценки подвижности ацильных фрагментов липидов параметр A_{II} , показали, что если величина параметра A_{II} для синапсом крысы при 40° равна $32,5 \pm 0,2$ Гс, то для липосом, приготовленных из липидных экстрактов синапсом, значение величины параметра, равное $32,5 \pm 0,2$ Гс, достижимо уже при температуре 32° . При температуре 23° (температура области структурного перехода синапсом крысы) величина параметра A_{II} для синапсом составляла $49,0 \pm 0,5$ Гс, тогда как для липосом, приготовленных из липидных экстрактов тех же мембран, значение структурного параметра A_{II} уменьшалось до $43,9 \pm 0,2$ Гс. Это указывает на значительное снижение энтальпии структурного перехода в липидных бислоях в отсутствие мембранных белков [17].

Полученные данные указывают на то, что латеральное фазовое

Совпадение результатов оценки характера термоиндуцированных структурных переходов в мембранах синапсом крысы и минтая по данным двух независимых способов расчета — по определению точек перегиба на кривых температурных зависимостей параметров A_{II} и φ — указывает на то, что величина параметра φ адекватно отражает фазовое соотношение липидов в матриксе мембран. Так, характерный излом на графике температурной зависимости A_{II} в мембранах синапсом крысы попадает в область 23° ; аналогичные изменения при той же температуре имеют место для кривой температурной зависимости параметра φ . Совпадение изломов на кривых температурных зависимостей параметров φ и A_{II} не зависят от природы мембран; этот же эффект имеет место для мембран синапсом минтая

распределение липидов, зависящее от композиционного состава мембран синапсом, может быть оценено с помощью параметра (φ), определяемого исходя из относительной интенсивности низкопольной «быстрой» компоненты спектра ЭПР эфиров 5-доксилстеариновой и 7-имоксилстеариновой кислот. Этот методический подход может быть использован при рассмотрении фазового состояния липидов в сложных процессах, связанных с проявлением функциональной активности возбудимых мембран, таких как экспрессия и латеральное перераспределение мембранных рецепторов, диссипация энергии, сопровождающая релаксацию возбуждения и т.п.

APPLICATION OF EPR SPIN PROBING TECHNIQUE IN STUDIES OF THERMOINDUCED TRANSITION IN LIPID MATRIX OF SYNAPTIC MEMBRANES

Gorbunov N.V.

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

Various methodological approaches involving lipophilic spin probes were used to describe thermoinduced phase transitions in intact synaptic membranes of rat brain. These methods are based on different distribution of spin probes (2,2,6,6-tetramethylpiperidino-1-oxyl, 12-ioxyl-stearic acid, ethyl ether of 7-ioxyl-stearic acid and methyl ether of 5-doxyl-stearic acid) in fluid lipids, gel-lipid phase (lipid matrix of membranes) and water. The comparative analysis showed that the probes with the even distribution in different areas of lipid matrix (methyl ether of 5-doxyl-stearic acid, ethyl ether of 7-ioxyl-stearic acid) were most informative for membrane thermotropic processes. An approach to adequate estimation of variation of fluid lipid fraction in intact biological membranes using spin probe technique was suggested. It can be applied to monitor fluidity of biomembranes.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cullis P.R., Hope M.J., Tilcock C.P.S. *Chem. Phys. Lipids*, v. 40, p. 127—144, 1988.
2. Pape L., Kristensen B.I. *Biochim. et biophys. acta*, v. 770, N1, p. 7—15, 1984.
3. De Kruijff B., Cullis P.R., Verkley A.J., Hope M.J., Von Hoogevest P., Taraschi T.F., Von Echteld C.J.A., Killian J.A., Rietveld A., Van der Steen A.T.M.—In: *Progress in Protein—Lipid Interactions* (eds. A.Watts, J.J.H.M. De Pont), p. 89—142, Elsevier, Amsterdam, N.-Y., Oxford, 1985.
4. Mountford C.E., Wright L.C. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 13, N5, p. 172—177, 1988.
5. Juliano R.L., Ling V. *Biochim. et biophys. acta*, v. 455, N2, p. 152—162, 1976.
6. Brockerhoff H., Brockerhoff S., Box L.L. *Lipids*, v. 21, N6, p. 405—408, 1986.
7. Crews F.T. *Psychopharmacology Bulletin*, v. 18, N4, p. 135—143, 1982.
8. Lee A.G. *Biochim. et biophys. acta*, v. 472, N2, p. 237—281, 1977.
9. Белоус А.М., Гордиенко Е.А., Розанов Л.Ф. — В сб.: *Замораживание и криопротекция*, с. 16—29, М., МГУ, 1987.
10. Бергельсон Л.Д. — В сб.: *Материалы V Всесоюзного биохимического съезда*, с. 221—222, М., Наука, 1985.
11. Tyurin V.A., Kagan V.E., Shukolyukov S.A., Klaan N.K., Novikov K.N., Azizova O.A.J. *J. of thermal Biology*, v. 4, p. 203—208, 1979.

12. Тюрин В.А., Горбунов Н.В. Журн. эволюц. биохимии и физиологии, №6, с. 591—594, 1983.
13. Polnaszek C.F., Shreier Sh., Butler K.W., Smith J.C.P. J. Amer. Chem. Soc., v. 100, p. 8223—8232, 1978.
14. Твердислав В.А., Тихонов А.Н., Яковенко Л.В. — В сб.: Физические механизмы функционирования биологических мембран, с. 73—87, МГУ, 1987.
15. Ерин А.Н., Горбунов Н.В., Скрыпин В.И., Каган В.Е., Прилипко Л.Л. Биологические науки, МГУ, №1, с. 10—16, 1987.
16. Крепс Е.М., Тюрин В.А., Челомин В.П., Горбунов Н.В., Наливаева И.Н., Тюрина Ю.Ю., Аврова Н.Ф., Каган В.Е. Журн. эволюц. биохимии и физиологии, т. XXIII, №4, с. 461—467, 1987.
17. Papahadjopoulos D., Moskarello M., Eylar E.H., Isac T. Biochim. et biophys. acta, v. 401, №3, p. 317—335, 1975.

Поступила 11.03.1989

УДК 615.471.03:616—074:543.544+616—073.584

О ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ВОЗМОЖНОСТЯХ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ В ПСИХИАТРИИ *

Дмитриев М.Т., Малышева А.Г., Растянинников Е.Г.

*Институт общей и коммунальной гигиены
им. А.Н.Смечина АМН СССР, Москва*

Установлено присутствие в продуктах жизнедеятельности больных с психическими расстройствами предельных углеводородов и их изомеров, нафтоновых, ароматических углеводородов, серу- и азотсодержащих соединений, эфиров, спиртов, альдегидов, кетонов, кислород- и хлорсодержащих соединений. Общее количество идентифицированных специфических соединений составляет несколько тысяч. Изучение механизмов психических расстройств на молекулярном уровне и идентификация метаболитов мозга может существенно приблизить к инструментальной, объективной диагностике этих заболеваний. Актуальной задачей является создание компьютерного банка хромато-масс-спектрометрических данных, характеризующих связи между содержанием специфических соединений в различных биологических средах и психическими заболеваниями. Банк данных позволит также выявить влияние загрязнения окружающей среды (токсикантов) на распространенность психических заболеваний.

* * *

В современной медицине наиболее эффективными признаются методы исследования на молекулярном уровне. Как было установлено во многих работах [1—3], молекулы, наряду с клетками, могут рассматриваться в качестве основных структурных единиц организма. Между различными макросистемами организма происходит непрерывный обмен молекул, часть которых выделяется в окружающую среду с продуктами жизнедеятельности [4, 5]. Нарушение же равновесия между макросистемами в предпатологическом состоянии или при заболевании приводит и к нарушениям в обмене молекулами. Для различных состояний организма и заболеваний характерны свои составы выделяемых специфических химических соединений, а также интенсивности их выделения [6]. На основании анализа состава таких веществ в последние годы разработаны эффективные методы хромато-масс-спектрометрической диагностики туберкулеза [7], панкреатита, цирроза печени, энзимопатии [8], гинекологических и стоматологических заболеваний [9, 10]. Этим успехам способствовало усовершенствование масс-спектрометрической аппаратуры, в частности разработка устройств для подготовки, концентрирования и анализа биопроб, ввода их в хромато-масс-спектрометр, более широкое использование электронно-вычислительной техники [11]. В диагностике психических заболеваний объективные инструментальные методы используются недостаточно, и это приводит к неоднозначности результатов такого диагностирования и к ошибкам при установлении связи их результатов с заболеваемостью. Еще в ранних руководствах указывалось на значительные аномалии у больных с психическими расстройствами в составе пота, мочи, слюны

(при неврастении, истерии, эпилепсии и др.) [12]. Недавно было установлено, что при шизофрении в выдыхаемом воздухе появляются в значительных количествах предельные углеводороды [13]. Специфические соединения выдыхаются и при эпилепсии.

Превращения химических веществ в биохимических процессах играют важнейшую роль в жизнедеятельности клеток мозга. Воздействием химических веществ, выделяемых глиальными клетками, управляется рост нейробластов, адгезия взаимораспознаваемых клеток, деятельность факторов роста нервов, способствующая выживанию нейронов, и возникновение нервных молекулярных меток с аксонами нервных клеток. Активация выделения химических веществ, в частности медиаторов, обуславливает проводимость синапсов. Иммунохимические реакции также связаны с синтезом и выделением веществ-коннекторов. В последние годы все более утверждается мнение, что если в организме животных или растений синтезируются какие-либо биологически активные соединения (природные стимуляторы), роль которых еще не ясна, то нельзя говорить об их бесполезности. Иногда вклад таких веществ в жизнедеятельность организма может быть весьма значительным [14].

Эндогенные химические соединения, вырабатываемые в мозгу и обладающие психотропным и анксиолитическим действиями, могут иметь большое диагностическое значение. При психических заболеваниях возможно спонтанное включение нейронов, что также может вызываться выделением специфических веществ.

У больных эндогенными психозами, находящимися в состоянии депрессии, выявлено увеличение активности процессов ПОЛ биомембран; образующиеся при этом вещества определяют нарушения в тканях мозга при психических заболеваниях. Эти химические соединения, несомненно, поступают в кровеносную систему, а затем, естественно, в выдыхаемый воздух и другие продукты жизнедеятельности. Обнаружение таких веществ открывает широкие диагностические возможности в психиатрии. Для идентификации таких метаболитов наиболее пригоден метод хромато-масс-спектрометрии, который наиболее эффективен для определения молекулярного состава различных биологических материалов, таких как выдыхаемый воздух, кровь, моча, пот, слюна, кал, гомогенизированные биологические материалы, жидкости, смывы, ногти, волосы [15].

Для определения специфических веществ в биологических средах и жидкостях пациентов мы использовали хромато-масс-спектрометр LKB-2091 (Швеция) с системой обработки данных LKB-2130. Предварительная подготовка проб биологических жидкостей (крови, мочи, слюны, смывов и др.) для хроматографического анализа осуществлялась методом, сочетающим газовую экстракцию с адсорбционным концентрированием, который позволяет достичь высокой чувствительности определения [16, 17].

Биологические жидкости или их водные растворы помещали в поглощающий прибор I (рис.1, а), к отводящему патрубку которого подсоединяли концентрирующую трубку 3 длиной 20 см и внутренним диаметром 4 мм с сорбентом тенаксом (поли-2,6-дифенил-пара-фениленоксидом). Поглощающий прибор представляет собой U-образную трубку с впаянным в виде пластины пористым стеклянным фильтром. Стеклянный фильтр

сделан из спекшейся массы стекла с различными величинами пор. Сорбент тенакс, использовавшийся для концентрирования проб, характеризуется высокой термостабильностью и умеренной адсорбционной активностью, что позволяет легко и количественно десорбировать с его поверхности высшие углеводороды вплоть до октадекана при $280-300^{\circ}$, химической инертностью к большинству органических соединений, гидрофобностью. Последнее качество (удельная влагоемкость всего 6 мг/г) крайне важно, так как при исследовании биологических жидкостей приходится сталкиваться с трудной задачей отделения от определяемых веществ большого количества воды, которая сильно мешает анализу или даже делает его невозможным.

Специфические органические соединения из биологических жидкостей извлекали, продувая через пробу гелий высокой чистоты. Скорость газа устанавливали на уровне 200 мл/мин с помощью игольчатого вентиля 4 и измеряли ротаметром 5 на выходе из поглотительной трубки. Барботируя через биологические смывы, гелий выдувал летучие растворенные вещества, которые попадали в заполненную тенаксом трубку, в которой происходила их адсорбция. Поскольку пары воды слабо удерживаются тенаксом, большая их часть выносилась из поглотительной трубки током гелия. По истечении определенного времени трубку снимали и помещали в электропечь. Адсорбированные тенаксом вещества десорбировали, нагревая поглотительную трубку 3 до температуры $200-300^{\circ}$ (рис.1, б). Десорбированные

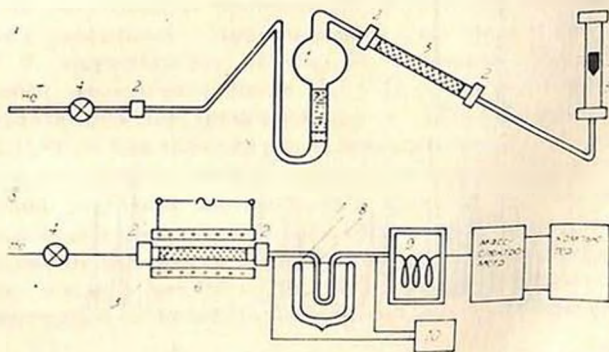


Рис.1. Схема установок для извлечения специфических веществ из биопробы (а) и их термодесорбции (б) для хромато-масс-спектрометрического анализа: 1 — поглотительный прибор, 2 — металлические уплотнительные муфты, 3 — концентрирующая пробоотборная трубка с сорбентом, 4 — игольчатый вентиль тонкой регулировки, 5 — ротаметр, 6 — раздвижная электропечь, 7 — сосуд Дьюара с жидким азотом, 8 — металлический капилляр, 9 — хроматографическая колонка

вещества поступали в охлаждаемый жидким азотом узкий металлический капилляр. По окончании процесса термодесорбции капилляр размораживали и вещество вводили в капиллярную хроматографическую колонку длиной 50 см и внутренним диаметром 0,3 мм, обработанную силиконом

SE-30, которая соединялась с масс-спектрометром. Хроматографическое разделение в течение первых 5 мин проводили при комнатной температуре, затем температуру колонки повышали до 150° со скоростью 5° в мин.

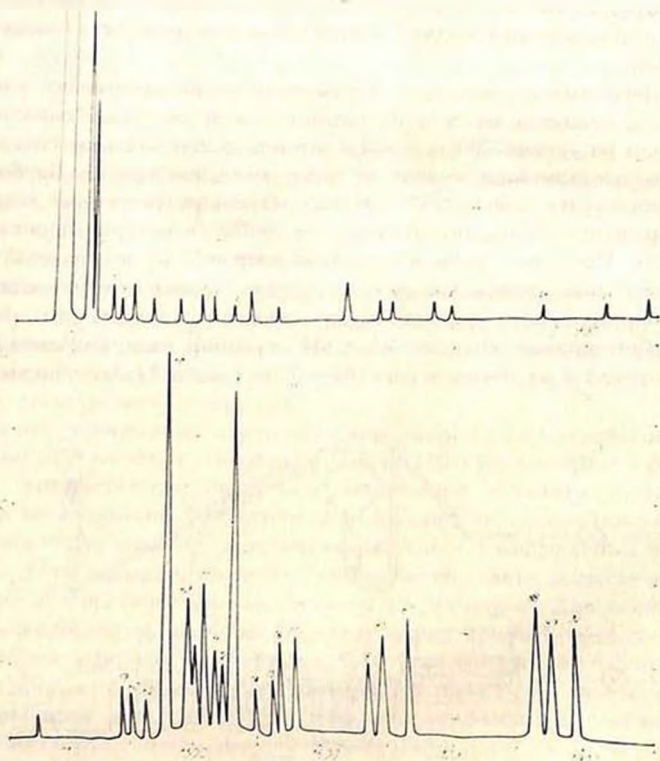


Рис.2. Часть масс-хроматограммы по полному ионному току выдыхаемого воздуха больного шизофренией. Идентифицированные соединения: 1— углекислый газ, 2— ацетальдегид, 3— ацетон, 4— изопрен, 5— изопентан, 6— этилмеркаптан, 7— пентан, 8— 2-метилпентан, 9— 3-метилпентан, 10— гексан, 11— метилциклопентан, 12— 2,4-диметилпентан, 13— триметиламин, 14— этилацетат, 15— 3-метилбутаналь, 16— бензол, 17— изопропиламин, 18— 2-пентанон, 19— 4-пентаналь, 20— циклогексан, 21— 2-метилгексан, 22— 3-метилгексан, 23— пентаналь, 24— 2,2,4-триметилпентан, 25— гептан, 26— метилциклогексан, 27— диметилсульфид, 28— триметилциклопентан, 29— 2,3,4-триметилпентан, 30— толуол, 31— пирролидин, 32— изобутилацетат, 33— 2,3-диметилгексан, 34— 2-метилгептан, 35— 1,3-диметилциклогексан, 36— 3-метилгептан, 37— гексаналь, 38— этилбутаноат, 39— 2,2,3-триметилпентан.

40— диметилциклогексан, 41— тетрахлорэтилен, 42— октан, 43—бутилацетат, 44— амилмеркаптан, 45— этилциклогексан, 46— 1,1,3-триметилциклогексан, 47— 2,5-диметилдоктан, 48— этилбензол, 49— м.п.-ксилол, 50— 2,3-диметилгептан, 51— 2-метилдоктан, 52— о-ксилол, 53—55— изомеры нонана, 56— 2,5,5-триметилгептан, 57— нонан, 58— изопропилбензол, 59,60, 62, 68—72— изомеры декана, 61— пропилциклогексан, 63— 2,6-диметилдоктан, 64— 2,3-диметилдоктан, 65— 1-метил-3-этилбензол, 66— 1,3,5-триметилбензол, 67— 4и-пропилгептан, 73— н-декан, 74—78,83— изомеры ундекана, 79— н-бутилбензол, 80— 1,3-диметил-5-этилбензол, 81— 1-метил-2и-пропилбензол, 82— 1,4-диметил-2-этилбензол, 84— алкен ундекана, 85— нональ, 86— 1,2,4,5-тетраметилбензол, 87— ундекан, 88, 89— изомеры додекана, 90— амилциклогексан, 91— деканаль, 92— додекан

На рис.2 в качестве примера приведена часть масс-хроматограммы пробы воздуха, выдыхаемого больным шизофренией. Для сравнения на рис.3 приведена часть масс-хроматограммы воздуха, выдыхаемого практически здоровым человеком. Сравнение рис. 2 и 3 показывает, что состав выдыхаемого воздуха больными шизофренией намного сложнее состава выдыхаемого воздуха здорового человека. Это видно при сопоставлении количества интенсивности пиков на обоих рисунках.

Разделенные компоненты смеси идентифицировали, сравнивая экспериментально полученные масс-спектры со спектрами библиотеки [18, 19]. Масс-спектр является строго специфической характеристикой конкретного вещества, наиболее информативной для его идентификации. На рис. 4 приведены масс-спектры типичных соединений для выдыхаемого воздуха больного шизофренией — триметиламина и изопропиламина (пики 13 и 17 на рис. 2, отсутствующие на рис. 3). Молекулы этих веществ имеют одинаковый элементный состав — C_3H_9N , но отличаются строением (структурная формула триметиламина — $(CH_3)_3N$, изопропиламина — $(CH_3)_2CHNH_2$). Как видно из рис. 4, масс-спектры этих молекул различны. Наиболее интенсивные пики каждой из трех групп ионов спектра имеют совершенно различные значения m/z (пики с m/z 15, 30 и 42 для триметиламина и пики с m/z 18, 29 и 44 для изопропиламина). Пики ионов с одинаковыми значениями m/z значительно отличаются интенсивностями (см. пики ионов с m/z 58 и 59). Таким образом, анализ масс-спектров позволяет провести практически однозначную идентификацию этих веществ.

Обследование нами нескольких десятков пациентов показало, что в выдыхаемом воздухе больных шизофренией может наблюдаться следующее содержание специфических соединений в $мкг/м^3$ (в скобках приведено содержание в норме): предельных углеводов — пентана 14560 (4920), гексана 1580 (526), октана 1220 (470), нонана и изомеров 705 (250), декана и изомеров 690 (230), ундекана и изомеров 510 (215), додекана и изомеров 505 (202); нафтеновых углеводов — метилциклопентана 1210 (460), триметилциклопентана 1100 (390), диметилциклогексана 725 (250), этилциклогексана 1040 (380), пропилциклогексана 740 (260), амилциклогексана 690 (256); ароматических соединений — толуола 4622 (1926), ксилола 2038 (784), этилбензола 4270 (1708), триметилбензола 70 (25), изопропилбензола 318 (123), бутилбензола 74 (31), 1-метил-3-этилбензола 374 (162), 1,3-диметил-5-этилбензола 65 (31); кислородсодержащих соеди-

нений — ацетальдегида 629 (242), гексаналя 201 (70), нонаняля 36 (14), деканяля 23 (11), ацетона 1854 (662), пентанона 53 (5), этилацетата 1624

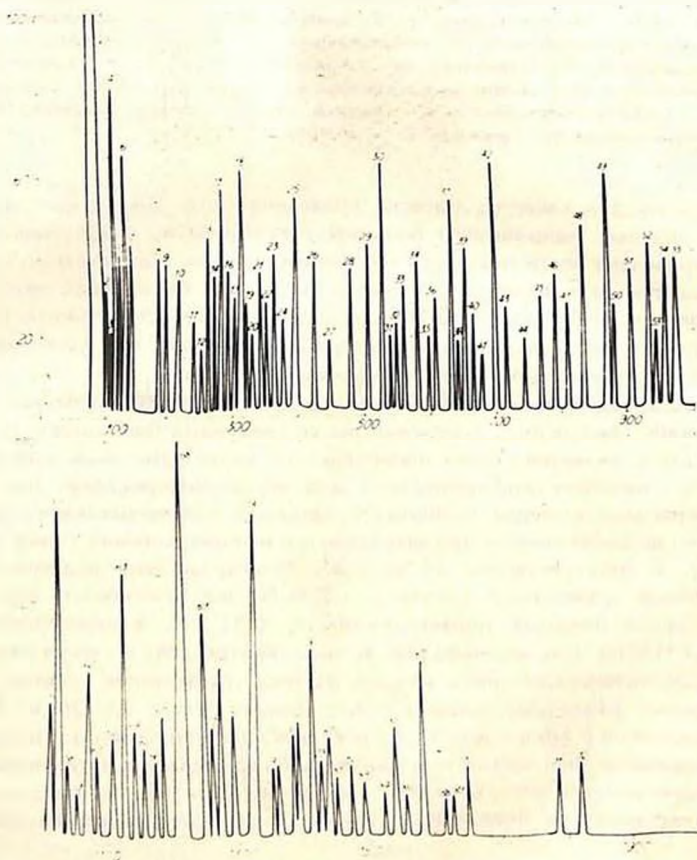


Рис.3. Часть масс-хроматограммы по полному ионному току выдыхаемого воздуха практически здорового человека. Наименования идентифицированных веществ приведены в подписи к рис.2

(706), бутилацетата 1160 (552), изобутилацетата 778 (324); серусодержащих соединений — этилмеркаптана 75 (5,2), диметилсульфида 88 (37), амилмеркаптана 31 (3,4); азотсодержащих соединений — изопропиламина 1466 (698), триметиламина 530 (210), пирролидина 8,3 (0,1); хлорсодержащих углеводородов — тетрахлорэтилена 549 (210); непредельных углеводов — изопрена 5670 (2700) и др.

Знание строения и количественного содержания этих метаболитов мозга при психических расстройствах может создать основы инструментальной, объективной диагностики этих заболеваний. Поэтому актуальной задачей является создание во Всесоюзном научном центре психического

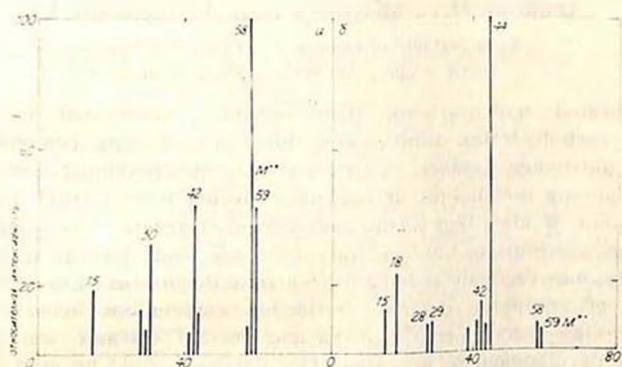


Рис.4 Масс-спектры типичных специфических соединений выдыхаемого воздуха больного шизофренией: триметиламина (а) и изопропиламина (б)

здоровья АМН СССР или в другом компетентном учреждении компьютерного банка хромато-масс-спектрометрических данных химических соединений, встречающихся в различных биологических материалах пациентов с психическими и другими заболеваниями. При хромато-масс-спектрометрическом исследовании биологического материала, полученного от больных, часто удается идентифицировать многие сотни специфических химических веществ. Расчеты показали, что с учетом лишь 500 специфических соединений можно диагностировать более 20 миллионов заболеваний [11], в то время как число известных болезней не превышает 10 тысяч, а количество симптомов — 100 тысяч. Использование хромато-масс-спектрометрического анализа биологических материалов при профилактических обследованиях людей может позволить обнаружить самые ранние изменения в организме, диагностировать психические заболевания и некоторые другие патологические изменения.

Созданный на основе результатов хромато-масс-спектрометрического анализа биологических материалов здоровых и больных людей банк данных различных специфических веществ может быть активно использован при поиске эффективных эндогенных психотропных и многих других лечебных препаратов. Такой банк данных был бы полезен при выявлении влияния загрязнений окружающей среды (токсикантов) на распространенность психических заболеваний. Кроме того, наличие банка таких данных позволит наиболее эффективно методом хромато-масс-спектрометрии диагностировать самые различные виды токсикомании, начиная с алкоголизма, и проводить судебно-психиатрические экспертизы.

Авторы выражают глубокую благодарность акад. АМН СССР О.В.Кербикову и член-корр. АН СССР И. А. Рапопорту за обсуждение работы и ценные советы.

DIAGNOSTIC POTENTIAL OF CHROMATO-MASS-SPECTROMETRY IN PSYCHIATRY

Dmitriev M.T., Malysheva A.G., Rastyannikov E.G.

*Sysin Institute of General and Communal Hygiene,
USSR Academy of Medical Sciences, Moscow*

Saturated hydrocarbons, their isomers, unsaturated naphthenic and aromatic carbohydrates, sulphur- and nitrogen-containing compounds, ethers, alcohols, aldehydes, ketones, oxygen- and chlorine-containing compounds were detected among metabolites of patients suffering from mental disorders. The total amount of identified compounds exceeded several thousands. Studies of molecular mechanisms of mental disorders and identification of brain metabolites may facilitate reliable instrumental diagnostics of these diseases. The creation of computer database reflecting correlations between results of chromat-mass-spectrometry and various mental diseases was proposed as a further development in this area. This database could be used to assess the effect of environmental pollution (toxics) upon distribution of mental diseases.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дмитриев М.Т., Растянников Е.Г., Малышева А.Г. *Вопр. мед. химии*, №6, с.122, 1982.
2. Ishizaka K. *Annual. Rev. Immunol.*, v.2, p.159, 1984.
3. Pauling L., Robinson A., Teranishy R., Cary P. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Biol. Sci.*, v.68, N10, p.2374, 1971.
4. Дмитриев М.Т., Растянников Е.Г., Малышева А.Г. *Лаб. дело*, N1, с.10, 1983.
5. Leibich H.M., Al-Babbilli O., Zlatkis A., Kim K. *Clin. Chem.*, v.21, p.1294, 1975.
6. Дмитриев М.Т., Растянников Е.Г., Малышева А.Г. *Лаб. дело*, N10, с.608, 1985.
7. Дмитриев М.Т., Растянников Е.Г., Малышева А.Г. *Пробл. туберкулеза*, №6, с.28, 1986.
8. Tonzetich I. *Arch. oral. Biol.*, v.16, p.587, 1971.
9. Дмитриев М.Т., Растянников Е.Г., Малышева А.Г. *Вопр. охраны материнства и детства*, т.31, №6, с.72, 1986.
10. Дмитриев М.Т., Растянников Е.Г., Малышева А.Г. *Стоматология*, N3, с.16, 1983.
11. Дмитриев М.Т., Малышева А.Г., Растянников Е.Г. *Медицинская техника*, N1, с.17, 1987.
12. Шелли Х. *Клинические исследования*, Петербург, вып.3, с.1248, 1910.
13. Dmitriev M.T., Rastyannikov E.G., Malysheva A.G., Volkov S.A. *Int. Labor.*, v.16, N5, p.40, 1986.
14. Дмитриев М.Т., Растянников Е.Г., Малышева А.Г. *Растительные ресурсы*, N1, с.79, 1986.
15. Дмитриев М.Т., Растянников Е.Г., Малышева А.Г. *Лаб. дело*, N4, с.223, 1986.
16. Витенберг А.Г., Иоффе Б. В. *Газовая экстракция в хроматографическом анализе*, Л., Химия, 1982.
17. Хахенберг Х., Шмидт А. *Газохроматографический анализ равновесной паровой фазы*, М., Мир, 1979.
18. Cornu A., Massot R. *Compilation of Mass Spectral Data*, London, Heyden and Son Ltd, Spectrum House, 1975.
19. Stenhagen E., Abrahamson S., McLafferty F.W. *Registry of Mass Spectral Data*, New York, Wiley-Interscience Publication, 1974.

Поступила 27.03.1989

ОБЗОРЫ

УДК 547.952 : 612.822.1

СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ ГАНГЛИОЗИДОВ

Аврова Н. Ф.

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

Ганглиозиды являются характерными компонентами мембран клеток вторичноротых животных (позвоночных и иглокожих). У позвоночных основным местом их локализации является нервная ткань. Быстрое развитие инструментальных методов анализа позволило в последние годы установить структуру десятков новых форм этих соединений, обогатило представления о структурном многообразии ганглиозидов. Установлено, что у позвоночных значительная часть этих соединений имеет в своем составе щелоче-лабильные (0-ацильные) группировки, выявлены ганглиозиды с длинной и разветвленной углеводной цепью. Для ганглиозидов иглокожих характерно нахождение остатков сиаловых кислот внутри цепи — сульфопроизводные сиаловых кислот. Блочность в структурной организации ганглиозидов удается проследить лишь в пределах одного и того же типа (у позвоночных).

По современным представлениям, ганглиозиды обладают нейритогенными и нейротрофическими свойствами, во многом определяют процессы межклеточного взаимодействия, дифференцировки клеток (особенно нервных), им свойственны адаптационные функции. Показано, что ганглиозиды являются рецепторами некоторых токсинов и вирусов, вопрос о том, входят ли они в состав рецепторов гормонов является спорным. Введение животным ганглиозидов с поврежденной НС способствует нормализации обмена веществ и улучшению поведенческих реакций. Изучение связанных со злокачественными опухолями антигенов ганглиозидной природы с помощью моноклональных антител открывает перспективы диагностики и, возможно, терапии ряда форм рака.

• • •

Ганглиозиды представляют собой гликофинголипиды, содержащие сиаловые кислоты, чаще всего НейАц или НейГли. Они являются самыми сложными липидами животных, характерными компонентами клеточных мембран позвоночных и иглокожих.

В последние годы интерес к этим соединениям неуклонно растет. За рубежом регулярно проводятся симпозиумы, посвященные различным аспектам изучения ганглиозидов, много внимания уделяется результатам исследования структуры и функциональной роли ганглиозидов и на международных нейрохимических съездах. В последние годы показано, что ганглиозиды обладают нейротрофическим и нейритогенным действием и способны оказывать лечебный эффект при их введении людям в качестве лекарственных веществ при периферических нейропатиях и некоторых других заболеваниях [1—5].

Среди выявленных к настоящему времени антигенов, связанных

Сокращения: гал—галактоза, глюк—глюкоза, глюкНац—N-ацетилглюкозамин, галНац—N-ацетилгалактозамин, НейАц—N-ацетилнейраминная кислота, НейГли—N-гликолинейраминная кислота, араб—арабиноза, мани—манноза.

с различными формами злокачественных опухолей, многие являются ганглиозидами, что также способствует повышенному интересу к этим соединениям [6, 7].

Непосредственное участие ганглиозидов в процессах межклеточного взаимодействия и рецепции постулировалось уже давно. В процессе поступательного развития научной мысли в некоторых случаях происходит пересмотр сложившихся представлений, острые дискуссии между представителями различных научных школ, что особенно ярко проявляется в исследованиях роли ганглиозидов в процессах рецепции биологически активных веществ.



Рис. 1. Строение гликофинголипидов позвоночных [9]

Бурное развитие инструментальных методов анализа, прежде всего жидкостной хроматографии высокого разрешения, ЯМР-спектроскопии, новых методов масс-спектрометрического анализа, позволило идентифицировать новые формы этих соединений, расшифровать структуру минорных фракций ганглиозидов.

Целью настоящей работы является освещение современных представлений о структурном многообразии и функциональной роли ганглиозидов.

Распространение и структура ганглиозидов

Ганглиозиды являются характерными компонентами мембран клеток вторичноротых животных (позвоночных и иглокожих), но не входят, по-видимому, в состав мембран клеток представителей других типов многоклеточных животных. Полученные нами данные [8] об отсутствии ганглиозидов в ганглиях кальмара и краба, представителей высокоорганизованных беспозвоночных согласуются с данными других авторов [9—11]. При изучении нервной ткани членистоногих недавно показано, что кислые гликофинголипиды у них имеют в своем составе вместо сиаловых кислот остатки других кислот [11].

Не выявлены ганглиозиды и у высших растений, грибов и водорослей, но они встречаются у некоторых патогенных бактерий, вирусов и простейших [12, 13].

Интересно проанализировать вопрос о том, можно ли выделить в составе ганглиозидов структурные блоки, как это удастся сделать при анализе строения соединений белковой природы. При всем огромном многообразии их форм ганглиозиды позвоночных могут быть сведены по строению к нескольким основным типам, при этом в составе различных

ганглиозидов данного типа присутствуют одни и те же моносахаридные последовательности, которые можно назвать блоками (рис. 1). Следует отметить, что еще лет 10 назад считалось, что сиаловые кислоты могут быть присоединены лишь к углеводным цепям ганглио- и неолacto- серии. При этом установлено, что ганглиозиды ганглио-серии преобладают в мозгу позвоночных, а неолacto- и другие серии — в экстракневральных органах (рис. 1). Однако в настоящее время показано исключительно большое разнообразие строения ганглиозидов и характера связи сиаловых кислот с олигосахаридной цепью.

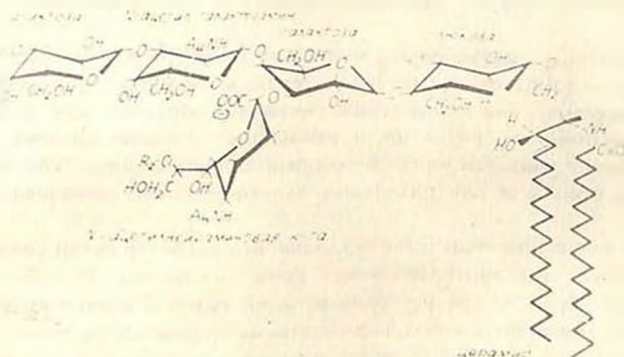


Рис. 2. Структура ганглиозида GM1 (основного моносиалоганглиозида мозга млекопитающих)

На рис. 2 представлено строение основного моносиалоганглиозида мозга млекопитающих — GM1. По номенклатуре Svennerholm [9] буква G означает ганглиозид ганглио-серии, буква M употребляется для обозначения моносиалоганглиозидов, D — для дисиало, T — трисиало, Q — тетрасиалоганглиозидов. Цифра 1 употребляется для обозначения ганглиозидов с четырьмя остатками гексоз, 2 — с тремя остатками, а 3 — с лактозилной (дисахаридной) группировкой.

В положении R_1 и R_2 у ганглиозида GM1 находятся атомы водорода. Если один из этих радикалов заменить на остаток сиаловой кислоты, то получим структурные формулы основных дисиалоганглиозидов GD1b и GD1a мозга млекопитающих, у основного трисиалоганглиозида GT1b 2 остатка сиаловых кислот связаны с внутренней галактозой, а 1 — с терминальной.

Для мозга низших позвоночных характерно высокое содержание тетра- и пентасиалоганглиозидов (с 4 и 5 остатками сиаловых кислот) [14, 15]. Кроме того, в настоящее время в мозгу рыб и эмбрионов птиц найдены гекса- и даже гептасиалоганглиозиды, которые представляют собой минорные фракции [16, 17].

В ганглиозидах неолacto-серии, характерных для большинства экстракневральных тканей и органов и присутствующих в нервной ткани как минорные компоненты, вместо галNaц в углеводной цепи находится

глюкНац и имеют место отличия в характере связи отдельных углеводных компонентов от ганглиозидов ганглио-серии (галβ1-4 глюкНацβ1-3 галβ1-4 глюк-церамид).

В настоящее время показано, что ганглиозиды могут иметь в своей основе и углеводную цепь глобо-серии (рис. 1). Из мышц цыпленка выделен и детально охарактеризован ганглиозид, к керамиду которого присоединена углеводная цепь из последовательно присоединенных остатков β-глюкозы, β-галактозы, α-галактозы, β-N-ацетилгалактозамина [18]. Сходные по строению ганглиозиды выделены и из других тканей млекопитающих и птиц [19]. α-Галактоза найдена и в составе ганглиозидов лягушки [20].

Описаны ганглиозиды, имеющие углеводную цепь лакто-серии. В отличие от ганглиозидов неолакто-серии, характерных для тканей взрослого организма, они характерны, главным образом, для ранних этапов онтогенетического развития, в мекониуме человека моносиалоганглиозид лакто-серии является одним из основных гликолипидов. Эти же ганглиозиды характерны и для различных злокачественных образований человека [7].

В последние годы было показано, что характер связи сиаловых кислот в молекуле ганглиозидов может быть различным. Это было показано, главным образом, при изучении нервной ткани и клеток крови. Сиаловые кислоты могут быть связаны с остатками галактозы не только по 3-му, но и по 6-му атому углерода, могут находиться в положениях, ранее казавшихся неприемлемыми (например, ганглиозиды GM1b, GT1a) [21—23]. Сиаловые кислоты могут быть связаны не только с галактозой, но и с N-ацетилглюкозамином и N-ацетилгалактозамином, причем могут находиться в различном положении при связи с этими остатками [24, 25]. В составе не только опухолей, для которых они особенно характерны, но и нормальных тканей млекопитающих, в том числе ткани мозга, показано наличие ганглиозидов, содержащих фукозу [26—28].

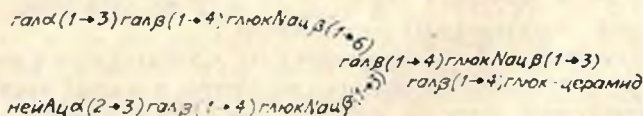


Рис. 3. Строение одного из ганглиозидов эритроцитов быка [87].

Но особенно представления о структурном многообразии ганглиозидов расширились благодаря тому, что было установлено наличие гликолипидов с длинной углеводной цепью и щелоче-лабильных соединений.

На рис. 3 представлена структура одного из ганглиозидов эритроцитов с 10 углеводными остатками. Повторяющаяся углеводная последовательность из димеров характерна для многих гликоконъюгатов, в том числе гликолипидов. Входит эта последовательность и в состав так называемых

макрогликолипидов, содержащих до 59 остатков углеводов в своей молекуле. В терминальном положении некоторых из этих гликолипидов (но не всех) обнаружена сиаловая кислота [29, 30]. Отщепление сиаловых кислот от молекул сложных гликолипидов в ряде случаев демаскирует углеводные последовательности, определяющие групповые свойства крови.

Щелоче-лабильные ганглиозиды представляют собой гликолипиды, имеющие в своем составе О-ацильные производные сиаловых кислот, либо лактонные формы ганглиозидов. Выявлено свыше 20 различных О-замещенных производных НейАц и НейГли, большинство из которых является щелоче-лабильным [13]. Некоторые из них приведены в табл. 1. Большая часть этих соединений обнаружена в составе нервной ткани. Их содержание в мозгу млекопитающих не превышает 20—30% от суммарного содержания ганглиозидов [31]. Наиболее часто встречаются ганглиозиды, имеющие в своем составе 9-О-ацетильное производное сиаловой кислоты [32]. Содержание щелоче-лабильных ганглиозидов в мозгу низших позвоночных, по-видимому, значительно выше [15]. Наиболее высоко оно в мозгу миноги, представителя круглоротых, самого примитивного класса позвоночных; у этого вида на долю щелоче-лабильных ганглиозидов приходится около 90% сиаловой кислоты ганглиозидов [33]. Показано, что это не лактоны. В мозгу рыб содержание щелоче-лабильных ганглиозидов ниже, чем в мозгу миног, но выше, чем в мозгу млекопитающих [15].

Таблица 1

Сиаловые кислоты, встречающиеся в природе [13]

Сиаловые кислоты	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
N-ацетилнейраминная кислота	H	ацетил	H	H	H
N-ацетил-4-О-ацетилнейраминная кислота	ацетил	ацетил	H	H	H
N-ацетил-9-О-ацетилнейраминная кислота	H	ацетил	H	H	ацетил
N-ацетил-7,9-ди-О-ацетилнейраминная кислота	H	ацетил	ацетил	H	ацетил
N-ацетил-7,8,9-три-О-ацетилнейраминная кислота	H	ацетил	ацетил	ацетил	ацетил
N-ацетил-9-О-1-лактоннейраминная кислота	H	ацетил	H	H	лактон
N-ацетил-8-О-сульфонейраминная кислота	H	ацетил	H	сульфат	H
N-ацетил-8-О-метилнейраминная кислота	H	ацетил	H	метил	H
N-гликолилнейраминная кислота	H	гликолил	H	H	H
N-гликолил-4-О-ацетилнейраминная кислота	ацетил	гликолил	H	H	H
N-гликолил-9-О-ацетилнейраминная кислота	H	гликолил	H	H	ацетил
N-гликолил-7,8,9-три-О-ацетилнейраминная кислота	H	гликолил	ацетил	ацетил	ацетил
N-гликолил-8-О-метилнейраминная кислота	H	гликолил	H	метил	H
N-гликолил-8-О-сульфонейраминная кислота	H	гликолил	H	сульфат	H

Подводя итог сказанному, следует отметить, что, несмотря на все многообразие строения ганглиозидов позвоночных, можно выделить блоки

в их структурной организации — это прежде всего ганглиотетраозильные, неолакто-, лакто- и глоботетраозильные последовательности.

Очевидно, эти структурные блоки можно рассматривать и как функциональные блоки. Многочисленные данные свидетельствуют о том, что для выполнения нервными клетками своих функций в их составе должны присутствовать ганглиозиды ганглио-серии, характерные для всех позвоночных — от миног до млекопитающих. Так, например, по данным Cannel и соавт. [34], способность клеточных линий нейробластомы к дифференцировке коррелирует с содержанием в этих клетках эндогенных ганглиозидов с ганглиотетраозильной углеводной цепью, но не с суммарным содержанием ганглиозидов. Ранее было показано, что способностью к синаптогенезу обладают в культуре ткани преимущественно те клетки, которые содержат заметные количества полисиалоганглиозидов этой же ганглио-серии. Ганглиозиды неолакто-серии обладают, очевидно, другими функциональными особенностями.

Интересно проанализировать, характерны ли структурные и функциональные блоки для ганглиозидов иглокожих. Следует отметить, что при изучении их строения использовались липидные экстракты из целого организма, гонад, гепатопанкреаса, кишечника, но не из нервной ткани, что связано с трудностями ее выделения. В табл. 2 представлено строение некоторых ганглиозидов морских ежей, звезд и офиуры. Как видно, углеводные цепи ни ганглио-, ни неолакто-, ни лакто-, ни глобо-серии в составе ганглиозидов иглокожих не выявлены. В ганглиозидах морских звезд с церамидом, как и у позвоночных, связан лактозилный остаток (дисахарид, состоящий из глюкозы и галактозы), однако в изученных ганглиозидах морских ежей и офиур этого не наблюдается. У морских звезд третий и последующие остатки в молекуле ганглиозидов отличаются от тех, которые свойственны углеводным цепям позвоночных. Для представителей различных систематических групп иглокожих характерно наличие сиаловых кислот внутри цепи. В составе ганглиозидов морских звезд найдена арабиноза, для морских ежей характерны ганглиозиды, имеющие в своем составе лишь глюкозу и сиаловые кислоты, часто встречаются сульфопроизводные сиаловых кислот [35—40]. Ганглиозиды иглокожих пока менее изучены, чем ганглиозиды позвоночных, что затрудняет обобщение имеющихся данных.

Для состава церамидной части молекулы ганглиозидов экстрактивных органов млекопитающих характерно преобладание насыщенных и моноеновых кислот с 16-22 атомами углерода и сфингозиновых оснований с 18 атомами углерода. В мозгу млекопитающих преобладают ганглиозиды со стеариновой кислотой, содержащие в своем составе C_{18} и C_{20} - сфингозины. Иной состав церамидной части молекулы ганглиозидов характерен для нервной ткани низших позвоночных [14,15,41]. Долгое время считалось, что для ганглиозидов характерны лишь насыщенные и моноеновые жирные кислоты. Нами впервые с помощью методов ГЖХ и масс-спектрометрии получены доказательства того, что в состав ганглиозидов могут входить полиеновые жирные кислоты. Так, в мозгу некоторых холодноводных рыб на их долю приходится до 30% от суммы жирных кислот [41].

Для состава церамидной части ганглиозидов многих видов иглокожих

характерно наличие высоких концентраций, даже преобладание гидроксигирных кислот и фитосфингозинов [36—38] и др., тогда как у позвоночных они, как правило, отсутствуют в составе ганглиозидов или присутствуют в ничтожных следовых количествах.

Таблица 2

Строение некоторых ганглиозидов иглокожих

Ганглиозиды	Вид животного, орган	Литературный источник
Ней Гли(α2 → 6) Глюк(β1 → 8) Ней Гли(α2 → 6) Глюк β1 — перамид	Морской еж <i>Strongylocentrotus intermedius</i> гонады	[36]
Ней Гли(α2 → 8) Ней Гли(α2 → 6, Глюк(β1 → 6) Глюк β1 — перамид	Морской еж <i>Echinarachnius parma</i> гонады	[37]
8 Сульфат-Ней Ан(α2 → 6) Глюк β1 — перамид	Морской еж <i>Asterina pectinifera</i>	[40]
Араб(β1 → 6) Гал(β1 → 4) Ней Гли(α2 → 3) Гал(β1 → 4) Глюк β1 — перамид	Морская звезда <i>Patiria pectinifera</i> гепатопанкреас	[35]

Ганглиозиды иглокожих обладают не только отличным от характерного для позвоночных строением, но, по-видимому, и иной функциональной ролью. Как известно, у млекопитающих и других позвоночных содержание ганглиозидов в нервной ткани на 1—3 порядка выше, чем в других тканях и органах. Мы поставили перед собой задачу определить концентрацию и состав ганглиозидов в нервной и других тканях у одного из представителей иглокожих — морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*. Для проведения этой работы пришлось отпрепарировать ганглии у 600 морских ежей. Оказалось, что у этого вида животных содержание ганглиозидов в нервной ткани достоверно не отличается от их содержания в кишечнике и значительно ниже, чем в гонадах [42]. Согласно результатам исследования Бузникова и соавт. [43], ганглиозиды локализованы на поверхности половых клеток у иглокожих и выполняют функции нейтрализации эмбриотоксических веществ, причем при увеличении концентрации половых клеток в морской воде их концентрация на поверхности клеток снижается [43]. По-видимому, с этими функциями связана их высокая концентрация в гонадах и половых клетках иглокожих.

Большой интерес представляет выяснение вопроса о том, что же заменяет такие функционально важные соединения, как ганглиозиды, у представителей других типов животных, особенно имеющих высокоразвитую НС, таких как членистоногие или головоногие моллюски. При изучении членистоногих было показано, что для них характерны кислые гликолипиды, содержащие в своем составе терминальные остатки глюкуроновых кислот и один или несколько сульфатных остатков, присоединенных

к углеводным цепям следующего строения — гал-гал - Нац-гал, Нац-манн-глюк-церамид и гал-гал Нац-глюк Нац-манн-глюк-церамид [11].

Подводя итог сказанному о строении ганглиозидов клеточных мембран животных, следует отметить, что на основании результатов сравнительных исследований этих соединений труднее выделить блоки в их структурной организации, чем при изучении белков. Это удастся сделать лишь в пределах одного типа животных.

Роль ганглиозидов в процессах межклеточного взаимодействия

Участие ганглиозидов в процессах межклеточного взаимодействия и дифференцировки клеток постулировалось давно. Во многих работах было показано увеличение скорости синтеза GD1a или других сложных ганглиозидов при установлении межклеточных контактов и увеличении плотности клеток в культуре. Оно является одним из проявлений так называемого «гликолипидного ответа». В трансформированных клетках этот эффект, как правило, не выражен [27, 28, 44, 45].

Согласно модели межклеточного взаимодействия, предложенной Накомори, контактное торможение клеточного роста и размножения в значительной мере определяется специфическим взаимодействием белков клеточной поверхности (эктопротеинов) с ганглиозидами и другими гликоконъюгатами соседних клеток, имеющими комплементарные углеводные последовательности [27, 45]. Изменение состава гликолипидов (или гликопротеинов), происходящее при злокачественной трансформации клеток, нарушает эту комплементарность.

Результаты исследований последних лет не противоречат этой гипотезе. Значительные изменения претерпевают процессы углевод-белковых взаимодействий в ходе эмбрионального и раннего постнатального развития органов и тканей. В многочисленных исследованиях показано изменение на определенных этапах развития органов гликолипидов, гликопротеинов и лектинов клеточной поверхности [46—48].

Наиболее богатая информация получена в настоящее время о роли в процессах межклеточного взаимодействия гликопротеинов клеточной адгезии, обладающих гомофильным сродством друг к другу. Установлено, что эти гликопротеины могут иметь общие антигенные детерминанты с гликолипидами. Так, гликопротеин клеточной адгезии нейронов (N CAM) имеет общие антигенные детерминанты с полисиалоганглиозидами. Моноклональные антитела, полученные при иммунизации животных тетрасиалоганглиозидом G Q1b, в настоящее время широко используются для изучения этого гликопротеина клеточной адгезии. Предполагают, что ганглиозиды, особенно на ранних стадиях развития нервной ткани, являются первичными местами связывания гликопротеина клеточной адгезии нейронов. Интересно отметить, что для N CAM и ганглиозидов на ранних этапах развития нервной ткани характерна значительно большая степень полисиализации, чем во взрослом состоянии, определяющая меньшую способность этих молекул к адгезии [47, 49].

Для гликопротеинов и сложных гликолипидов характерно наличие многих общих антигенных детерминант, что было показано с помощью

иммунохимических и биохимических методов. Эндогенные лектины, которые присутствуют в различных тканях, и, очевидно, играют существенную роль в процессах межклеточного взаимодействия, могут, по-видимому, взаимодействовать как с гликопротеинами, так и с гликолипидами, в частности ганглиозидами соседних клеток [8].

Рецепторная роль ганглиозидов

В случае межклеточных углевод-белковых взаимодействий часто трудно решить, какое соединение является рецептором, а какое эффектором. Как уже указывалось, молекулы клеточной адгезии, как правило, обладают гомофильным сродством друг к другу. По-видимому, ганглиозиды принимают участие в такого рода взаимодействиях.

Постараемся ответить и на вопрос о том, рецепторами каких биологически активных соединений являются ганглиозиды.

В начале семидесятых годов было показано, что ганглиозид GM1 является рецептором токсина холеры, удовлетворяет многочисленным критериям, используемым для выявления рецепторов биологически активных веществ. В исследованиях многих авторов было показано, что связывание токсина холеры с ганглиозидом GM1 клеточных мембран вызывает функциональный ответ клеток. В результате связывания В-субъединицы токсина с ганглиозидным рецептором происходит ADP-рибозилирование стимулирующего GTP-связывающего G-белка аденилатциклазной системы и персистентная активация аденилатциклазы [50], ADP-рибозилирующей активностью при этом обладает А-субъединица токсина. Как указывалось, одни и те же терминальные углеводные последовательности характерны как для гликопротеинов, так и для гликолипидов. Поэтому предполагали, что в роли рецепторов токсина холеры могут выступать и гликопротеины, обладающие той же терминальной моносахаридной последовательностью, что и GM1. Однако сравнительно недавно, используя различные клетки, удалось показать, что ганглиозид GM1 является, очевидно, единственным рецептором токсина холеры [51]. В то же время термолабильный токсин *E. coli* может, по-видимому, использовать в качестве рецепторов как GM1, так и гликопротеин со сходной терминальной олигосахаридной последовательностью [51, 52].

В серии работ Markwel и соавт. (см., например, [53]) удалось показать, что ганглиозиды GQ1b и GT1b, а также GD1a являются рецепторами вируса Сендай. Обработка клеток сиалидазой снимает, а добавление перечисленных ганглиозидов восстанавливает чувствительность различных клеток-хозяев к вирусу Сендай. Клетки линии NCT C 2071 A, которые не имеют в своем составе сложных ганглиозидов, не чувствительны к действию вируса Сендай, но при действии на клетки перечисленных ганглиозидов они становятся подверженными действию вируса.

В литературе имеются свидетельства того, что ганглиозиды являются вероятными кандидатами на роль рецепторов вируса гриппа [54, 55]. Для окончательного выяснения роли ганглиозидов в рецепции вируса гриппа необходимы дальнейшие исследования.

Постулировалась роль ганглиозидов в рецепции токсина столбняка

(ганглиозида GQIv и других) и токсина ботулизма. Однако в настоящее время показано, что ганглиозиды клеточных мембран не могут связывать эти нейротоксины с высоким сродством при физиологических значениях рН (связывают лишь при низких значениях рН). Рецепторы, связывающие токсины столбняка и ботулизма с высоким сродством и участвующие в реализации их биологического эффекта, еще не установлены, но имеют, очевидно, другую природу [51].

Следует отметить, что рецепцию токсинов и вирусов нельзя, строго говоря, рассматривать как физиологическую роль ганглиозидов. Результатом взаимодействия этих соединений с рецепторами, расположенными на клеточной мембране, является, как правило, не их обезвреживание, а реализация токсического эффекта. Токсины и вирусы при этом, по-видимому, используют в значительной мере структуры, предназначенные для рецепции тех или иных физиологических лигандов.

Долгое время в литературе господствовала точка зрения, согласно которой ганглиозиды входят в состав рецепторов ряда гормонов (тиреотропина, хорионального гонадотропина и других), определяя узнавание гормоном «своего» рецептора. Эти представления отстаиваются и в отдельных работах последних лет [57]. Однако в большей части исследований восьмидесятих годов эти представления подвергаются сомнению и даже опровергаются. Показано, что тиреотропин и другие гормоны гликопротеиновой природы проявляют максимальную способность к связыванию с ганглиозидами при низких значениях рН, низкой температуре и концентрации солей, тогда как при физиологических значениях этих показателей ганглиозиды не способны связывать гормоны с высоким сродством и опосредовать их биологический эффект [51, 58, 59].

Ганглиозиды принимают непосредственное участие во взаимодействии фибронектина межклеточного пространства с поверхностью клеток. Рецепторы, ответственные за прикрепление клеток к фибронектину, представляют собой гликопротеины, а ганглиозиды являются, по-видимому, рецепторами, ответственными при взаимодействии фибронектина с клеточной поверхностью за его организацию в фибриллярный матрикс. При этом участок, взаимодействующий с ганглиозидами, находится на N-конце молекулы фибронектина [51, 60]. При отсутствии ганглиозидов в составе наружных мембран клетки теряют способность организовать фибронектин во внеклеточный фибриллярный матрикс [51].

Нейритогенная и нейронотрофическая функции ганглиозидов

Эти аспекты исследования являются в настоящее время основными при изучении ганглиозидов. В многочисленных работах показано, что добавление экзогенных ганглиозидов к культурам первичных и трансформированных (линии нейробластом) нервных клеток стимулирует формирование отростков у этих клеток [61]. Интересно отметить, что добавление ганглиозидов приводит не только к морфологической, но и функциональной дифференцировке клеток нейробластомы, увеличивая в несколько раз число тетродоксинчувствительных натриевых каналов [62].

Показано, что различные клетки обладают разной чувствительностью

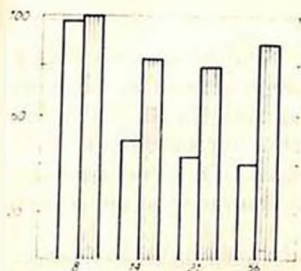


Рис.4. Влияние введения ганглиозида GM1 крысам на активность тирозингидроксилазы в substantia nigra у крыс с унилатеральной перерезкой одного из больших полушарий [66]. По оси абсцисс — дни после операции, по оси ординат — активность фермента в % от контроля (то есть активность фермента в неповрежденном полушарии). □ — введение GM1 (30 мг /1 кг массы в ден, ■ — введение солевого раствора

к индивидуальным ганглиозидам. У некоторых из клеточных линий нейробластомы человека (GOTO и др.) дифференцировка происходит лишь под влиянием тетраасialogанглиозида GQIв. Клетки феохромоцитомы не реагируют на добавление одних ганглиозидов. Лишь в сочетании с NGF (фактором роста нервов) удается достичь синергического эффекта [63].

Многочисленными исследованиями показано снижение содержания ганглиозидов в нервной ткани при поражении НС [64]. В последние годы установлено, что ганглиозиды могут оказывать нейротрофический эффект не только в опытах *in vitro*, но и *in vivo* при их введении животным. В таких опытах используют обычно ганглиозид GM1, так как он наиболее стабилен и устойчив к действию нейраминидаз, либо его внутрениний эфир AGF2, лучше проникающий через ГЭБ. Показано, что внутривенное введение крысам экзогенных ганглиозидов (либо смеси разных фракций, либо ганглиозида GM1) способствует лучшей сохранности холинэргических нейронов в гиппокампе после частичной перерезки дорзальных путей [65]. Введение ганглиозидов крысам в дозе 10 мг и более на кг веса ежедневно способствует значительно лучшей сохранности клеток дофаминэргической системы в среднем мозгу после унилатеральной перерезки nigrostriatного пути [66].

Разберем это на одном из примеров. Как показано на рис.4, на поврежденной стороне мозга крыс активность тирозингидроксилазы в черном веществе среднего мозга значительно падает с течением времени, продолжая уменьшаться даже через 1,5—2 месяца [66]. В случае же введения ганглиозида GM1 падение активности фермента, отражающее степень дегенерации нервных клеток, не было сильно выражено, а через месяц—полтора после перерезки наблюдалось даже небольшое увеличение активности фермента. Иммунохимические методы также свидетельствуют о лучшей сохранности дофаминэргической системы в поврежденном полушарии у крыс, которым вводили ганглиозид GM1 по сравнению с контролем, о предотвращении дегенерации, либо о регенеративных процессах, протекающих под влиянием ганглиозидов. Интересно отметить, что морфологическое исследование показало заметное увеличение длины отростков нервных клеток на поврежденной стороне у крыс, регулярно получавших ганглиозиды, по сравнению с контролем (получавшими солевые растворы), а также по сравнению с неповрежденным полушарием [66].

Yates и соавт., изучая процессы регенерации седалищного нерва, показали, что ганглиозиды накапливаются проксимально по отношению к месту перерезки [67]. Это накопление ганглиозидов, синтез которых продолжает идти в теле клетки, может, очевидно, дать толчок росту

аксонов, то есть процессу регенерации.

Экспериментальные свидетельства того, что ганглиозиды способны оказывать центральный эффект, были в большой мере неожиданными, так как считалось, что ГЭБ для ганглиозидов не проницаем. В работе Ghidoni и соавт. было установлено, что небольшие количества внутривенно введенного радиоактивного ганглиозида GM1 могут включаться в состав мембран нервных клеток головного мозга в норме [68]. При патологии можно ожидать увеличения проницаемости ГЭБ.

Результаты исследований по введению ганглиозидов не всегда позволяют различать предотвращение дегенерации, либо регенерацию и стимуляцию роста отростков, дифференцировки клеток.

Регулярное введение ганглиозидов животным с поврежденной НС способствует более быстрому восстановлению поведенческих реакций [1, 2]. Оно оказывает лечебный эффект и при периферических нейропатиях у людей. Ганглиозиды, выпускаемые итальянской фирмой «Phidea Co», используются в настоящее время в клинической практике. Показано, например, что пероральное введение ганглиозидов людям с нейропатиями, вызванными диабетом, восстанавливает скорость проведения по аксону и уменьшает болезненные симптомы [3, 69]. Имеются данные, указывающие на перспективность использования ганглиозидов в качестве лечебных препаратов при некоторых формах поражения ЦНС у людей [70].

Не может не вызывать естественного беспокойства вопрос о том, не могут ли введенные с лечебной целью ганглиозиды изменять активность клеток иммунной системы [71]. Представляется, что вопрос о влиянии ганглиозидов на иммунный ответ при их введении *in vivo* еще недостаточно изучен.

Несмотря на то, что сотни работ посвящены в настоящее время изучению нейритогенных и нейронотрофических функций ганглиозидов, механизм их действия до сих пор не ясен. Добавленные извне ганглиозиды могут осуществлять свое воздействие, встраиваясь в клеточные мембраны и выполняя функции эндогенных ганглиозидов. Однако целый ряд фактов позволяет предполагать не только такой механизм их действия, но и возможное существование рецепторов для ганглиозидов на плазматической мембране нейронов [34, 72]. Другой возможный механизм их нейритогенного эффекта заключается во внутриклеточном воздействии ганглиозидов, захваченных путем эндоцитоза, на биосинтез белков цитоскелета. Работами Yavin и соавт. показано, что под влиянием экзогенных ганглиозидов происходит многократное увеличение содержания мРНК, ответственной за синтез тубулина, в различных линиях клеток [73]. Интересно отметить, что при действии на клетки мышинной нейробластомы не только типичные ганглиозиды, но и сиаподиацилглицерин (глицероганглиозид), метиловый эфир GM1 и ганглиозид GM3 с сиаловой кислотой, связанной β - (а не α -) связью, оказывали нейритогенный эффект, тогда как свободная сиаловая кислота и сиалогликопротеины такой активностью не обладали [74].

Свое воздействие на рост и дифференцировку клеток ганглиозиды могут оказывать путем модуляции активности протеинкиназных систем. Как правило, ганглиозиды оказывают свое воздействие лишь при наличии мембранных структур. Показано влияние ганглиозидов и на ферментные

системы обмена вторичных мессенджеров.

Подводя итог сказанному, следует отметить, что молекулярные механизмы нейритогенного и нейротрофического эффекта ганглиозидов нельзя пока считать окончательно выясненными.

Адаптационные функции ганглиозидов

С представлениями о роли ганглиозидов в обеспечении пластичности НС смыкаются и данные, свидетельствующие об их участии в биохимических механизмах адаптации животных к изменяющимся условиям окружающей среды. Значение изменений состава жирных кислот фосфолипидов в приспособлении животных к изменяющимся условиям обитания были показаны многими исследователями как при изучении природных адаптаций, так и в экспериментальных условиях [77]. Однако роль гликолипидов в биохимических механизмах адаптации к температуре обитания и другим экологическим факторам оставалась до последнего времени невыясненной.

Нами было проведено изучение свыше 40 видов рыб, различающихся по условиям обитания. Исследование природных адаптаций рыб к температуре и глубине обитания показало, что ганглиозидам нервной ткани свойственны адаптационные функции, что эти соединения обнаруживают компенсаторные изменения состава, направленные на поддержание оптимальных для жизнедеятельности степени жидкости и фазового состояния липидного бислоя [8, 41]. Проведено сравнение данных по ганглиозидам и индивидуальным фосфолипидам, полученным при изучении одной и той же выборки рыб. Состав липидов тепловодных рыб сравнивали с составом липидов холодноводных рыб, сходных по систематическому положению [41]. Сравнение показало, что приспособительные изменения состава жирных кислот ганглиозидов мембран клеток нервной ткани являются более выраженными, чем аналогичные изменения в составе индивидуальных фосфолипидов. Так, в составе ганглиозидов мозга изученных холодноводных видов рыб относительное содержание ненасыщенных жирных кислот было в среднем в 3 раза выше, чем у тепловодных видов, тогда как в составе индивидуальных фосфолипидов оно было лишь в 1,1—1,4 раза выше. В ганглиозидах холодноводных рыб полиеновые кислоты составляли в среднем 16% от суммы жирных кислот, достигая у некоторых видов 30%, тогда как в ганглиозидах тепловодных видов они практически отсутствовали. Учитывая высокую концентрацию ганглиозидов в наружных мембранах нервных клеток, особенно синаптических, следует полагать, что изменения состава жирных кислот ганглиозидов под действием температуры, глубины обитания и других экологических факторов вносят существенный вклад в поддержание оптимального фазового состояния возбудимых мембран нервной ткани и степени их жидкости [8, 41]. Эти данные представляют особый интерес в связи с тем, что у животных возбудимые мембраны нервной ткани являются в функциональном отношении одними из наиболее чувствительных к изменению условий внешней среды [8].

Изменение состава жирных кислот ганглиозидов (как и фосфолипидов) под влиянием температуры, глубины обитания и других условий

внешней среды, очевидно, отражаются не только на интегральной микровязкости липидов мембран, но и приводят к изменению фазовой сепарации липидов, микрогетерогенности мембран, что оказывает не менее выраженное воздействие на функционирование надмолекулярных комплексов биомембран.

Очень интересные факты, указывающие на то, что и углеводный компонент молекулы ганглиозидов участвует, очевидно, в процессах адаптации, были получены итальянскими учеными. Они показали, что у сонливого полчка в состоянии гибернации наблюдается почти полное исчезновение О-ацильных форм ганглиозидов, составляющих в различных отделах мозга этих животных, находящихся в нормотермном состоянии, 10—30% от суммарного содержания ганглиозидов [78]. У тех видов млекопитающих, для которых не характерна зимняя спячка, содержание О-ацильных и других щелоче-лабильных форм ганглиозидов также является относительно высоким и составляет около 10—30% [31]. Пока трудно ответить на вопрос, на поддержание каких параметров метаболической активности или физико-химического состояния мембран направлены эти изменения. В этой связи интересно отметить, что, по данным С. Ю. Тумановой, исследовавшей обмен ганглиозидов, сиаловые кислоты и N-ацетилгексозамины, содержащие N-ацетильные группы в своей молекуле, обладают значительно большей интенсивностью метаболизма, чем гексозы и другие компоненты молекулы ганглиозидов [79]. Можно предполагать, что процессы ацетилирования ганглиозидов (как и процессы посттрансляционной модификации белков) могут существенно изменять свойства этих соединений и надмолекулярных комплексов ими образуемых. Пока трудно ответить на вопрос о том, какую функциональную роль выполняют щелоче-лабильные соединения. Интересно отметить, что у человека при старении имеет место увеличение О-ацильных производных ганглиозидов в ткани мозга [80].

Ганглиозиды — антигены клеточной поверхности, маркеры нормальных и трансформированных клеток

Как показали иммунохимические исследования, ганглиозиды являются носителями антигенных детерминант клеточной поверхности, маркерами субпопуляций лимфоцитов, определяют особенности поверхности различных популяций клеток других органов и тканей. В процессе онтогенетического развития набор антигенов ганглиозидной природы, характерный для данного типа клеток, может существенно меняться [28, 46]. Так антигенную детерминанту, характерную для нервных клеток, несет тетраса-а-галиктозил GQIv. На ранних этапах эмбрионального развития он обнаруживается и на поверхности незрелых астро- и олигодендроцитов, но исчезает с поверхности этих клеток в процессе дальнейшего развития [46]. Есть основания считать, что некоторые минорные фракции ганглиозидов являются маркерами на поверхности нейронов, специфических по типу вырабатываемого медиатора. Так, описан специфический антиген поверхности холинергических нервных окончаний, имеющий ганглиозидную природу [81].

Ганглиозиды, судя по имеющимся данным, играют важную роль в регуляции иммунного ответа, модулируют активность различных типов иммунокомпетентных клеток [28, 82]. В 80-ые годы в целом ряде работ было показано, что ганглиозиды, прежде всего содержащие фукозу сиалогликолипиды, являются связанными с опухолями антигенами [7]. Так, один из содержащих фукозу моносиалоганглиозидов (сиалированный антиген Льюиса) является антигеном, характерным для различных карцином человека [6, 83], другой, содержащий фукозу ганглиозид (фук-GM1) представляет собой антиген, связанный с мелкоклеточной карциномой легких и отсутствующий в других опухолях экстраневрального происхождения [84, 85].

Таблица 3

Ганглиозиды - антигены, связанные со злокачественными образованиями

Ганглиозиды	Злокачественная опухоль
Фук 3-изо-LM1 H ¹ НейАц/H ¹ Фук Лакт Оза,Церамид	Карциномы колоректальные, поджелудочной железы, грудной железы, мелкоклеточная карцинома легких
GD3 H ¹ (НейАц) Лакт Церамид	Меланома, астроцитомы
GD2 H ¹ НейАц Ганг Оза,Церамид	Нейробластома, глиома
Фук-GM1 H ¹ Ней Ац/H ² Ганг Оза,Церамид	Мелкоклеточная карцинома легких
3'-изо LM1 H ¹ НейАц Лакт Оза,Церамид	Глиома, карцинома кишечника, тератокарцинома

В табл. 3 приведены некоторые из известных к настоящему времени антигенов ганглиозидной природы, связанных с различными типами злокачественных образований.

При злокачественной трансформации метаболизм гликолипидов зачастую как бы останавливается на определенной ступени эмбрионального развития, при этом бывают экспрессированные ферменты обмена этих соединений, не характерные для взрослого организма, происходит синтез антигенов, характерных для определенных стадий эмбрионального развития. Поэтому многие из связанных со злокачественными опухолями антигенов выявляются также на поверхности эмбриональных клеток и носят название раковоэмбриональных антигенов [7]. Так, например, для опухолей нейроэктодермального происхождения характерен антиген углеводной природы, антигенная детерминанта которого входит в состав ганглиозида GD2. Этот ганглиозид является одним из основных ганглиозидов в мозгу эмбрионов млекопитающих на ранних этапах развития, но практически отсутствует в мозгу взрослых организмов [86]. Среди представленных в табл. 3 антигенов, связанных со злокачественными опухолями, многие являются раковоэмбриональными антигенами [7].

Изучение связанных со злокачественным ростом антигенов ганглиозидной природы с помощью современных иммунохимических методов, основанных на использовании моноклональных антител, открывает интерес-

ные перспективы диагностики и терапии ряда форм злокачественных опухолей.

Моноклональные антитела в настоящее время широко используются, кроме того, для установления локализации ганглиозидов, изучения их функциональных свойств в ряде лабораторий, в том числе и в нашей, начато их использование для решения проблем эволюционной биохимии.

GANGLIOSIDE STRUCTURE AND FUNCTIONS

Avrova N. F.

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

Gangliosides are specific components of cell membranes of vertebrates and echinoderms. In vertebrates they are mainly localized in the nerve tissue. Progress in the development of analytical methods led to clarification of ganglioside structure. Gangliosides of vertebrates contain alkali-labile O-acyl groups and have branched carbohydrate chain. Gangliosides of echinoderms have the residues of sialic acids within the chain and sulfoderivatives of sialic acid. Block structure of ganglioside was traced only for vertebrates. According to current ideas gangliosides possess neuritogenic and neuronotrophic properties. They affect cell interactions and cell differentiation (neurons in particular). Gangliosides also exhibit adaptation functions. It was shown that gangliosides were receptors of several toxins and viruses, but their role in hormone reception has yet to be clarified. Administration of gangliosides to animals with damaged nervous system normalized metabolism and restored behavioral reactions. The study of ganglioside antigens in malignant tumors using monoclonal antibodies may result in promising diagnostic and therapeutical applications in the field of cancer.

ЛИТЕРАТУРА

1. Karpiak S. *Exp. Neurol.*, v. 81, p. 330—339, 1983.
2. Sabel B. A., Slavin M. D., Stein D. *Science*, v. 225, p. 340—342, 1984.
3. Consolazione A., Toffano G. — In: *New Trends in Ganglioside Research. Neurochemical and Neuroregenerative Aspects* (ed. R. W. Ledeen). Padova, Berlin, Liviana Press, Springer-Verlag, p. 523—533, 1988.
4. Karpiak S. E., Li Y. S., Mahadic S. P. — In: *New Trends in Ganglioside Research. Neurochemical and Neuroregenerative Aspects* (ed. R. W. Ledeen). Padova, Berlin, Liviana Press, p. 549—556, 1988.
5. Holmann M. — In: *New Trends in Ganglioside Research. Neurochemical and Neuroregenerative Aspects* (ed. R. W. Ledeen). Padova, Berlin, Liviana Press, Springer-Verlag, p. 595—604, 1988.
6. Magnani J. L., Nilsson B., Brockhaus M., Lopt D., Steplewski Z., Koprowski H., Ginsburg V. *J. Biol. Chem.*, v. 257, p. 14365—14369, 1982.
7. Svennerholm L. — In: *New Trends in Ganglioside Research. Neurochemical and Neuroregenerative Aspects* (ed. R. W. Ledeen). Padova, Berlin, Liviana Press, Springer-Verlag, p. 135—150, 1988.
8. Аврова Н. Ф. Ганглиозиды головного мозга в эволюции позвоночных. Автореферат докт. дисс. с. 1—42, 1981.
9. Svennerholm L. — In: *Handbook of Neurochemistry* (ed. A. Lajtha), New York, Plenum Press, v. 3, p. 425—452, 1970.

10. Segler K., Rahmann H. Biochem. systematic and ecology, v. 6, p. 87—93, 1978.
11. Dennis P. K., Geyer R., Egge H., Peter-Katalinio J., Keller M., Menges H., Wiegandt H. Proc. NATO Adv. Res. Workshop, Stuttgart, 1985, Berlin e. a., p. 20—24, 1987.
12. Cherry J. M., Buckhout T. J. Experientia, v. 34, p. 1433—1434, 1978.
13. Corfield A., Schaver R. —In: Sialic Acids) Chemistry, metabolism and function (ed. R. Shauer) p. 5—50, Wien, Ne York, Springer Verlag, 1982.
14. Avrova N. F. J. Neurochem., v. 18, p. 667—674, 1971.
15. Avrova N. F., Ghidoni R., Karpova O. B., Nalivaeva N. N., Malesci A., Tettamanti G. Comp. Biochem. Physiol., v. 83B, p. 669—679, 1986.
16. Rosner H. Anal. Biochem., v. 109, p. 437—442, 1980.
17. Seybold U., Rahmann H. Dev. Brain Res., v. 17, p. 201—208, 1985.
18. Chien J. L., Hogan E. L., J. Biol. Chem., v. 258, p. 10727—10730, 1983.
19. Kundu S. K., Harati Y., Mirra L. K. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 118, p. 82—89, 1984.
20. Ohashi M. J. Biochem., v. 88, p. 583—589, 1980.
21. Ando S., Yu R. K. J. Biol. Chem., v. 252, p. 6247—6250, 1977.
22. Nakamura K., Hashimoto Y., Suzuki M., Suzuki A., Yamakawa T. J. Biochem., v. 96, p. 949—957, 1984.
23. Takamizawa K., Iwamori M., Mitai M., Nagai Y. J. J. Biol. Chem., v. 261, p. 5625—5630, 1986.
24. Watanabe K., Hakomori S.-i. Biochem., v. 18, p. 5502—5504, 1979.
25. Macher B. A., Klock J. C. J. Biol. Chem., v. 253, p. 8962—8967, 1978.
26. Watanabe K., Powell M., Hakomori S.-i. J. Biol. Chem., v. 254, p. 8223—8229, 1978.
27. Hakomori S.-i. —In: Handbook of Lipid Research., v. 3, p. 327—379, New York, London, Plenum Press, 1983.
28. Hakomori S.-i., Young W. W. —In: Handbook of Lipid Research., v. 3, New York, London, Plenum Press, p. 381—436, 1983.
29. Deifter-Yuszypski M., Harpas N., Flowers H. M., Scharon N. J. Biochem., v. 83, p. 363—373, 1978.
30. Zdebska E., Koscielać J. J. Biochem., v. 91, p. 517—525, 1978.
31. Huverkamp J., Ven R. W., Sander M., Schärer R., Kamerling J. P., Vliegentharte J. G. F. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., Bd 358, h. 1609—1612, 1977.
32. Chigorno V., Sonnio S., Ghidoni R., Tettamanti G. Neurochem. Int., v. 4., p. 531—539, 1982.
33. Аврова Н.Ф. Журн. эволюц. биохимии и физиологии, т. 15, с. 332—338, 1979.
34. Canella M. S., Wu G., Vaswani K. K., Ledeen R. W. —In: New Trends in Ganglioside Research. Neurochemical and Neuroregenerative Aspects (ed. R. W. Ledeen) Padova, Berlin, Liviana Press, Springer Verlag, p. 379—390, 1988.
35. Kochetkov N. K., Smirnov G. P. Biochim. et biophys. acta., v. 759, p. 192—198, 1983.
36. Проказова Н. В., Кочарова С. Л., Садовская Л. М., Мошанский Ю. В., Бергельсон Л. Д. Биоорганическая химия, т. 5, с. 458—467, 1979.
37. Смирнова Г. П., Чекарева Н. В., Кочеткова Н. К. Биоорганическая химия, т. 6, с. 1667—1673, 1980.
38. Smirnov G. P., Kochetkov N. K., Sadovskaya V. L. Biochim. et biophys. acta., v. 920, p. 47—55, 1987.
39. Hoshi M., Nagai Y. Biochim. et biophys. acta., v. 383, p. 152—162, 1975.
40. Sugita M., J. Biochem., v. 86, p. 765—772, 1979.
41. Avrova N. F. Compar. Biochem. Physiol., v. 78B, p. 903—909, 1984.
42. Аврова Н. Ф., Карпова О. Б., Наливаева Н. Н. Журн. эволюц. биохимии и физиологии, т. 19, с. 127—132, 1983.
43. Буликисов Г. А., Звездина Н. Д., Проказова Н. В., Бергельсон Л. Д., Турнаев Т. М. Докл. АН СССР, т. 210, с. 1457—1460, 1973.
44. Whalley R., Ng S. K-S., Roger J., Mc Murray W. C., Sanwal B. D. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 70, p. 180—185, 1976.
45. Hakomori S.-i., Young W. W., Patt L. M., Yosino T., Halpapp L., Lingwood C. A. Adv. Exp. Med. Biol., v. 125, p. 247—262, 1980.
46. Schachner M. J. Neurochem., v. 39, p. 1—8, 1982.
47. Finne J. Trends in Biochem. Sciences, v. 10, p. 129—132, 1985.
48. Suchy Sh., Barbara L., Schwartling G. Brain Res., v. 440, p. 25—34, 1988.
49. Jorgensen O. J. Neurochem., v. 44, suppl. 33C, 1985.
50. Holmgren J., Elwing H., Fredman P., Strannegard O., Svennerholm L. Adv. Exp. Med. Biol., v. 125, p. 453—470, 1980.

51. Fishman P. H. — In: New Trends in Ganglioside Research. Neurochemical and Neuroregenerative Aspects (ed. R. W. Ledeen), Padova, Berlin, Liviana Press, Springer Verlag, p. 183—201, 1988.
52. Holmgren J., Fredman P., Lindblad M., Svennerholm A.-M., Svennerholm L. Infect. Immun., v. 38, p. 424—433, 1982.
53. Markwell M. A. K., Fredman P., Svennerholm L. Biochem. et biophys. acta, v. 775, p. 7—16, 1984.
54. Slepishkin V. A., Bukrinskaya A. G., Prokazova N. V., Shigis L. S., Reshetov P. D., Shaposhnikova J. I., Bergelson L. D. FEBS Lett., v. 182, p. 273—277, 1985.
55. Suzuki Y., Nagao Y., Katon H., Matsumoto M., Nerome K., Nakajima K., Nobusawa E. J. Biol. Chem., v. 261, p. 1362—1365, 1986.
56. Kohn L. D., Consiglio E., Dawolf M. I. S., Grollman E. F., Ledley F. D., Lee G., Morris N. P. Adv. Exp. Med. Biol., v. 125, p. 487—504, 1980.
57. Bartalena L., Fenzi G., Vitti P., Tonbaccini D., Antonelli A., Chiovata L., Kohn L. D., Pinchera A. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 143, p. 266—272, 1987.
58. Friedman Y., Hladis P., Bahiarz-Crowell D., Burke G. I. Endocrine Res. Commun., v. 6, p. 71—92, 1979.
59. Pekonen F. Horm. Metab. Res., v. 12, p. 310—314, 1980.
60. Cheresch D. A., Pytela R., Pierschbacher M. D., Ruoslahti E., Reisfeld R. A. — In: New Trends in Ganglioside Research. Neurochemical and Neuroregenerative Aspects (ed. R. W. Ledeen), Padova, Berlin, Liviana Press, Springer-Verlag, p. 203—217, 1988.
61. Skaper S. D., Favaron M., Lacci L., Vantini G., Fusco M., Ferrari G., Leon A. — In: New Trends in Ganglioside Research. Neurochemical and Neuroregenerative Aspects (ed. R. W. Ledeen), Padova, Berlin, Liviana Press, Springer-Verlag, p. 351—360, 1988.
62. Avrova N. F., Nalivaeva N. N., Gulaya N. M., Voitchuk N. A. Neurochem. Intern., v. 13, suppl.3, p. 84, 1988.
63. Ferrari G., Fabres M., Gorio A. Dev. Brain. Res., v. 8, p. 215—221, 1983.
64. Таранова Н. П. Липиды центральной нервной системы при повреждающих воздействиях. Л., Наука, с. 3—158, 1988.
65. Oderfeld-Nowak W., Gradkowska M., Zuremba M., Kiedrowski L. — In: New Trends in Ganglioside Research. Neurochemical and Neuroregenerative Aspects (ed. R. W. Ledeen), Padova, Berlin, Liviana Press, — Springer — Verlag, 1988.
66. Toffano G., Savoni G. E., Moroni F. Brain. Res., v. 296, p. 133—239, 1984.
67. Yates A. J., Warner J. K., Cuzman-Harty M., Mancini M., Pearl D. J. Neurochem., v. 44, suppl. p. 134B, 1985.
68. Ghidoni R., Sonnio S., Venerado B., Tiorilli A., Tettamanti G. J. Neurochem., v. 44, suppl., p. 54C, 1985.
69. Marini P., Vitadello M., Biach R., Triban C., Gorio A. Diabetologia, v. 29, p. 254—258, 1986.
70. Della Valle F. Utilisation de gangliosides exogenes dans des maladies tumorales comme facteur de protection contre la toxicite de medicaments antitumoraux. Demande de brevet d'invention, A.I. Republique Francaise, N 8 de publication 2601248, N d'enregistrement national: 8708937, 1988.
71. Marcus D. M. — In: New Trends in Ganglioside Research. Neurochemical and Neuroregenerative Aspects (ed. R. W. Ledeen), p. 173—180, Padova, Berlin, Liviana Press, Springer-Verlag, 1988.
72. Yasuda Y., Tiemeyer M., Blackburn C., Schnaar R. L. — In: New Trends in ganglioside Research. Neurochemical and Neuroregenerative Aspects (ed. R. W. Ledeen), p. 227—244, Padova, Berlin, Liviana Press, Springer-Verlag, 1988.
73. Yavin E., Consolazione A., Gil S., Ginsburg I., Leon A., del Tosso R., Rubak S. — In: New Trends in Ganglioside Research. Neurochemical and Neuroregenerative Aspects (ed. R. W. Ledeen), p. 579—593, Padova, Berlin, Liviana Press, Springer-Verlag, 1988.
74. Nagai Y., Tsuji S. — In: New Trends in Ganglioside Research. Neurochemical and Neuroregenerative Aspects (ed. R. W. Ledeen), p. 329—350, Padova, Berlin, Liviana Press, Springer-Verlag, 1988.
75. Spiegel S. — In: New Trends in Ganglioside Research. Neurochemical and Neuroregenerative Aspects (ed. R. W. Ledeen), p. 405—422, Padova, Berlin, Liviana Press, Springer-Verlag, p. 405—422, 1988.
76. Yu R. K. — In: New Trends in Ganglioside Research, Neurochemical and Neuroregenerative Aspects (ed. R. W. Ledeen), p. 461—471, Padova, Berlin, Liviana Press, Springer-Verlag,

1988.

77. Крепс Е. М. Липиды клеточных мембран. Эволюция липидов мозга. Адаптационная функция липидов, с. 1—337, Л., Наука, 1981.
78. Sonnio S., Ghidoni R., Malesci A., Tettamanti G., Marx G., Hilbio R., Rahmann H. *Neurochem Int.*, v. 6, p. 677—683, 1984.
79. Туманова С. Ю. Участие ганглиозидов в функциональной деятельности головного мозга. Автореферат докт. дисс., с. 1—42, Л., 1984.
80. Riboni L., Malesci A., Sonnio S., Ghidoni R. *Neurochem.*, v. 44, suppl., p. 53, 1985.
81. Richardson P. J., Walker J. H., Ganes R. Th., Whittaker V. P. *J. Neurochem.*, v. 38, p. 1605—1614, 1985.
82. Дятловская Э. Б., Сомова О. Г., Фомина-Азеева Е. В., Бергельсон Л. Д. *Биохимия*, т. 50, с. 412—415, 1985.
83. Nilsson O., Lindholm J., Mansson J. -E., Holmgren I. — In: *Cellular and Pathological Aspects of Glycocojugate Metabolism* (ed. H. Dreyfus), v. 126, p. 495—512, Paris, Inserm., 1984.
84. Hanging M., Avrova N., Mansson J. -E., Moln K., Svennerholm L. *Biochim. et biophys. acta*, v. 878, p. 360—370, 1986.
85. Fuchs B. B., Avrova N. F., Starosvetskaya N. A., Bolotovskaya M. N., Zraisky E. I., Karpova O. B., Reznikova E. V., Soldatova L. N., Stefanov A. A. *Biotechnol. and applied biochem.*, v. 10, p. 273—286, 1988.
86. Tai T., Cahan L. D., Paulson J. C., Saxton R. E., Irie R. F. *J. Natl. Cancer*, v. 73, p. 627—633, 1984.
87. Watanabe K., Hakomori S-I, Childs R. A., Fiezi T. *J. Biol. Chem.*, v. 254, p. 3221—3227, 1979.

Поступила 19.04.1989

УДК 615.214.015.4:612.821-058

ЭТОЛОГИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ И НЕЙРОХИМИЯ БЕНЗОДИАЗЕПИНОВ И β -КАРБОЛИНОВ

Пошивалов В.П., Сухотина И.А.

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

В обзоре представлены новые данные мультидисциплинарных работ, посвященных решению проблемы синтеза нейрoхимических, этологических и этологofармакологических исследований. Особое внимание уделено классификации, систематизации и характеристикам поведенческих эффектов лигандов бензодиазепиновых рецепторов (БДР), в том числе эндогенных (β -карболинов—БК). Показана роль обратных (инверсных) агонистов БДР в регуляции состояний страха, тревоги и агрессивного поведения. Отмечены новые перспективы использования этологического анализа и этологических моделей для адекватной оценки психотропных свойств широкого спектра агонистов и антагонистов БДР. Представлены экспериментальные данные и гипотезы, свидетельствующие о возможной разобщенности бензодиазепиновых и β -карболиновых мест связывания и реализации анксиогенных свойств БК посредством вовлечения специфических рецепторов.

* * *

Широкое использование транквилизаторов бензодиазепинового ряда в различных областях практической медицины придало особую значимость изучению спектров и особенностей механизмов действия как самих препаратов, так и их антагонистов [2,43]. В связи с открытием эндогенных лигандов рецепторов в этом аспекте весьма актуальной стала проблема синтеза данных молекулярной фармакологии и этологических (поведенческих) исследований, изучение взаимоотношений «структура поведения—эндогенные лиганды — рецепторы». Особый интерес в настоящее время привлекают исследования психобиологических; нейрoхимических и нейроэтологических аспектов интеграции состояний страха и тревоги, а также разработка фармакологических средств регуляции этих состояний [1,2]. Целью настоящего обзора является систематизация и анализ новых данных, касающихся молекулярных механизмов и этологических спектров действия производных β -карболинов и бензодиазепинов, на моделях патологического поведения животных, в частности, отражающих состояния страха, тревоги и агрессивного поведения.

Современные концепции супрамолекулярного бензодиазепинового рецепторного комплекса и его лигандов

В конце 70-х годов тремя независимыми группами исследователей [3—5], использовавших [^3H]диазепам, было показано специфическое высокоаффинное связывание этого бензодиазепина (а также других веществ этого ряда) с мозговыми мембранами высших позвоночных, включая человека. Эти места связывания были обозначены как бензодиазепиновые

рецепторы (БДР); показано, что они полностью отвечают критериям *фармакологического* рецептора, то есть связывают лиганд быстро, обратимо, стереоспецифично и с насыщением. Существенным было выявление высокой корреляции между способностью бензодиазепинов вытеснять диазепам из мест специфического связывания и активностью в поведенческих тестах на животных [6] и, что важно, терапевтической эффективностью этих веществ в сопоставимых дозах у людей [7]. Несмотря на эти важные открытия, БДР до сих пор не всеми признаны в качестве рецепторов. Некоторые авторы относят их к «акцепторам» или «модуляторам», так как для лигандов БДР не выявлено индуцирование биохимических и биоэлектрических процессов в синаптической мембране, свойственное нейромедиаторам [8]. Считают, что БДР функционируют опосредованно, в частности, путем усиления эффективности связывания ГАМК, что приводит к открыванию хлорид-ионных каналов [9]. Определение БДР как «акцепторов», возможно, является более корректным и более точно отражает их функциональную сущность. С помощью радиолигандных методов было показано, что БДР существуют как на нейронах головного мозга (центральные рецепторы, высокоаффинные к клоназепаму) [10], так и на глиальных элементах мозга [11,12], а также клетках иной природы (периферические рецепторы, высокоаффинные к Ro 5-4864) [13]: в сосудистой оболочке глаза, канальцах почки, желудочках сердца [15]; коре надпочечников, слюнных железах, эпителии легких, языка, полости носа, легочных артериях, вилочковой железе [17], костном мозгу, печени, селезенке [16,17]. Эти места связывания не имеют отношения к центральному действию бензодиазепинов (БД) и могут быть связаны с другими их эффектами. Описана также популяция низкоаффинных БДР-мозга, возможно, связанная с системой кальций-кальмодулинзависимой протеинкиназы [18], однако локализация и функции этой популяции остаются неясными.

В настоящее время большинство исследователей рассматривают БДР как составную часть супрамолекулярного комплекса, состоящего из мест специфического связывания (МСС) бензодиазепинов, ГАМК, а также хлорид-ионного канала [19], некоторые авторы к этому добавляют места специфического связывания для пикротоксина и барбитуратов [20]. Биохимические исследования подтверждают эту гипотезу. Выделен единый белковый комплекс с M_r 200 кД, содержащий 3-4 субъединицы: 53 кД, две субъединицы по 57 кД, непостоянная субъединица 65 кД [21]. В очищенных препаратах белкового комплекса показано наличие МСС агонистов и антагонистов ГАМК и БД, пентобарбитала, модуляторов бициклофосфатных каналов. Считают [22,23], что при этом «ГАМК—БДР—Cl-канал» комплекс существует в двух равновесных конформационных состояниях: 1) основное состояние БДР (в отсутствие лигандов), при котором хлорид-ионный канал закрыт; 2) активное состояние (в присутствии ГАМК и БД), при котором хлорид-ионный канал открыт.

Для широкого спектра хорошо идентифицированных лигандов бензодиазепиновых рецепторов в настоящее время наиболее распространенной является систематизация, согласно которой выделяют три типа лигандов БДР [20, 22, 24, 25].

1. *Полные агонисты.* Вызывают изменение конформации БДР, что повышает вероятность открывания хлорид-ионных каналов при активации ГАМК-рецепторов, а также аффинность ГАМК-рецепторов к ГАМК. К этой группе относятся прежде всего все 1,4-бензодиазепины (диазепам и др.).

2. *Обратные (инверсные) агонисты.* Эти вещества также вызывают изменение конформации БДР, однако возникающие изменения имеют противоположное функциональное значение: снижают вероятность открывания хлорид-ионных каналов, а также ингибируют связывание ГАМК с рецептором. Поскольку они вызывают изменения в функционировании бензодиазепинового рецептора, то являются агонистами, но так как эти изменения противоположны вызываемым классическими бензодиазепинами физиологическим эффектам, этим веществам присвоили необычный термин обратных (инверсных) агонистов. Вследствие угнетающего воздействия на супрамолекулярный ГАМК-БДР-Cl-ионный комплекс, эти вещества сходны по действию с блокаторами ГАМК-рецепторов (купируют действие веществ, для которых необходимо функционирование хлорных каналов). Основу этой группы составляют β -карболины и их производные (β -карболин-3-карбоксилат этиловый эфир (БК-3-КЭЭ), пропиловый (БК-3-КПЭ), метиловый (БК-3-КМЭ) и другие).

3. *Антагонисты (конкурентные блокаторы БДР).* Эти соединения связываются с БДР без заметного индуцирования функциональных изменений в рецепторе, своим присутствием препятствуют доступу как агонистов, так и инверсных агонистов к субстрату. Эти вещества принадлежат к классическому типу конкурентных блокаторов, которых характеризует высокая аффинность и отсутствие четкого «собственного» действия. К ним относят Ro 15-1788 и Ro 15-3505. В последнее время подразделения лигандов БДР на группы несколько усложнилась [26]. Обнаружены агонисты, не имеющие типичной структуры бензодиазепинов [циклопирролоны, например, зопиклон, Z K 03423 и триазолопиридазины (CI 218 872)], проявляющие лишь некоторые свойства бензодиазепинов. У конкурентных антагонистов (Ro 15-1788) были найдены «собственные» психотропные свойства [27,28]. Кроме того, для ряда веществ (Ro 16-6028, Ro 17-1812, CGS 9896) были установлены как агонистический, так и антагонистический эффекты. Эти вещества были обозначены как «смешанные» агонист/антагонисты [29,30]. В связи с существенным усложнением проблемы, видимо, правильнее говорить о континууме лигандов БДР: полные агонисты — смешанные агонист-антагонисты (частичные агонисты) — чистые антагонисты — смешанные антагонист/агонисты (частичные обратные агонисты) и обратные (инверсные) агонисты [32,23].

Этологическая фармакология лигандов бензодиазепиновых рецепторов

Классические агонисты: производные 1, 4-бензодиазепина. Большинство работ по поведенческому изучению производных бензодиазепинов (БД) посвящено описанию и анализу анксиолитического (транквилизирующего) действия этих веществ, которое в эксперименте, как правило, оценивается по активации диктуемого потребления пищи и питья [34, 36]. В настоящее

время по этим критериям [36] предсказано терапевтическое действие ряда производных бензодиазепинов [37,38]. Вместе с тем, перечисленные «классические» показатели вызывают широкие дискуссии в отношении адекватности оценки именно анксиолитических свойств, возможной интерференции с «амнестическим» эффектом бензодиазепинов, влиянием на обучение и другими [36].

Дальнейшим шагом в развитии методологии изучения транквилизаторов и анксиогенных средств стали этологически ориентированные исследования. Этологическая фармакология возникла как междисциплинарная наука [2,14,35,39,43], включающая специфические этологические модели, компьютерные математические методы анализа поведения, а также нейрофармакологические и нейрхимические принципы исследования ЦНС. Этологофармакологические исследования показывают, какой «поведенческой ценой» могут быть достигнуты с помощью психотропных средств (лигандов БДР) подавление страха-тревоги или агрессии, какие существенные изменения произойдут в целостной структуре поведения животных (ее программе).

Компьютерные этограммы показывают общие свойства и особенности в спектрах действия бензодиазепинов: хлордiazепоксид, diaзепам, медазепам, феназепам, причем среди общих свойств наиболее важным является смещение элементов поведения (всей его структуры) в сторону более «социальных» форм [14, 35, 39, 43].

Большое внимание в области этологической фармакологии было уделено разработке экспериментальных моделей страха-тревоги, которые в наиболее полной мере отражают количественно и качественно поведенческую структуру этих состояний у животных. Одной из таких моделей является длительное (до 4-х недель) содержание грызунов в одиночных клетках, в результате которого у части из них возникает поведение страха-тревоги (с довольно сложной структурой, включающей боковые, вертикальные защитные стойки, избегание партнера и т.п.) как реакция на подсадку в клетку «нейтрального» партнера из группы [14, 39, 40, 43]. Этот метод требует специального отбора однополовых животных, что и дает надежные результаты [39]. Препараты бензодиазепинового ряда (экзогенные лиганды БДР) селективно подавляли проявления страха-тревоги, усиливали различные формы внутривидовых контактов с партнером (например, общительность) [14, 39].

Метод изоляции в одиночных клетках был успешно использован для определения минимальных доз БД, вызывающих изменения в общей структуре поведения страха-тревоги, снижение защиты и избегания у мышей [40,41]. Эти дозы были в следующих пределах: нитразепам — 0,25 мг/кг, оксазепам — 2,5 мг/кг и diaзепам — 3,0 мг/кг [40,41]. Среди недостатков метода следует отметить, что он дает только от 15 до 30% мышей с ярко выраженным поведением страха-тревоги (остальные животные реагируют на партнера агрессивно или нейтрально), поэтому возникла необходимость в создании модели с более высоким «выходом» в количественном отношении, стабильным уровнем и широким спектром защитных реакций. Это было достигнуто в другой модификации метода [14,42], где использовалось комплексное воздействие на неагрессивных мышей, вклю-

чавшее ноцицептивную стимуляцию животного на электродном полу в непредсказуемом для него режиме и встречи с высокоагрессивным партнером, который атаковал подопытного. Эти приемы позволили стабилизировать модель, и ее хорошая предиктивная сила в отношении транквилизирующих эффектов была продемонстрирована при использовании большого ряда БД препаратов [42,43]. Анализ действия БД на агрессивное поведение в последние годы был проведен достаточно детально с использованием целого ряда моделей: агрессии, вызванной изоляцией, электростимуляцией, материнской агрессии, мурицидной агрессии крыс, межгрупповой, территориальной и других моделей агрессии [2,14,43—46]. Общей характеристикой влияния 1,4-бензодиазепинов на агрессивное поведение является усиление атак и угроз при введении малых доз и подавление агрессии при введении больших доз этих соединений [46, 47, 48, 49]. В экспериментах на животных показан также ряд других, общих для БД фармакологических эффектов, например, седативное действие в тестах наказуемого потребления пищи и питья. Было показано угнетение диктуемого компонента поведения, коррелирующее со снижением двигательной активности [50]. Противострессорное действие изучалось на моделях стресса неизбежного болевого раздражения, шумового стресса, стресса аверсивного взаимодействия. Было показано, что бензодиазепины предотвращали повышение уровня кортикостерона [51] или снижали его увеличение в ответ на стресс [52—54] в плазме крови. Влияние на исследовательскую активность хорошо изучено в лабиринте и тесте «открытого поля». Показано усиление исследования в малых и средних дозах (коррелят снижения страха) и угнетение большими дозами [55,56].

Инверсные агонисты: производные β -карболинов. β -Карболины относятся к трициклическим соединениям, сходным с 3-аминоэтилиндолами и триптофаном. Первые идентифицированные БК были выделены из растений. Позже были выделены алкалоиды со структурой БК, включая резерпин, иохимбин, аямалицин, винкин, иобрин. Эндогенные БК были обнаружены в моче человека и крыс [57]. Однако присутствие БК *in vivo* подвергали сомнению, так как обнаружение эфиров БК-3 имело отношение к результатам самого процесса экстракции. Последующие работы показали, что трициклические β -карболиновые структуры присутствуют также *in vivo*. В тромбоцитах крови человека был обнаружен гарман (1-метил- β -карболин) [58] и тетрагидроногарман (1,2,3,4-тетрагидро- β -карболин), также найденный в мозговой ткани в низких концентрациях [59]. Путь биосинтеза, ведущий к образованию БК у человека, пока не совсем ясен. Полагают, что скорее это происходит вследствие неферментативного контакта серотонина и некоторых его метаболитов с ацетальдегидом или в результате циклизации предшественника серотонина—L-триптофана.

Собственные психотропные эффекты β -карболинов стали изучать после того, как была открыта их способность вытеснять диазепам из мест специфического связывания, то есть обнаружено родство БК к «бензодиазепиновым» рецепторам [60]. Оказалось, что целый ряд БК, обладающих высоким сродством к БДР, сравнимым с диазепамом (IC_{50} соответственно равны $7 \cdot 10^{-6}$ и $4 \cdot 10^{-6}$ М) [61], обнаруживает противоположные по

сравнению с бензодиазепинами поведенческие эффекты. Собственно поэтому их называли обратными (инверсными) агонистами БДР. К ним относят: ДМСМ (метил-6, 7-диметокси-4-этил-β-карболин-3-карбоксилат), тони-на—L-триптофана, эфиры β-карболин-3-карбоксилата (БК-3-К)—метиловый (БК-3-К-МЭ), этиловый (БК-3-КЭЭ), пропиловый (БК-3-КПЭ); FG 7142 (метиламид β-карболин-3-карбоксилата) и некоторые другие β-карболины. Основными фармакологическими характеристиками β-карболинов являются анксиогенное и проконвульсивное действие. У грызунов анксиогенный эффект β-карболинов изучали на моделях наказуемого потребления пищи и питья [62], а также в тесте внутривидового взаимодействия [43]. Использование данных моделей показало, что β-карболины FG 7142, БК-3-КМЭ, БК-3-КЭЭ угнетают наказуемое потребление пищи и питья [62, 63]. Эти же эфиры БК-3-К, а также производные β-карболинов ДМСМ и FG 7142 вызывали снижение числа контактов между особями [64, 65]. Указанные проявления анксиогенного эффекта коррелировали с возникновением при приеме β-карболинов «синдрома страха» у человека [66] и макак резусов [67].

Проконвульсивное, треморогенное и судорожное действие показано у большинства β-карболинов как на грызунах [68, 69], так и на приматах [70]. Купирование вызванных БК судорог возможно введением определенных доз диазепама, а также антагониста бензодиазепиновых рецепторов Ro 15-1788 [71, 72]. Среди других поведенческих характеристик БК общим является угнетение исследовательской и двигательной активности животных, обнаруженное у БК-3-КЭЭ [41], FG 7142 [62] и других β-карболинов [73]. На агрессивное поведение БК оказывали модулирующее действие; показано как угнетение [43, 46], так и активация [41, 43] различных форм агрессии β-карболинами. Данные о влиянии β-карболинов на поведение защиты крайне немногочисленны и показывают, в основном, усиление отдельных компонентов защитных реакций животных под действием этих препаратов [42, 43].

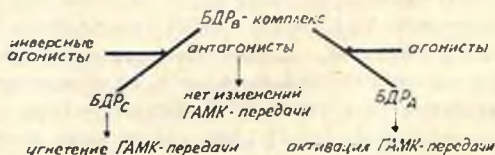
Антагонисты бензодиазепиновых рецепторов. Эта группа лигандов немногочисленна, наиболее изучены среди ее представителей этологические характеристики Ro 15-1788. Ro 15-1788 (этил-8-фтор-5,6-дигидро-5-метил-6-оксо-4H-имидазо-1,5a 1,4-бензодиазепин-3-карбоксилат) вначале был определен как «чистый» БД-антагонист, не обладающий собственными фармакологическими эффектами [71]. Однако вскоре стали появляться сообщения о наличии у Ro 15-1788 собственной активности, так что в настоящее время можно указать основные поведенческие эффекты Ro 15-1788: активация агрессивного поведения [40], угнетение внутривидовой общительности и диктуемого потребления пищи и питья [74, 75]. Ro 15-1788 купирует судороги различного генеза: вызванные введением коразола, биксукуллина, Ro 5-3663, Ro 5-4864 [75, 76]; вызванные электростимуляцией миндалины, электрошоком, звуковой стимуляцией [77]. Данные о влиянии Ro 15-1788 на защитное поведение показывают усиление актов и поз, связанных как с настороженностью у мышей [40], так и с подавлением пассивно-оборонительных реакций [78].

Нейрохимические характеристики лигандов бензодиазепиновых рецепторов

Классические агонисты: производные 1,4-бензодиазепинов. Наиболее изученными являются нейрохимические характеристики 1,4-бензодиазепинов, в частности при длительном введении этих веществ и необратимом связывании БД с рецепторами.

Данные о чувствительности БДР к воздействию 1,4-бензодиазепинов следует тщательно анализировать в зависимости от условий проведения экспериментов, так как отмечены случаи повышения [79], снижения [80] и даже отсутствия изменения [81] плотности МСС бензодиазепинов при длительном введении диазепама и медазепама. Сообщается о повышении аффинности БДР через 10 дней после начала инъекций диазепама на фоне развития поведенческой толерантности к препарату [82]. Более обширные исследования, посвященные изучению нейрохимических характеристик БД *in vitro*, в частности анализу данных необратимого связывания меченых бензодиазепинов. Например, было показано, что даже при оптимальных условиях (10—20 нМ [^3H]флунитразепама, большое время инкубации) специфическое необратимое связывание [^3H]флунитразепама с мембранами составляет только 25% возможных мест связывания, хотя почти 100% обратимых МСС было инактивировано при этих условиях [83].

Возникла гипотеза о том, что бензодиазепиновый рецептор имеет, по крайней мере, четыре места связывания для БД, а необратимое присоединение [^3H]флунитразепама инактивирует обратимое связывание его с тремя остальными местами специфического связывания [84]. Эта гипотеза была подтверждена впоследствии, когда для каждой молекулы [^3H]флунитразепама, специфически и необратимо связавшейся с БДР, было определено примерно три молекулы [^3H]флунитразепама, которые диссоциируют с «первично захваченных» обратимых МСС [83].



Эксперименты с радиолигандными антагонистами и инверсными агонистами БДР в известной мере способствовали раскрытию некоторых механизмов инактивации МСС. Было показано, что после фотосвязывания мозговых мембран с 10 нМ флунитразепама специфическое связывание БД-антагонистов и инверсных агонистов [^3H]БК-3-КПЭ, [^3H]Ro 15-1788, [^3H]БК-3-КМЭ лишь умеренно понижено, тогда как связывание [^3H]диазепама было почти полностью редуцировано [85]. При измерении ингибирования связывания [^3H]БК-3-КМЭ и [^3H]Ro 15-1788 бензодиазепиновыми

агонистами и антагонистами показано 20—100-кратное снижение связывания агонистов БДР, в то время как связывание антагонистов и инверсных агонистов было неизменно или даже слабо повышалось [85].

Таким образом, флунитразепам не только необратимо связывается с одним из четырех бензодиазепиновых МСС, но также изменяет конформацию трех остальных МСС в направлении снижения их аффинности к бензодиазепиновым агонистам и стабильности или слабого повышения аффинности к БД-антагонистам или инверсным агонистам.

Полученные данные послужили основой для формирования конформационной теории БДР [86], предполагающей, что ГАМК-БД-рецепторный комплекс содержит, по крайней мере, четыре бензодиазепиновых места связывания, каждое из которых может находиться в трех разных конформациях, свободно переходящих друг в друга (БДР_A, БДР_B, БДР_C) (рисунок). В отсутствие лигандов бензодиазепиновые места связывания принимают конформацию БДР_B. При наличии лигандов конформационным изменениям рецептора предшествует фаза «узнавания». Антагонисты предположительно опознаются по четырем позициям: 1) ароматическое шестичленное кольцо; 2) окисленный атом углерода (группа C=O); 3) гидрофобный участок; 4) донор водорода, группа -H (у Ro 15-1788 ее нет). Для узнавания агонистов, видимо, добавляются еще три «точки»; 5) место, узнающее C(5)-фенильную группу; 6) катион, связывающий иминовый атом азота диазепинового кольца; 7) катион, связывающий C(7)-электроотрицательный заместитель [87]. За этой фазой следуют конформационные превращения рецептора. Бензодиазепиновый агонист переводит конформацию БДР_B в БДР_A, которая активирует ГАМК-индуцированную проницаемость Cl-каналов (возможно, этот механизм участвует в реализации антиконвульсивного и анксиолитического эффектов агонистов). Инверсный агонист БДР типа БК-3-КМЭ или ДМСМ переводит конформацию БДР_B в БДР_C, которая угнетает ГАМК-индуцированную Cl-проницаемость (опосредуя проконвульсивный и анксиогенный эффекты этих веществ). Антагонисты БДР типа Ro 15-1788, Ro 15-3505 связываются с БДР_B формой без изменений ее конформации и ГАМК-индуцированной синаптической передачи. Поэтому они противодействуют эффектам агонистов и инверсных агонистов БДР.

Инверсные агонисты: производные β-карболинов. Для [³H]меченных β-карболинов было показано высокоаффинное связывание с мембранами мозга и установлено, что они связываются с бензодиазепиновыми рецепторами [88]. Впоследствии некоторые производные БК, например, метиловый, этиловый, пропиловый и бутиловый эфиры БК-3-К были определены как селективные лиганды бензодиазепиновых рецепторов [88, 90]. Однако с первых шагов нейрохимического изучения производных β-карболинов весьма актуальной стала проблема существования МСС этих веществ и возможной их самостоятельной роли в регуляции поведения и объяснения механизмов психотропных эффектов. Поводом для детального рассмотрения этой проблемы послужили три основных группы экспериментов.

Во-первых, это опыты с ГАМК-стимуляцией связывания [³H] меченных β-карболинов, в которых было показано, что связывание

[³H]БК-3-КЭЭ и других β-карболинов не зависит от активности ГАМК, тогда как связывание бензодиазепинов ГАМК интенсивно стимулирует [91].

Во-вторых, эксперименты с необратимым связыванием меченых бензодиазепинов после обработки мембран ультрафиолетовым облучением. Резкое снижение связывания БД мембранами, подвергшимися необратимому связыванию [³H]флунитразепама, не затрагивающее связывания БК-3-КЭЭ и других β-карболинов, большинство авторов объясняло наличием четырех мест связывания в БДР-комплексе [86]. Параллельно возникло предположение, что не все из них предназначены для связывания бензодиазепинов и часть из них является β-карболиновыми МСС. Обработка мембран ультрафиолетовым облучением, вызывающая модификацию БД-мест связывания, приводит к необратимой ассоциации [³H]флунитразепама с рецептором, а характеристики МСС β-карболинов тем не менее не изменяются [85, 91, 92].

Третья группа данных связана с сопоставлением общего числа мест связывания, меченных [³H]флунитразепамом и эфирами БК-3-К. Для ряда структур головного мозга эти числа мест связывания оказались неидентичными [80, 88, 93, 94]. В экспериментах Ehlerl и соавт. [95] выявлена небольшая популяция рецепторов (3—6%), высокоаффинная к β-карболинам. На гибридомах мышей получены моноклональные антитела, специфически связывающиеся с агонистами БДР, но не с инверсными агонистами (БК-3-КЭЭ) [96]. Тем не менее в этих работах [88, 93, 94, 96] не предполагали наличия МСС β-карболинов, не придерживаясь концепции о бензодиазепиновых β-карболиновых лигандах бензодиазепинового рецепторного комплекса. Следует отметить, что высказывалось предположение о наличии в составе «комплекса» мест связывания (изолированных локусов) как для БД, так и для БК [88] или о существовании двух типов БДР с разным сродством к бензодиазепинам и β-карболинам [97]. Таким образом, вопрос о независимом существовании, функциях и распределении именно β-карболиновых рецепторов в головном мозгу становится все более актуальным и требует дальнейшей разработки.

Антагонисты бензодиазепиновых рецепторов. Методом радиоавтографии на грызунах было показано быстрое и преимущественное накопление радиоактивного материала в головном мозгу после внутривенного введения [³H]Ro 15-1788. Наибольшее накопление радиоактивного материала наблюдалось в лобной коре и обонятельной луковице, несколько меньшее — в бледном шаре, миндалине, черной субстанции, мосте и гиппокампе [98]. Скорость снижения содержания радиоактивного материала была наибольшей в мосте, а самой низкой — в обонятельной луковице. У людей максимальный уровень связывания [¹¹C]Ro 15-1788, определенный *in vivo* методом позитронной эмиссионной томографии, зарегистрирован в медиальной затылочной зоне коры больших полушарий головного мозга. В ряду фронтальная кора, мозжечок, таламус, стриатум, мост — плотность связывания Ro 15—1788 убывала [99]. Эти данные существенно дополняют представления о локализации БДР у людей и животных.

Таким образом, анализ результатов работ последних лет в области нейрхимии и экспериментальной психофармакологии бензодиазепинов

показывает, что классические агонисты бензодиазепиновых рецепторов и инверсные агонисты (производные β -карболинов) имеют различные этологические профили, отражающие их анксиолитический или анксиогенный потенциал. Начинает формироваться экспериментальная основа, группа фактов, которая ставит под сомнение варианты реализации противоположных поведенческих эффектов посредством одного и того же бензодиазепинового рецептора. Имеются объективные этологические и нейрохимические свидетельства возможной разобщенности бензодиазепиновых и β -карболиновых мест связывания и реализации анксиогенных свойств β -карболинов посредством вовлечения специфических рецепторов.

ETHOLOGICAL PHARMACOLOGY AND NEUROCHEMISTRY OF BENZODIAZEPINES AND β -CARBOLINES

Poshivalov V. P., Suchotina I. A.

Pavlov First Medical Institute, Leningrad

New data on multidisciplinary investigations related to synthesis of neurochemical and ethopharmacological research are represented in review. Special attention is devoted to classification, systematization and characteristics of behavioural effects of ligands of benzodiazepine receptors (BDR), including endogenous BDR ligand (β -carbolines — BC). The role of inverse agonists of BDR in the process of modulation of fear, timidity and aggressive behaviour is shown. Some new perspectives of application of ethological analysis and behavioural models for assessment of psychotropic properties of agonists and antagonists BDR is noted. Experimental data and conceptions on possible divergenton of benzodiazepine and BC independing binding sites and possible realization of anxiogenic prorteries of BC by activation of specific BC-receptors are presented.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вальдман А. В. — В кн.: Теоретические основы патологических состояний, с. 196—206, Л., Наука, 1980.
2. Вальдман А. В., Пошивалов В. П. Фармакологическая регуляция внутривидового поведения. М., Медицина, 1984.
3. Bossman H., Case R., Di Stefano P. FEBS Lett., v. 82, p.368—372, 1977.
4. Braestrup C., Squires R. F. Brit. J. Psychiatry, v. 133, p. 249—260, 1978.
5. Mohler H., Okada T. Brit. J. Psychiatry, v. 133, p. 261—268, 1978.
6. Petersen E. N., Jensen L. H., Drejerg J., Honore T. Pharmacopsychiatry, v. 19, № 1, p. 4—6, 1986.
7. Tallman J. F., Paul S. M., Skolnick P., Gallager D. W. Science, v. 207, p. 274—281, 1980.
8. Haefeli W. L; Encephale, v. 9, p.143b—150b, 1983.
9. Martin J. I. Trends Pharmacol. Sci., v. 5, № 6, p. 343—357, 1984.
10. Braestpup C., Nielson M., Nielse E., Lyon M. Psychopharmacology, v. 65, p. 273—277, 1979.
11. Gallager D. W., Mallorga P., Gertel W., Henneberry R., Tallman J. F. Neurosci., v. 1, № 2, p. 218—225, 1981.
12. Фатеев В. А., Салеев В. Н., Тютюн Н. С. Фармакология и токсикология, № 1, с. 117—121, 1985.
13. Groh E., Muller W.E. Res. Commun. Chem. Pathol. and Pharmacol., v. 49, № 3, p. 463—466, 1985.

14. Poshivalov V. P. — In: Ethopharmacology of Agonistic Behaviour in Animals and Humans. Martinus Nijhoff publ., Dordrech, p. 122—131, 1987.
15. Gehlert D. R., Yamamya H. J., Wamsley J. K. № aunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., v. 328, № 4, p. 454—460, 1985.
16. Anholt R. R. H., de Souza E. B., Oster-Granite M. L., Snider S. N. J. Pharmacol. and Exp. Ther., v. 233, № 2, p. 517—526, 1985.
17. Suranyl-Cadotte B., Lal S., Nair N. P. V., Lafaille F., Quirion R. Life Sci., v. 40, № 15, p. 1537—1543, 1987.
18. Bowling A. C., De Lorenzo R. J. Science, v. 216, p. 1247—1249, 1982.
19. Dingemance J., Breimer D. D. Pharm. int., v. 5, № 2, p. 33—36, 1984.
20. Haefely W. -In: Discoveries in Pharmacology, v.1, Psycho- and Neuropharmacology (eds. M.J.Parnan, J.Bruinvels), Elsevier Science publishers B.V., 1983.
21. Mohler H., Sieghart W., Richards J.G., Hunkeler W. Eur. J. Pharmacol., v.102, p.191—192, 1984.
22. Braestrup C., Nielsen M., Honore T., Jensen L.H., Petersen E.N. Neuropharmacology, v.22, № 12b, p.1451—1457, 1983.
23. Gee R.W., Yamamura H.J. Eur. J. Pharmacol., v.82, p.239—241, 1982.
24. Richard J.G., Mohler H.J. Neuropharmacology, v. 23, № 2, p. 233—240, 1984.
25. Stephens D.N., Kehr W., Schneider H.H., Schmichen R. Neurosci. Lett., v.47, № 3, p.333—338, 1984.
26. Gut J.P., Laurent J.P., Mers M.A. Therapie, v.41, № 1, p.31—35, 1986.
27. Cooper S.J., Estall L.B. Neurosci. and Biobehav. Rev., v.9, № 11, p.5—19, 1985.
28. Schaffner R., Kueng E., Haefely W. Neurosci. Lett., suppl., № 22, p.96, 1985.
29. Bernhard P.S., Bennett D.A., Paster J., Yokoyama N., Liebman J.M. J. Pharmacol. and Exp. Ther., v.235, № 1, p.98—105, 1985.
30. Wood P.L., Loo P., Braunwalder A., Yokoyama H., Cheney D.L. J. Pharmacol. and Exp. Ther., v.231, № 3, p.572—576, 1984.
31. Haefely W. -In: Actions and Interactions of GABA and Benzodiazepins (ed. N.G.Bowery), № 4, p.263—285, Raven Press, 1984.
32. Pieri L. -In: Benzodiazepines: An update, where do we go from here, Symposium, Denmark, p.17—28, 1985.
33. Воронина Т.А., Фон-Литтров К. Фармакология и токсикология, № 3, с.296—299, 1980.
34. Geller J., Sciffer J. J. Psychopharmacology, v.1, p.482—492, 1960.
35. Пошивалов В.П. Успехи соврем. биол., вып.3, с.463—478, 1985.
36. Пошивалов В.П. Фармакология и токсикология, № 3, с.263—266, 1978.
37. Жердев В.П., Воронина Т.А., Экономов А.А., Мартынова Л.А. Фармакология и токсикология, № 6, с.67—70, 1985.
38. Karube T., Kamioka T. Ann. Rept. Sankyo Res. Lab., v.37, p. 84—89, 1985.
39. Krsiak M., Sulcova A., Donat P., Tomasikova Z., Dlohozkova M., Kosar E., Masek K. -In: Ethopharmacological Aggression Research, p.93—114, Alan R.Liss, N.Y., 1984.
40. Sulcova A., Krsiak M. Activ. nerv. super., v.26, № 4, p.255—256, 1984.
41. Sulcova A., Krsiak M. Activ. nerv. super., v.27, № 4, p.308—319, 1985.
42. Сухотина И.А., Вербицкая Е.В. Тезисы докл. Всесоюз. конф. «Экспериментальная и клиническая фармакология болеутоляющих средств», Л., с.107—108, 1986.
43. Пошивалов В.П. Экспериментальная психофармакология агрессивного поведения, Л., Наука, 1986.
44. Пошивалов В.П., Сухотина И.А., Вербицкая Е.В., Косенкова Н.С. Тезисы докл. IV съезда Всесоюз. териол. общества, М., т.2, с.156—157, 1986.
45. Olivier B., Mos J., Oorschot R., Van. Psychopharmacology, v.86, p.68—76, 1985.
46. Skolnick P., Rud G.F., Paul S.M. Pharmacol. Biochem. and Behav., v.23, № 1, p.17—20, 1985.
47. Сухотина И.А. -В кн.: Проблема фармакологической регуляции патологических процессов, с.16, Л., Изд-во I ЛМИ им. И.П. Павлова, 1985.
48. Olivier B., Mos J., Oorschot R. Van. Psychopharmacology, v.88, № 1, p.40—43, 1986.
49. Traversa U., Angelis L., Della Loggia R., Bertolissi M., Nardini G., Vertua R. -Pharmacol. Biochem. and Behav., v.23, № 2, p.237—241, 1985.
50. Babbini M., Gaiardi M., Bartoletti M., -Pharmacol. Biochem. and Behav., v.17, № 1, p.43—48, 1982.
51. File S.E. Psychopharmacol. and Biol. Psychiatr., v.8, p.19—31, 1984.

52. Бледнов В.А., Середенин С.Б. - В кн.: Итоги науки и техники, т.15, с.118—169, М., Изд-во ВИНТИ, 1987.
53. Boaventura A.M., Mouron M., Boisser J.R. - J. Pharmacol., v.17, № 3, p.369—374, 1986.
54. McElroy J.F., Miller J.M., Moyer J.S. - Psychopharmacology, v.91, № 4, p.467—472, 1987.
55. Хоничева Н.М., Гуляева Н.В., Горбач А.М. Журн. высш. нервн. деят-сти, т.35, № 1, с.155—163, 1985.
56. File S.E., Pellow S. - Behav. Brain. Res., v.17, № 1, p.1—7, 1985.
57. Braestrup C., Nielsen M., Olsen C.E. - Proc. Nat. Acad. Sci., v.77, № 4, p.2288—2292, 1980.
58. Bidder T.G., Schoemaker D.W., Boettiger H.G., Evans M., Gummins J.T. Life Sci., v.25, p.157—164, 1979.
59. Barker S.R., Harrison R.E., Brown G.B., Christian S.T. Biochem. Biophys. Res. Commun., v.87, p.146—154, 1979.
60. Nielsen M., Gredal O., Braestrup C. Life Sci., v.25, p.679—686, 1979.
61. Airaksinen M.M., Kari I. Medical Biol., v.59, p.190—211, 1981.
62. File S.E., Pellow S. Brit. J. Pharmacol., v.82, suppl., 1984.
63. Hindly S.W., Hobbs A., Petersen I.A., Roberts M.H.T. Brit. J. Pharmacol., v.86, № 3, p.753—761, 1985.
64. Corda M.G., Bisker W.D., Mendelson W.B., Guidotti A., Costa E. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v.80, p.2072—2076, 1983.
65. Barrett J.E., Brady L.S., Witkin J.M., Cook J.M., Larschield F. Life Sci., v.36, № 14, p.1407—1414, 1985.
66. Dorow R., Horowski G., Amin M., Braestrup C. Lancet, № 8341, p.98—99, 1983.
67. Ninan R.T., Insel T.M., Cohen R.M., Cook J.M., Skolnik P., Paul S.M. Science, v.218, p.1332—1334, 1984.
68. Morin A.M. Brain Res., v.321, № 1, p.151—154, 1984.
69. Rommelspacher H., Bruning G., Susilo R., Nick M., Mill R. Eur. J. Pharmacol., v.109, № 3, p.363—371, 1985.
70. Hantrave P., Chavoix C., Guibert B., Fukuda N., Brouillet E., Dodd R.H., Prenant C., Crouzel M., Naguez R., Maziere M. Eur. J. Pharmacol., v.138, № 2, p.239—247, 1987.
71. Valin A., Dodd R., Liston D.R., Potier P., Rossier J.J. Eur. J. Pharmacol., v.85, № 1, p.93—97, 1982.
72. Venault P., Carvalho L.P., de Brown S.L., Dodd R.H., Rossier J., Chapouthier G. Life Sci., v.39, № 12, p.1093—1100, 1986.
73. Долженко А.Т., Комиссаров И.В. Бюл. эксперим. биол. и мед., т.98, № 10, с.446—447, 1984.
74. File S.E., Pellow S. Brit. J. Pharmacol., v.84, suppl., p.103, 1985.
75. File S.E., Pellow S. Psychopharmacology, v.88, № 1, p.1—11, 1986.
76. Vellucci S.V., Webster R.A. Eur. J. Pharmacol., v.90, p.263—268, 1983.
77. Jensen L.H., Petersen E.N., Braestrup C., Honore T., Kehr W., Stephens D.N., Schneider H., Seidelmann D., Schmichen R. Psychopharmacology, v.83, p.249—256, 1984.
78. Rodgers R.J., Waters A.J. Physiol. and Behav., v.33, № 3, p.401—409, 1984.
79. Tyutyulkova N., Goranchova J., Stefanova D., Yanev S., Katzov G., Georgiev A. Weth. and Find. Exp. Clin. Pharmacol., v.8, № 12, p.711—713, 1986.
80. Medina J.H., Novas M.L., De Robertis E. Eur. J. Pharmacol., v.90, № 1, p.125—128, 1983.
81. Gallager D.W., Malcolm A.B., Anderson S.A., Gonsalves S.F. Brain Res., v.342, p.26—36, 1985.
82. Mele L., Sagratella S., Massotti M. Brain Res., v.323, № 1, p.93—102, 1984.
83. Sieghart W., Drexler G. J. Neurochem., v.41, p.47—55, 1983.
84. Thomas J.W., Tallman J.F. J. Biol. Chem., v.156, p.9838—9842, 1981.
85. Mohler H. Eur. J. Pharmacol., v.80, p.435—436, 1982.
86. Sieghart M., Pharmacopsychiatry, v.18, p.160—162, 1985.
87. Codding P.W., Muir A.K.S. Mol. Pharmacol., v.28, № 2, p.178—184, 1985.
88. Nielsen M., Schoer H., Braestrup S. J. Neurochem., v.36, № 1, p.276—285, 1981.
89. Gee R.W., Ehler F.J., Roeck W.R., Yamamura H.I. Nandb. Neurochem., v.6, p.575—595, 1984.
90. Shannon H.E., Gusman F., Cook J.M. Life Sci., v.35, № 22, p.2227—2236, 1984.
91. Martin I.L. Psychopharmacol. and Biol. Psychiatry, v.7, № 4—6, p.433—440, 1983.
92. Thomas J.W., Tallman J.F. J. Neurosci., v. 3, № 2, p. 433—440, 1983.
93. Сухотина И.А., Романец В.В., Пошивалов В.П. Бюл. эксперим. биол. и мед., № 6, с.678—681, 1987.

94. Tietz E.I., Chin T.H., Rosenbergh H.C. J. Neurochem., v.44, № 5, p.1524—1534, 1985.
95. Ehlert F.J., Roecke W.R., Yamamura H.I. Life Sci., v.29, p.235—248, 1981.
96. Sangameswaran L., Blas A.L. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v.82, № 16, 5560—5564, 1985.
97. Minchin M.C.W., Nutt D.J. J. Neurochem., v.41, .1507—1512, 1983.
98. D'Argy R., Persson A., Sedvall G. Psychopharmacology, v.92, № 1, 1987.
99. Persson A., Ehrin E., Eriksson L., Farde L., Medstrom C., Litten J.-E., Mindus P., Sedvall G. J. Psychiat. Res., v.19, № 4, p.609—622, 1982.

Поступила 27.03.1989

РЕЦЕНЗИИ

Excitatory Amino Acids in Health and Disease. Ed. D. Lodge, John Wiley, Chichester-N.Y., 1988, 402 p.

Возбуждающие аминокислоты в норме и патологии (под ред. Д. Лоджа, 1988, 402 с.)

Книга представляет собой одну из последних публикаций в той области современной нейробиологии, где за несколько последних лет наблюдается лавинообразное развитие исследований, приведшее к формированию принципиально новых направлений. Достаточно сказать, что проблеме возбуждающих аминокислот (ВАК) — нейротрансмиттеров ежегодно посвящаются несколько специальных симпозиумов, последний из которых, организованный Британским фармакологическим обществом совместно с Бристольским университетом, состоялся в апреле 1989 г. в Великобритании.

Проблема возбуждающих аминокислот, к которым относятся прежде всего глутаминовая и аспарагиновая кислоты, и их рецепторов неизменно оказывается в центре внимания практически любого крупного научного форума в области нейронаук, будь то физиология, нейробиология, нейропсихофармакология и т.д. С чем же связан столь активный интерес к ВАК-нейротрансмиттерам и их рецепторам и почему исследования в этой области приобрели особенно в последние 2—3 года характер взрыва? Ответом на эти вопросы и является рецензируемый сборник, содержащий доклады, прозвучавшие на очередном симпозиуме Биологического Совета по действию лекарственных веществ, организованном в Лондоне под руководством проф. D.Lodge (Отдел физиологии Королевского ветеринарного колледжа, Лондон).

Книга подготовлена большим авторским коллективом ученых, известных своим вкладом в изучение проблемы ВАК. Она состоит из 19 отдельных глав. В структуре сборника нашло отражение современное состояние проблемы в ее нескольких узловых аспектах: подробно рассматриваются такие группы вопросов, как строение и специфичность действия агонистов и антагонистов глутаматных рецепторов (главы 1—3); фармакологическая характеристика подтипов этих рецепторов с обоснованием их деления на две главные подгруппы — NMDA- и неNMDA-рецепторы (главы 1, 4, 5); детальное описание молекулярных свойств рецепторно-ионного комплекса (глава 4); локализация (картирование) ВАК-нейротрансмиттеров, их терминалей и рецепторов в мозгу (глава 6); молекулярные механизмы регуляции NMDA-рецептора и сопряженного с ним ионного канала, роль двухвалентных катионов кальция и магния, модулирующая функция глицина (главы 7, 8).

Другая группа вопросов касается функциональной роли ВАК-нейромедиаторов и соответственно их рецепторов в осуществлении синаптической передачи (главы 9, 10). Показано, что быстрый и медленный компоненты возбуждающего сигнала передаются с одного нейрона на другой при

участии разных подтипов вАК-рецепторов, по-видимому, квисквалентного в первом случае и NMDA-подтипа — во втором. Главы 11—13 посвящены изучению взаимодействия ряда нейротропных веществ — барбитуратов, сигма-опиатных лигандов, фенциклидина и его аналогов на вАК-ергическую нейротрансмиссию. Специальное внимание уделено проблеме синаптической пластичности на уровне гиппокампальной нейротрансмиссии (глава 14). Здесь, как и в ряде других разделов, широко использованы современные электрофизиологические подходы, оказавшиеся весьма информативными при изучении природы вАК-нейротрансмиссии и механизмов ее регуляции, особенно в условиях модулирующих воздействий фармакологическими веществами. К этому примыкает глава, посвященная рассмотрению гипотезы о возможном участии NMDA-рецепторов гиппокампа в процессах обучения и памяти.

Последний раздел книги содержит ряд глав, где подробно рассматривается один из важнейших на сегодня аспектов проблемы вАК, имеющий принципиальное значение для медицины. Речь идет о вовлечении системы вАК в патогенез целого ряда достаточно разнообразных по своей частоте и распространенности, а следовательно, и социальной значимости заболеваний ЦНС. К ним относятся шизофрения и аффективные расстройства, пресенильная деменция типа Альцгеймера, приобретающая в последнее время значительный удельный вес в патологии пожилого возраста, эпилепсия и другие судорожные расстройства, нейродегенеративные заболевания, спастичность. Особый интерес вызвали появившиеся в 1983—86 гг. сообщения о возможной патогенетической роли NMDA-рецепторов в развитии ишемии мозга и формировании постишемического инсульта. Этот круг вопросов детально рассматривается в главах 16—19 рецензируемого издания. Здесь, в частности, подробно излагаются результаты исследований, показавших принципиальную возможность терапевтического эффекта веществ, являющихся антагонистами NMDA-рецепторов, при фокальной ишемии мозга, моделируемой путем перевязки одной из ветвей внутренней сонной артерии у животных.

Наиболее эффективными в плане предупреждения развития постишемического некроза мозговой ткани оказались неконкурентные антагонисты NMDA-рецепторов, в частности трициклическое соединение МК—801, которое в настоящее время проходит стадию клинических испытаний.

В целом рецензируемая книга должна быть оценена очень высоко. Ее отличают современность, высокий научный уровень всех разделов, широта постановки проблем, удачное построение и правильный подбор авторов отдельных глав, каждый из которых, как уже отмечалось, является признанным экспертом в своей области. В этом, несомненно, большая заслуга редактора сборника, одного из видных специалистов по проблеме вАК проф. D.Lodge.

Разумеется, в книге, как и в научной программе симпозиума, материалы которого в ней обобщены, не могли найти отражение все аспекты проблемы вАК-нейротрансмиссии. Мало внимания уделено, на наш взгляд, поведенческой фармакологии веществ, функционально и структурно связанных с глутаматом, не затронуты вопросы нейрохимии пресинаптического звена нейротрансмиссии, такие как высвобождение и обратный захват нейромедиатора.

диаторов, пути и механизмы их регуляции.

Нет сомнения в том, что благодаря своей информативности и новизне рецензируемая книга будет с интересом встречена научными работниками и врачами нашей страны. Перевод книги на русский язык был бы несомненно целесообразен.

К.С.РАЕВСКИЙ

С. Х. ХАЙДАРЛИУ *«Нейромедиаторные механизмы адаптации»*,
Кишинев, «Штиинца», 1989, 180 с.

Высокое в настоящее время и все больше нарастающее воздействие на население ноцицептивных антропогенных стрессорных факторов вызывает соответственно и все большее напряжение естественных механизмов адаптации, до известных пределов сдерживающих отрицательные последствия развивающегося стресса. При определенных обстоятельствах все это характерно и для сельскохозяйственных животных и приводит иногда даже к их гибели. Поэтому всестороннее изучение механизмов адаптации организма, прежде всего млекопитающих, к изменяющимся условиям среды обитания (особенно к возникающему при этом состоянию стресса) путем регуляции активности этих механизмов и возможной их коррекции имеет не только фундаментальное, но и важное практическое значение как для медицины, так и для ветеринарии.

В связи с этим большое внимание привлекают весьма актуальные монографии С. Х. Хайдарлиу, посвященные биохимическим аспектам адаптации, — «Функциональная биохимия адаптации» (1984) и последующая за ней, рецензируемая теперь книга, представляющие собой творческие критические обобщения на современном уровне литературных и значительных собственных данных автора. Уже в первой из этих монографий особо подчеркнута важнейшая роль, которую играют в биохимических адаптационных реакциях нейромедиаторные системы. Накопленные в последние годы сведения укрепили эту концепцию, и рецензируемая книга, посвященная уже более детальному и глубокому рассмотрению именно нейромедиаторных механизмов адаптации, явилась закономерным логичным продолжением первой монографии.

В небольшой по объему книге автор осветил по существу все основные вопросы рассматриваемой проблемы. После очень краткого «Введения» в разделе I крайне сжато, но четко изложены основные «Общие представления об адаптации и роли нейромедиаторных систем в ее развитии». При этом автор достаточно обоснованно определил адаптацию как «процесс или результат процесса структурно-метаболической реорганизации функций, обеспечивающей восстановление гомеостаза на прежнем или поддержание его на новом уровне». В том же разделе привлечено внимание к тому, что включение адаптивных реакций в ответ на действие соответствующих раздражителей и реализация этих реакций зависят от активности определенных нейромедиаторных систем. Морфологически такие реакции связаны с определенными нейронными системами в ЦНС и с достаточно сложными процессами на уровне отдельных клеток. Данные проблемы рассмотрены соответственно в разделах II и III.

В разделе IV изложены и обсуждены факты, имеющие уже прямое отношение к основной теме рецензируемой монографии — «Реакция отдельных нейромедиаторных систем при адаптации к действию различных факторов среды»: рассмотрены сдвиги в активности холин-, моноамин-,

аминоacid- и пептидергических систем. При этом в случае холинергической системы в деталях приведены интересные результаты собственных экспериментов автора. Был сделан важный вывод о том, что «холинергическая система при действии факторов среды принимает непосредственное участие в активации. . . механизмов адаптации. При запуске этих реакций формируется мультимедиаторная система, которая определяет параметры интегральной реакции организма».

Несомненно, что при всех состояниях ЦНС активность ее отдельных нейромедиаторных систем протекает не изолированно, а при их взаимодействии, что имеет место также при неспецифических и специфических адаптационных процессах. Этому кардинальному вопросу посвящен раздел V рецензируемой книги. В частности, автор справедливо пишет, что характер взаимоотношений между нейромедиаторными системами в ЦНС «имеет принципиальное значение для формирования адаптивных перестроек». В этом разделе также приведены и разнообразные материалы собственных исследований. Следует подчеркнуть, что экспериментальное изучение таких взаимоотношений, особенно внутри мультимедиаторных систем встречает серьезные методические трудности.

В разделе VI изложены также весьма существенные данные, характеризующие взаимодействия между нейромедиаторными системами и «гормонами стресса» — в первую очередь глюкокортикоидами, вызывающими в ЦНС, наряду с другими эффектами, и изменения активности ряда нейромедиаторных систем. Приведены и собственные данные автора о влиянии селективно связывающегося с цитоплазматическими рецепторами синтетического глюкокортикоида дексаметазона на активность АХЭ. Автор приходит к выводу, что взаимодействие «гормонов стресса» с нейромедиаторными системами — адаптивная реакция, способствующая улучшению ответа этих систем на влияние факторов среды.

На основе обобщающего анализа результатов исследований нейромедиаторных механизмов адаптации сделан вывод, имеющий и несомненное практическое значение. Этому вопросу посвящен раздел VII «Коррекция функции нейромедиаторных систем как способ воздействия на адаптивные способности организма».

Книга заканчивается очень сжатым, но емким по содержанию «Заключением», обобщающим изложенный автором материал и его соображения.

Полагаю, что рецензируемая книга является ценным вкладом в нашу еще очень небогатую литературу по функциональной нейрехимии адаптационных процессов, и она найдет благодарного читателя.

В книге имеется список цитированных автором отечественных и иностранных литературных источников, включающий почти 600 публикаций, причем в основном самых последних лет, вплоть до 2-й половины 80-х годов.

ДЕМИН Н. Н.

Х Р О Н И К А

НАШИ ЮБИЛЯРЫ

В 1989 году исполнилось 60 лет со дня рождения и 35 лет научно-организационной деятельности членов редколлегии нашего журнала Оганесяна Ваага Согомоновича, заведующего лабораторией регуляции ферментов Института биохимии АН Апп СССР и Тяхеппыда Лембита Яанобича-заведующего кафедрой биохимии Тартусского госуниверситета, доктора биологического наук, профессора, заслуженного деятеля науки ЭССР. Редколлегия сердечно поздравляет юбиляров со знаменательной датой и желает им крепкого здоровья и новых творческих успехов.

РЕДКОЛЛЕГИЯ

ПАМЯТИ ЕФИМА СЕМЕНОВИЧА ЛОНДОНА

В 1989 году исполнилось 120 лет со дня рождения и 50 лет со дня смерти талантливого ученого, одного из основоположников отечественной нейробиологии и радиобиологии Ефима Семеновича Лондона.

Е.С. Лондон родился 9 января 1869 года; высшее образование получил на медицинском факультете Варшавского университета, после окончания которого работал в Институте экспериментальной медицины в Петербурге. В стенах этого научного учреждения с первых дней в полной мере проявился научный и организаторский талант Ефима Семеновича, его новаторский подход ко многим проблемам.

Одним из первых в мире Е.С.Лондон занялся изучением действия радиоактивных веществ и рентгеновского облучения на животных. Им был опубликован целый ряд экспериментальных, теоретических и популярных статей по различным аспектам радиобиологии и среди них первая в мировой литературе монография, подытожившая начальный этап развития радиобиологии — «Das Radium in der Biologie und Medizin» (Лейпциг, 1911). На основании собственных экспериментальных наблюдений им был разработан метод автордиографии, до настоящего времени широко применяющийся в самых разных областях биологии и медицины.

Неоценим вклад, внесенный Е.С.Лондоном в теоретические и методические основы исследования метаболизма различных органов животного. Разработанный им метод ангиостомии, оригинальность и значение которого признаны во всем мире, позволил получать для анализов кровь, оттекающую от таких органов, как печень, почки, легкие, селезенка, поджелудочная железа и др.

Особо необходимо отметить модификацию метода ангиостомии — синусостомию, которая дала возможность Е.С.Лондону и его сотрудникам исследовать в хронических экспериментах обменные процессы в головном мозгу. Уже в первых работах по углеводному и газовому обмену ими было убедительно показано, что мозг потребляет значительно больше глюкозы,

кислорода и выделение углекислого газа меняется в зависимости от функционального состояния животного и при патологии. Высокая интенсивность энергетического метаболизма мозга, тесная связь его с функциональным состоянием ЦНС, впервые обнаруженная Е.С.Лондоном, в дальнейшем подтверждена многочисленными экспериментальными исследованиями в других лабораториях.

Приоритетные данные Е.С.Лондона по углеводному и энергетическому метаболизму головного мозга в норме и при различных состояниях, включая патологические, легли в основу функциональной нейрохимии. Они не потеряли своей научной значимости и в наши дни.

Наряду с интенсивными научными исследованиями Е.С.Лондон много сил отдавал подготовке специалистов—биохимиков и нейрохимиков. Он принимал самое активное участие в организации первой в СССР кафедры биохимии на биологическом факультете Ленинградского университета. Научные традиции Ефима Семеновича Лондона, углубленные исследования различных аспектов функциональной нейрохимии развиваются в настоящее время в ряде лабораторий, где работал этот замечательный ученый — в ЛГУ, в Институте экспериментальной медицины и др.

ЕЩЕНКО Н.Д.
ПРОХОРОВА М.И.

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.

СОДЕРЖАНИЕ

<i>Жарикова А.Д., Жариков С.И., Будацева А.Ю., Чернышова Л.И.</i> Транспорт [³ H] ГАМК через мембраны синапсом, модифицированные синтетическим антиоксидантом фенотаном-К	321
<i>Ашмарин И.П., Данилова Р.А., Мельник Е.И., Обухова М.Ф., Сагимаева Ш.К., Циренина М.Л., Ганжа С.Ю., Колтаева Н.А.</i> Иммунологическое вмешательство в нейрхимические и нейрофизиологические процессы: катехоламины, поведение и судорожная готовность белых крыс, иммунизированных конъюгатом альбумина с сиднофеном	328
<i>Корешонков О.Н., Корольков А.В., Никитин А.О., Маргулис М.Н., Дамбинова С.А.</i> Сравнительный анализ пептидных фракций крови больных паркинсонизмом до и после лечебных воздействий	336
<i>Москвичкин Г.Н., Кичикулова Т.П., Манухин Б.Н.</i> Влияние фосфолипазы А ₂ и яда среднеазиатской кобры на М-холинорецепторы синапсом мозга крысы	346
<i>Чоговадзе И.С., Микеладзе Д.Г.</i> Некоторые нейрхимические корреляты участия гиппокампа мозга крыс в условнорефлекторной деятельности	352
<i>Бондаренко Т.И., Кричевская А.А., Чернозубова Е.А.</i> Влияние пептида дельта-сна на содержание полиаминов в мозгу и печени крыс в норме и при действии холодового стресса	358
<i>Паронян З.Х., Срапионян Р.М., Абрамян С.С., Григорян Л.А., Галоян А.А.</i> Характеристика кардиоактивных соединений мозгового слоя надпочечников быка	365
<i>Манукян И.П., Агаджанян А.Х., Арутюнян А.В.</i> Изолирование ферментов биосинтеза пролина мозга крыс и их регуляторных свойства	371
<i>Хаатова Е.М., Семенова Т.С., Якобсон Л.И.</i> Свойства митохондриальной креатинкиназы мозга при изменении взаимодействия с митохондриальными мембранами	379

Краткие сообщения

<i>Заалишвили Т.М., Сабелашвили Д.Ш.</i> (ADP-рибоза) полимеразы головного мозга крыс: выделение и свойства	385
<i>Саульская Н.Б., Якимовский А.Ф., Карпова И.В.</i> Влияние микроинъекций фенамина в прилежащее ядро и бикуккуллина в черную субстанцию на синаптический выброс дофамина в стратуме крыс	390
<i>Соляков Л.С., Петрова Л.Н., Калашиников В.В., Ткаченко С.Е., Бачурин С.О.</i> Влияние нейрорактивных производных 4-фенилпиридина и 4,4'-дипиридила на обратный захват дофамина в синапсомах мозга мышей	395
<i>Пераухин Г.Я., Маслово А.А., Соколова В.Б., Фетисов В.И., Мартынов И.В.</i> Влияние бициклических эфиров кислот фосфора и пикротоксина на связывание ГАМК	400
<i>Шифман М.И., Шуляк Л.И., Бабичук Г.А.</i> Захват нейромедиаторов в трансплантированной эмбриональной нервной ткани	405
<i>Веретенников Н.А., Леонтович Т.А.</i> Особенности фракционного состава полипептидов трех групп нейронов мозга крысы	408
<i>Громов А.И., Громова Н.В., Судакова С.К.</i> Изменение содержания гастриноподобного пептида в мозгу кроликов при пищевом поведении, вызванном стимуляцией латерального гипоталамуса	412

Методы исследования

<i>Горбунов Н.В.</i> Применение методов ЭПР-спинового зондирования для изучения терминированных переходов в липидном матриксе мембран синапсом	416
<i>Дмитриев М.Т., Малышева А.Г., Расгянников Е.Г.</i> О диагностических возможностях хромато-масс-спектрометрии в психиатрии	425

Обзоры

<i>Аорова Н.Ф.</i> Структура и функции ганглиозидов	433
<i>Пошивалов В.Л., Сухотина И.А.</i> Этологическая фармакология и нейрхимия бензодиазепинов и β-карболинов	452

Рецензии

<i>Раевский К.С.</i> Возбуждающие аминокислоты в норме и патологии (под ред. Д.Лоджа)	465
<i>Демин Н.Н., Хайдарлиу С.Х.</i> Нейромедиаторные механизмы адаптации	468

Хроника

<i>Памяти Ефима Семеновича Лондона</i>	470.
--	------

CONTENTS

<i>Zharikova A.D., Zharikov S.I., Budantsev Yu. A., Chernyavskaya L.A.</i> Transport of [^3H] γ -aminobutyric acid through synaptosomal membranes modified by synthetic antioxidant — phenozane-K	321
<i>Ashmarin I.P., Danilova R.A., Melnik E. I., Obukhova M.F., Saghimbaeva Sh. K., Zirenina M.L., Ganzha S.Yu., Koltovaya N.A.</i> Immunological interference in neurochemical and neurophysiological processes: catecholamines, behaviour and seizure activity of white rats immunized by a conjugate of serum albumin and sydnofen	328
<i>Koresheonkov O. N., Korolkov A.V., Nikitin A.O., Margulis M.N., Dambinova S.A.</i> Comparative studies of patients with parkinsons disease before and after medial treatment	336
<i>Moskovkin G.N., Kichikulova T.P., Manukhin B.N.</i> Effect of phospholipase A_2 and central asia cobra venom on m-cholinoreceptors of rat brain synaptosomes	346
<i>Chogovadze I.S., Mikeladze D.G.</i> Some neurochemical correlates of conditioned reflex reaction activity in rat brain hippocampus	352
<i>Bondarenko T.I., Krichevskaya A.A., Chernogubova E.A.</i> Influence of delta-sleep inducing peptide on the polyamine level of rat brain and liver in the norm and under cold stress	358
<i>Paronyan Z.Kh., Srapiomyan R.M., Abramyan S.S., Grigoryan L.A., Galoyan A.A.</i> Characteristics of cardioactive compounds from bovine adrenal medulla	365
<i>Manukyan I.P., Agadzanyan A.Ch., Haroutjunian A.V.</i> The izolation of prolin biosynthesis enzymes from rat brain and their regulator properties	371
<i>Khvatova E.M., Semenova T.S., Yakobson L.I.</i> The brain mitochondrial creatine kinaze	379

Short communications

<i>Zaashivili T.M., Sabelashvili D.Sh.</i> Poly (ADP)ribose polymerase of rat brain: isolation and properties	385
<i>Saulskaya N.B., Yakimovsky A.F., Karpova I.V.</i> The effect of amphetamine injections in nucleus accumbens and bicuculine injections in substantia nigra on release of striatal synaptic dopamine	390
<i>Soljakov L.S., Petrova L.N., Kalashnikov V.V., Tkachenko S.E., Bachurin S.O.</i> Effect of neuroactive derivatives of 4-phenylpyridine and 4,4-bipyridine upon dopamine uptake by mice synaptosomes	395
<i>Pervukhin G.Ya., Maslov A.A., Socolov V.B., Felisov V.I., Martynov I.V.</i> The interaction of binding sites for bicyclic phosphorus esters, picrotoxin and [^3H] γ aminobutyric acid in the GABA-A receptor complex	400
<i>Shifman M.I., Shulak L.I., Babichuk G.A.</i> The uptake of neurotransmitters in transplanted nerve tissue	405
<i>Veretennikov N.A., Leontovich T.A.</i> Some peculiarities of composition of three different groups neurons of rat brain	408
<i>Gromov A.I., Gromova N.V., Sudakov S.K.</i> Variation in the level of gastrin-like peptide level in rabbit brain during feeding behaviour induced by stimulation of lateral hypothalamus	412

Methods

<i>Gorbunov N.V.</i> Application of EPR spin probing technique in studies of thermoinduced transition in lipid matrix of synaptic membranes	416
<i>Dmitriev M.T., Malysheva A.G., Rastyannikov E.G.</i> Diagnostic potential of chromato-mass-spectrometry in psychiatry	425

Reviews

<i>Avrova N.F.</i> Ganglioside structure and functions	433
<i>Poshivalov V.P., Suchotina I.A.</i> Ethological pharmacology and neurochemistry of benzodiazepines and β -carbolines	452

Comments

<i>Rayevsky K.C.</i> Excitatory amino acids in mealth and disease (ed. D. Lodge)	465
<i>Doemin N.N. Haidarliu S.H.</i> Neurotransmitter mechanisms of adaptation	468

Chronicles

<i>The memory of E.S.London</i>	470
---------------------------------	-----