

INSTITUTIONAL INVESTMENT

ISSN 0203-493X

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

НЕЙРОХИМИЯ ՀԱՅՐԱՔԻՄԻԱ

ТОМ 9, ВЫП. 1
ЯНВАРЬ—МАРТ

Журнал основан в 1982 году
Выходит 4 раза в год



ИЗДАТЕЛЬСТВО АН АРМЯНСКОЙ ССР
ЕРЕВАН 1990

Ст. редактор Э. А. Хачатурова

Лит. сотрудник Г. Р. Григорян

Сдано в набор 12.03.89 г. Подписано в печать 26.06.90 г. ВФ 04077.

Формат $70 \times 108^{1/16}$. Бумага № 1. Печать высокая.

Печ. л. 9,75, усл. печ. л. 13,65, учет. изд. л. 10,38. Тираж 715 экз.

Заказ № 95. Издат. 7774. Цена 1 р. 65 к.

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

Редакционная коллегия

А. А. ГАЛОЯН—главный редактор

А. ЛАЙТА (США)—соредактор

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

Редакционный совет

Н. Г. АЛЕКСИДЗЕ, О. Г. БАКЛАВАДЖЯН, А. Ю. БУДАНЦЕВ,
В. А. БЕРЕЗНИ, М. Е. ВАРТАНЯН, Г. П. ГЕОРГИЕВ,
М. А. ДАВТЯН, С. А. ДАМБИНОВА, Н. И. ДЕМИН,
Н. Д. ЕЩЕНКО, П. Г. КОСТЮК, Б. Н. МАПУХИН,
Д. Г. МИКЕЛАДЗЕ, Ю. А. ПАНКОВ, А. Т. ПИКУЛЕВ,
Н. К. ПОПОВА, В. И. РОЗЕНГАРТ, В. П. СКУЛАЧЕВ,
И. П. ТАРАНОВА, С. Х. ХАЙДАРЛИНУ, Е. М. ХВАТОВА, Р. Н. ЭТННГОВ

К СВЕДЕНИЮ ЧИТАТЕЛЕЙ!

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

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

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

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

РЕДКОЛЛЕГИЯ



УДК 541.12.035:546.41:612.82(599.32.3.4):004.13(535.37—615.477.85)

КОМПЛЕКСНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ
СВОБОДНОГО КАЛЬЦИЯ С ПОМОЩЬЮ Са-ЧУВСТВИТЕЛЬНОГО
ФЛЮОРЕСЦЕНТНОГО ЗОНДА КВИН-2 В СИНАПТОСОМАХ
МОЗГА КРЫС ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ

АНТОНИКОВ И. М., ГЛЕБОВ Р. И.

НИИ общей патологии и патологической физиологии АМН СССР, Москва

С помощью Са-чувствительного флуоресцентного зонда квиин-2 для суспензии синапсом из коры головного мозга крыс оценивали следующие параметры: концентрацию Ca^{2+} в исходном растворе Кребса-Рингера ($[\text{Ca}^{2+}]_0$), концентрацию внутриклеточного Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) при $[\text{Ca}^{2+}]_0$ равной 1 мМ или 10^{-5} М, а также долю суспензии синапсом, устойчивых к проникновению наружного Ca^{2+} . Показана динамика изменения этих параметров на протяжении 3 ч при 30°, зарегистрировано как увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ при воздействиях *in vitro* (K^+ -деполяризация) и воздействиях *in vivo* (создание у животных повышенной судорожной готовности с помощью коразолового кидаллинга), так и уменьшение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ при понижении содержания Ca^{2+} в среде инкубации. Делается вывод о возможности расширения информативности использования зонда квиин-2.

В настоящее время общепризнана важная роль ионов кальция в регуляции самых различных внутриклеточных процессов, в том числе и их участие в секреции нейротрансмиттеров нервными окончаниями. Регуляция $[\text{Ca}^{2+}]_i$ является сложным процессом, вовлекающим различные механизмы его поступления в клетку и удаления из цитоплазмы. Изменение уровня свободного Ca^{2+} в синаптоплазме может лежать в основе различных патологических состояний. В частности, при изучении молекулярных механизмов эпилептогенеза этому вопросу уделяется большое внимание. В данной работе при использовании Са-чувствительного флуоресцентного зонда квиин-2 при различных условиях инкубации суспензии синапсом (СС) и разработанных нами методических приемах определяли $[\text{Ca}^{2+}]_i$ при калиевой деполяризации и при создании у крыс повышенной судорожной готовности.

Материалы и методы

Синапсомы выделяли из коры головного мозга крыс линии *Wistar* (масса 250 г) по методу Hajos [1]. Свежeweделенные СС суспендировали до конечной концентрации 2—3 мг белка/мл в раст-

воре Кребса-Рингера (NaCl —132 мМ, KCl —5 мМ, NaH_2PO_4 —5 мМ, MgSO_4 —1,3 мМ, глюкоза—10 мМ, HEPES -триг—20 мМ, пируват натрия—0,1 мМ, pH 7,4 при 30°) с добавлением Ca -ЭГТА буфера (0,2 мМ CaCl_2 и 0,3 мМ ЭГТА) и использовали для нагрузки Ca -чувствительным флуоресцентным зондом квин-2. С этой целью к суспензии СС добавляли раствор квин-2/АМ в диметилсульфоксиде до конечной концентрации зонда 50 мкМ и инкубировали при 30° в течение 30 мин. Затем суспензию разбавляли раствором Кребса-Рингера в 25 раз и инкубировали еще 30 мин при той же температуре. Полученную суспензию СС использовали для определения $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Измерения флуоресценции квин-2 проводили с помощью спектрофлуориметра MPF-4 (Hitachi, Япония, $\lambda_{\text{возб.}}$ = 340 нм, $\lambda_{\text{фл.}}$ = 495 нм) при температуре 30° в цилиндрических кварцевых кюветах объемом 0,5 мл с периодическим перемешиванием. Значение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ определяли исходя из формул, приведенных в работе Tsien и соавт. [2]:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = \frac{K_d(F^2 - F_{\text{min}})}{F_{\text{max}} - F} \quad (1)$$

$$F_{\text{min}} = F_{\text{Mn}} + 1/6 (F_{\text{max}} - F_{\text{Mn}}) \quad (2)$$

где K_d —константа диссоциации комплекса Ca -квин-2 (в соответствии с [3], равная 130 нМ), F_{max} —интенсивность флуоресценции зонда при его максимальном насыщении ионами кальция; F_{free} — Ca -независимая флуоресценция квин-2; F_{Mn} —интенсивность флуоресценции зонда после добавления в качестве тушителя флуоресценции MnCl_2 (0,5 мМ); F —интенсивность флуоресценции зонда, соответствующая измеряемой $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Для разрушения СС использовали дигитонин (90 мкМ).

В ряде случаев СС, нагруженные зондом, удаляли с помощью центрифугирования (10000 g, 3 мин), а супернатант использовали для измерения флуоресценции. Состояние повышенной судорожной готовности создавали у крыс посредством коразолового киндинга [4]. Ежедневно животным вводился коразол в подпороговой дозе (30 мг/кг, внутривенно), а контрольным животным вводили соответствующие объемы 0,14 М NaCl . Выделение СС в этом случае проводили на 5—6 неделе. Поскольку имелся большой разброс экспериментальных данных, достоверность изменения параметров оценивали с помощью метода парных сравнений. В работе использовали квин-2/АМ («Sigma», США), диметилсульфоксид («Serva», ФРГ), другие реактивы квалификации ос. ч. и х. ч.

Результаты и обсуждение

Сложность использования квин-2 для определения внутринапосомной концентрации Ca^{2+} неоднократно подчеркивалась ранее [5, 6]. Перечислим эти трудности: а) наличие постоянного потока зонда наружу из СС; б) быстрая утеря СС их нативности при хранении; в) небольшая аккумулярирующая способность СС в отношении зонда. В связи с этим мы модифицировали методику нагрузки и определения $[\text{Ca}^{2+}]_i$: нагрузка и измерения проводились при 30°; СС не отмывались от наружного зонда, а в каждой серии экспериментов определялся его вклад в общую флуоресценцию. Таким образом, более точно определялась флуоресценция квин-2, находящегося внутри СС, а кроме того, и концентрация Ca^{2+} снаружи.

Также необходимо отметить, что использование однократно разбавленной (в начале эксперимента) суспензии СС и введение в раствор Кребса-Рингера Са-ЭГТА буфера уменьшало разброс экспериментальных данных. В данной работе оценивали следующие параметры суспензии СС: 1) $[Ca^{2+}]_0$ — концентрация Ca^{2+} в исходном растворе Кребса-Рингера, 2) $[Ca^{2+}]_{i0}$ — внутрисинаптическая концентрация Ca^{2+} при инкубации СС в исходном растворе Кребса-Рингера, 3) $[Ca^{2+}]_{i1}$ — внутрисинаптическая концентрация Ca^{2+} при концентрации кальция в растворе Кребса-Рингера 1 мМ, 4) доля синапсом «устойчивых к проникновению наружного Ca^{2+} » — (А). Для определения указанных параметров измерения проводились сериями из 4 проб (рис. 1), а для расчетов использовали следующие формулы:

$$[Ca^{2+}]_0 = \frac{Kd[M_2 - (C_1 + M_2 - D_3 - D_4) \cdot 1/6]}{C_1 - (D_3 - D_4)} \quad (3)$$

$$[Ca^{2+}]_{i1} = \frac{Kd[D_3 - (D_3 + D_1) \cdot 1/6]}{D_1} \quad (4)$$

$$[Ca^{2+}]_{i0} = \frac{Kd[D_2 - (D_3 - D_1) \cdot 1/6]}{D_1 + (D_3 - D_2)} \quad (5)$$

$$A = \frac{(D_1 + D_3) \cdot 5/6}{B_1 - B_3 + D_1} \cdot 100\% \quad (6)$$

Все параметры, используемые в формулах 3—6, показаны на рис. 1, а вывод формул пояснен в тексте.

Определение $[Ca^{2+}]_0$ (формула 3) основано на присутствии зонда снаружи СС. Для оценки его вклада в суммарную интенсивность флуоресценции сравнивали изменения интенсивности флуоресценции зонда в суспензии СС и в супернатанте, полученном после осаждения СС, в ответ на добавление $CaCl_2$ (1 мМ) или $MnCl_2$ (0,5 мМ).

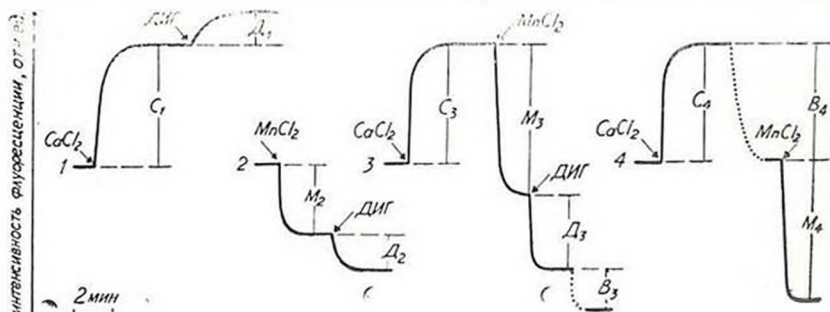


Рис. 1. Типичные кривые серии из 4 проб. Стрелками отмечены моменты добавления веществ: дигитонин (диг, 90 мкМ), $MnCl_2$ (0,5 мМ), $CaCl_2$ (1 мМ). Точками указано центрифугирование (10000 g, 3 мин)

то есть параметры C_1 и M_2 (рис. 1). Оказалось, что центрифугирование уменьшало величину C_1 и не влияло на величину M_2 . Однако необходимо учитывать, что при добавлении к СС раствора $CaCl_2$ про-

исходит не только насыщение зонда, находящегося вне СС, но и частичное вхождение Ca^{2+} в СС. Величина изменения флуоресценции, обусловленная последним фактором, равна $D_3 - D_2$. Принимая это во внимание, мы получили практически полное соответствие между амплитудами изменения флуоресценции квинна-2 при добавлении CaCl_2 в случае наличия и отсутствия СС. Исходя из полученных данных можно сделать вывод, что на основании серии из 4 проб для наружного зонда можно оценить величину, отражающую его флуоресценцию при насыщенном значении $[\text{Ca}^{2+}]$, она равна $[C_1 + M_2 - D_3 + D_2] \cdot 5/6$ и величину, соответствующую величине F_{∞} (формула 1), которая равна $[M_2 - (C_1 + M_2 - D_3 + D_2)] \cdot 1/6$. Правильность изложенных расчетов подтверждается соответствием рассчитанной величины вклада наружного зонда в суммарную флуоресценцию и величины M_3 (тушение λ^2 флуоресценции зонда в суспензии нативных СС). Формулы 4 и 5 легко получить из формул 1 и 2, учитывая, что флуоресценция квинна-2, обусловленная внутрисинантосомным зондом, есть сумма величин D_1 и D_3 (рис. 1), а величина $F - F_{\infty}$ (формула 1) соответственно равна D_3 , когда снаружи 1 мМ CaCl_2 , и D_2 , когда измерения ведутся в первоначальном растворе Кребса-Рингера.

На выводе формулы 6 остановимся более подробно. Параметр «А» представляет собой долю синантосом, «устойчивых к проникновению наружного Ca^{2+} », то есть СС реагирующих в присутствии CaCl_2 или MnCl_2 изменением флуоресценции внутрисинантосомного зонда на разрушение плазмалеммы синантосом. Исходя из этого, количество нативных СС будет пропорционально максимальной интенсивности Са-чувствительной флуоресценции квинна-2, находящегося в СС. Значение данного параметра будет равно $(D_1 + D_3) 5/6$. Количество «проницаемых для Ca^{2+} » синантосом (в той же системе единиц) можно вычислить, используя параметры кривых 3 и 4 (рис. 1). Параметр B_4 состоит из нескольких компонент: а) интенсивности флуоресценции зонда, находящегося в нативных СС (необходимо помнить, что он не максимально насыщен Ca^{2+}), величина данного компонента равна $D_3 - (D_1 + D_3) \cdot 1/6$; б) интенсивности свторассеяния, обусловленного СС; в) интенсивности флуоресценции зонда, находящегося в «проницаемых для Ca^{2+} » СС (его насыщение в данном случае максимально). Изменение регистрируемого сигнала после центрифугирования СС в условиях тушения λ^2 наружного квинна-2 и зонда внутри СС, то есть B_3 будет отражать только вклад свторассеяния СС. Итак, учитывая все вышесказанное, можно найти количество СС, «проницаемых для Ca^{2+} », причем выраженное в тех же единицах измерения, что и количество нативных СС и, таким образом, найти долю нативных СС (формула 6). Однако необходимо, вводить уточнение в измеряемую величину B_4 при проведении нескольких серий экспериментов, отстоящих друг от друга во времени. В этом случае разрушение СС в промежутки между измерениями будет приводить к выходу зонда из СС и, следовательно, к возрастанию величины M_3 . Учитывая это, необходимо разницу величин M_3 начального и последующего измерений суммировать с B_4 более позднего измерения.

Оперируя указанными параметрами, необходимо помнить, что есть ограничение для их использования. Все расчеты проводятся в предположении, что за время измерения серии из 4 проб (не более 30 мин) никаких существенных изменений с СС не происходит. В случае нативных СС это требование, по-видимому, выполняется (см. да-

лее), однако возможны ситуации, когда изменение СС за этот промежуток времени сильно исказит результаты.

Измерение $[Ca^{2+}]_i$ показало, что величина данного параметра сильно варьировала от выделения к выделению (но не в пределах одного эксперимента). Среднее значение $[Ca^{2+}]_i$ составляло 140 нМ. Одним из возможных объяснений сильного разброса экспериментальных данных является изменение величины $[Ca^{2+}]_i$ при различных концентрациях зонда внутри СС. Относительно этой зависимости имеются противоречивые данные в литературе. Так, известно, что при увеличении концентрации зонда в СС от 0,4 до 4 мМ $[Ca^{2+}]_i$, измеряемая с его помощью, не изменялась [3]. В то же время Verhage и соавт. [8] наблюдали увеличение $[Ca^{2+}]_i$ от 100 до 350 нМ при увеличении концентрации зонда от 0,8 до 6,0 мМ. В наших экспериментах точных измерений концентрации зонда в СС не проводилось, а по оценочным расчетам это значение должно быть около 1 мМ. По-видимому, при работе с квин-2 данный параметр также необходимо контролировать. Интересно отметить, что тот уровень $[Ca^{2+}]_i$, который обычно определяют в СС (около 10^{-7} М), не является минимально возможным. Так, снижение $[Ca^{2+}]_0$ до 90 нМ (содержание Ca^{2+} в исходном растворе Кребса-Рингера с Са-ЭГТА буфером) приводило к уменьшению $[Ca^{2+}]_i$ до 30–40 нМ, но всегда $[Ca^{2+}]_i$ было меньше $[Ca^{2+}]_0$. Это согласуется с данными Di Virgilio и соавт. [9].

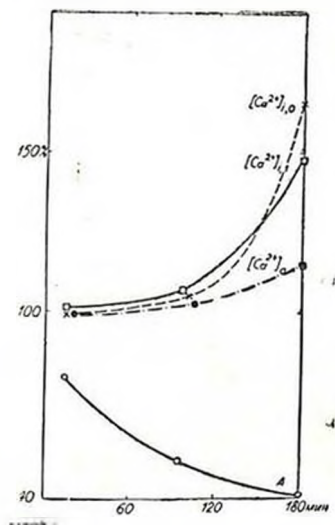


Рис. 2. Динамика изменения изучаемых параметров со временем (в процентах к первоначальному уровню для $[Ca^{2+}]_{i,1}$, $[Ca^{2+}]_{i,0}$ и $[Ca^{2+}]_0$)

Динамика изменения определяемых параметров в зависимости от времени инкубации при 30° после нагрузки СС зондом представлена на рис. 2. В течение 3 ч достоверно ($p < 0,01$) меняются 3 параметра, причем наибольшие изменения происходят через 2 ч после окончания нагрузки СС зондом. Характер этих изменений взаимно согласуется. Необходимо отметить, что происходит не только увеличение доли разрушенных СС, но и изменение пассивных СС (увеличение $[Ca^{2+}]_{i,0}$ и $[Ca^{2+}]_{i,1}$). Соотношение характера изменений

параметров «А» и $[Ca^{2+}]$ позволяет предположить, что разрушение СС идет постоянно (уменьшение «А»), однако оставшиеся СС какое-то время (около 2 ч) способны поддерживать постоянной $[Ca^{2+}]$, которая затем все же начинает увеличиваться. В связи с этим можно сделать вывод о том, что предпочтительней работать с СС не более 2 ч после нагрузки их квинном-2, однако необходимо учитывать, что и в этот период времени значительно снижается количество нативных СС.

K^+ -деполяризация СС (замена в исходном растворе Кребса-Рингера 40 mM NaCl на KCl в присутствии 1 mM $CaCl_2$) приводит к увеличению $[Ca^{2+}]$, в 2—4 раза. Это хорошо согласуется с аналогичными данными ряда авторов [5, 10, 11]. Замена же NaCl на холинхлорид (в той же концентрации) приводило к увеличению $[Ca^{2+}]$, не более чем на 50%. В нашем варианте K^+ -деполяризации происходит уменьшение трансмембранного потенциала (ТМП) СС и уменьшение наружной концентрации Na^+ . Снижение ТМП может приводить к увеличению транспорта Ca^{2+} внутрь СС двумя путями [12]: во-первых, вследствие открытия потенциалзависимых Са-каналов и, во-вторых, за счет изменения Na^+/Ca^{2+} -обмена. Однако учитывая быструю инактивацию Са-каналов [13] и относительно медленные изменения $[Ca^{2+}]$, регистрируемые с помощью зонда, следует предположить, что в нашем случае увеличение $[Ca^{2+}]$ связано с Na^+/Ca^{2+} -обменом. К аналогичному выводу приходят и другие авторы [14, 15]. Небольшое увеличение $[Ca^{2+}]$, при замене NaCl на холинхлорид (при отсутствии деполяризующего воздействия), по-видимому, указывает на незначительную роль уменьшения Na^+ в наружной среде при наблюдаемом изменении Na^+/Ca^{2+} -обмена. Это согласуется с данными Конева и соавт. [15], которые показали, что при замене NaCl на холинхлорид в нашем диапазоне концентраций относительные скорости входа и выхода Ca^{2+} при 37° изменяются незначительно. Таким образом, увеличение $[Ca^{2+}]$ при K^+ -деполяризации связано в основном с изменением Na^+/Ca^{2+} -обмена, обусловленном уменьшением ТМП СС.

При изучении животных с повышенной судорожной готовностью все параметры оценивали у контрольных и подопытных животных в один и тот же день параллельно. У контрольных животных $[Ca^{2+}]$ составляла в среднем 152 нМ, однако имелся значительный разброс данных (от 53 до 220 нМ). Несмотря на это, попарное сравнение результатов контрольных и подопытных животных выявило увеличение данного параметра ($p < 0,01$) в среднем на 60% (эта величина оставалась неизменной у двух групп животных, у которых повышенная судорожная готовность создавалась с интервалом в 1 месяц). В то же время $[Ca^{2+}]$ была равной 30 нМ и достоверных отличий между контролем и опытом выявлено не было. Не выявлялись отличия и в изменении параметра «А». Таким образом, различия между контролем и опытом не абсолютны, и для более четкого их выявления, по-видимому, важны условия эксперимента и понимание причин, обуславливающих регистрируемое увеличение $[Ca^{2+}]$.

Итак, полученные данные свидетельствуют о возможности с помощью флуоресцентного зонда квин-2 определять несколько параметров, характеризующих физико-химическое состояние исследуемой системы СС. Исходя из этого, оказалось возможным оценить приемлемую продолжительность работы со свежесделанными СС и проследить за процессом их разрушения. Было зарегистрировано как уве-

личение $[Ca^{2+}]_i$ при воздействиях *in vitro* (K^+ -деполяризация) и воздействиях *in vivo* (создание у крыс повышенной судорожной готовности), так и снижение $[Ca^{2+}]_i$ (при уменьшении содержания Ca^{2+} в среде инкубации). Таким образом, информативность использования зонда квин-2 как для изучения СС, так и для других объектов может быть расширена.

DETERMINATION OF FREE CALCIUM CONCENTRATION IN RAT BRAIN SYNAPTOSOMES USING Ca-SENSITIVE FLUORESCENT PROBE QUIN-2 UNDER DIFFERENT CONDITIONS

ANTONIKOV I. M., GLEBOV R. N.

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

The Ca-sensitive fluorescent probe Quin-2 was used to characterize calcium metabolism in a suspension of synaptosomes from rat brain. We have determined: the concentration of Ca^{2+} in the incubation solution ($[Ca^{2+}]_o$), the content of cytosolic Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) at different $[Ca^{2+}]_o$ concentration (10^{-2} — $10^{-3}M$) and the fraction of synaptosomes non-permeable to calcium. Variations in these parameters were studied for 3 h at $30^\circ C$. An increase in $[Ca^{2+}]_i$ was observed both *in vitro* (K^+ -depolarization) and *in vivo* (seizures induced by pentylene tetrazole), while a decrease in $[Ca^{2+}]_i$ occurred in response to lowering of Ca^{2+} in the incubation solution. We conclude that Quin-2 has a wider potential for its use in biological studies.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hajos F. Brain Res., № 93, № 2, p. 485—489, 1975.
2. Tsien R. Y., Pozzan T., Rink T. J. J. Cell. Biol., v. 94, № 2, p. 325—334, 1982.
3. Nachshen D. A. J. Physiol., v. 363, p. 87—101, 1985.
4. Тупеев Н. Р., Бордюков М. М., Крижановский Г. Н., Никушкин Е. В. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 104, № 8, с. 167—169, 1987.
5. Birgoyne R. D., Cumming R., Gelsow M. J. Biochem., Soc. Trans., № 12, № 5, p. 806—807, 1984.
6. Akerman K. E. O., Helenonen E., Kaila K., Scott I. G. Biochim. et biophys. acta, v. 858, p. 275—284, 1986.
7. Cobbold P., Rink T. J. Biochem. J., v. 248, p. 313—328, 1987.
8. Verhage M., Besselsen E., Lopes Da Silva F. H., Ghijzen W. E. J. M. J. Neurochem., v. 51, p. 1667—1674, 1988.
9. Di Virgilio F., Lew D. P., Pozzan T. Nature, v. 310, p. 691—693, 1984.
10. Meldolesi J., Hutter W. B., Tsien R. Y., Pozzan T. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 81, p. 620—624, 1984.
11. Ashley R. H., Brammer M. J., Marchbanks R. M. Biochem. Soc. Trans., v. 12, № 5, p. 869—870, 1984.
12. Hoesy M., Lardinsk M. J. Membr. Biol., v. 104, p. 81—105, 1988.
13. Blaustein M. P. Handbook of Exp. Pharmacol., v. 83, p. 275—304, 1988.
14. Nachshen D. A., Kongsamut S. Biochim. et biophys. acta. Biomembranes, v. 979, № 3, p. 305—310, 1989.
15. Копев С. В., Аксентьев С. А., Окунов Н. М., Мережинская Н. В., Ракочев А. А., Орлов С. Н., Покудин Н. Н., Кравцов Г. М., Ходорова Б. Н. Биохимия, т. 54, № 7, с. 1150—1162, 1989.

Поступила 18.X.1989



УДК 591.81+591.481.1+612.015.48

АВТОРАДНОГРАФИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СИНТЕЗА БЕЛКА В МОЗГУ КРЫС ПОД ВЛИЯНИЕМ ТЕТРАПЕПТИДА ТАФИНА И L-ДОФА

ХУДОЕРКОВ Р. М.

ИНИ мозга ВЦП психического здоровья АМН СССР, Москва

Авторадиографически изучали интенсивность включения DL-лейцина-2-[^3H] и белки функционально различных нейронов мозга крыс, получавших тетрапептид тафина L-Thr-L-Lys-L-Pro-L-Arg (300 мкг/кг) однократно (с длительностью воздействия 15 мин—модель повышенной эмоциональной активности со склонностью к агрессивности и повышению у животных способности находить выход из стрессовой ситуации), и крыс, получавших ежедневно в течение 3- и 4-х недель препарат Леводона (-)-3-(3,4-диоксифенил)-L-аланин (L-ДОФА) в дозе 100 мг/кг (модель эмоционального страха с нарушением условнооборонительных реакций). Исследовали нейроны слоев III, IV и V зрительной коры, нейроны слоев III и V сенсомоторной коры и нейроны хвостатого ядра. Обнаружили, что под влиянием тафина включение [^3H]лейцина в белки разных типов нейронов снижалось от 15 до 46%, за исключением ассоциативных нейронов слоя III сенсомоторной коры, у которых отклонение от контроля было не достоверно. Длительное введение животным больших доз L-ДОФА приводило к увеличению включения [^3H]лейцина. Через 3 недели включение метки в нейроны разных типов по сравнению с контролем повышалось от 19 до 79%, а через 4 недели—от 52 до 174%. Обсуждается вопрос о возможных путях действия испытуемых препаратов на обмен белков мозга.

Фармакологически направленное воздействие на животных, позволяющее воспроизводить психомоторное возбуждение, анксиогенные и аффективные состояния, широко используется для изучения механизмов биохимических процессов при моделировании нервно-психических расстройств [1, 2].

Тетрапептид тафин, наряду с присущими ему неспецифическими иммуностимулирующими свойствами [3], обнаруживает и регулирующее действие на поведение животных, то есть в зависимости от исходного эмоционального состояния он проявляет себя как стимулятор или транквилизатор [4]. В пределах 30 мин после введения он вызывает у интактных животных общее двигательное возбуждение, усиливает негативно-эмоциональные проявления и повышает у них способность находить выход из острой стрессовой ситуации [5, 3].

В отличие от тетрапептида тафина предшественник синтеза дофамина L-3,4-диоксифенилаланин (L-ДОФА)—препарат, применяемый при лечении паркинсонизма,—при однократном введении животным в дозе 100 мг/кг полностью блокирует у них видотипичную агрессию и повышает эксцентричные защитные реакции [2, 6], а при длительном его применении вызывает у животных сильный эмоцио-

пальный страх с нарушением условнооборонительного поведения [7].

Сопоставление сведений, имеющихся в литературе по вопросу о краткосрочном влиянии тафинна и длительном влиянии L-ДОФА на обмен веществ мозга, не позволяет провести столь четкого различия между действием этих препаратов, вследствие немногочисленных и порой противоречивых данных, как это наблюдается в физиологических исследованиях. На основании результатов биохимических [4, 5, 8, 9] и фармакоэтологических исследований [4, 10] можно сделать вывод, что тафинн активирует обмен катехоламинов, но при этом он, вероятно, не обладает дофаминстимулирующими свойствами.

Что касается длительного действия L-ДОФА на обмен веществ мозга, то на основании таких данных, как изменение чувствительности дофаминных рецепторов [11, 12] и дофаминзависимой аденилатциклазы [13], небольшого повышения активности тирозингидроксилазы [13], резкого увеличения активности MAO типа B наряду со снижением активности MAO типа A [14] и отсутствия изменений в содержании дофаминна и гомованилиновой кислоты [13] можно сделать вывод только общего характера—что экзогенно вводимая L-ДОФА изменяет обмен катехоламинов в целом и, в частности, дофаминна.

Принимая во внимание, что обмен катехоламинов тесно связан с обменом белков [15], мы поставили перед собой задачу изучить особенности краткосрочного влияния тафинна и длительного действия L-ДОФА на обмен веществ мозга посредством автордиографического изучения синтеза белка в разных типах нейронов мозга крыс.

Материалы и методы

Работа выполнена на крысах-самцах линии Wistar с массой тела 160 ± 10 г. На одной группе животных (5 особей) изучали кратковременное (15 мин) влияние тетрапептида тафинна L-Thr-L-Lys-L-Pro-L-Arg («Serva», ФРГ) в дозе 300 мкг/кг, а на другой группе животных (5 особей) изучали длительное (до 4-х недель) влияние препарата Леводопа (-)-3-(3,4-диоксифенил)-L-аланин (L-ДОФА) в дозе 100 мг/кг. Трем животным L-ДОФА давали ежедневно в течение 3-х недель, а двум—в течение 4-х недель с целью выяснения временной динамики его воздействия на синтез белка. Исследуемые препараты разводили на физиологическом растворе и вводили внутрибрюшинно. Контрольные крысы получали только инъекции физиологического раствора. Экспериментальных животных (контрольных и подопытных) подвергали воздействию радионуклидом в течение 2 ч 30 мин. Радиоактивное соединение D,L-лейцин-2[^3H] (У. А. 8,8 мКи/ммоль, ЛМО «Изотоп») вводили внутрибрюшинно из расчета 2 мКи/100 г. Причем 1 группе крыс изотоп давали за 2 ч 15 мин до введения тафинна, а II группе—сразу же после последнего введения L-ДОФА. Мозг животных фиксировали в жидкости Карнуа, заливали в парафиновые блоки (контроль и опыт вместе) и раскладывали на срезы толщиной 5 мкм. При изготовлении радиоавтографов мозга [15] использовали ядерную фотоэмульсию типа «М» (Московский завод технических фотопластиков). Плотность зерен серебра в радиоавтографах определяли с помощью темы телевизионного анализа изображения Т. А. С.-Лейтс. С этой целью на мониторе световым пером обводили по контуру тело нейрона и измеряли его площадь. На фоне полученного изображения, используя его как маску, измеряли площадь зерен серебра, выявляемых в фотоэмульсионном слое над нейроном. Отношение полученных величин рассматривали как

оценку плотности радиоактивной метки в нейроне или величину интенсивности включения $[^3\text{H}]$ лейцина в белки данного нейрона. В сенсомоторной и зрительной областях коры исследовали нейроны проекционно-эфферентного типа (крупные пирамидные нейроны V слоя), ассоциативного типа (пирамидные нейроны III слоя и нейроны хвостатого ядра) и афферентные—зернистые нейроны IV слоя в зрительной коре. В каждой структуре мозга было изучено от 150 до 470 нейронов у контрольных и столько же у подопытных крыс. Достоверность различий средних значений исследуемых параметров оценивали с помощью t-критерия.

Результаты исследования

Через 15 мин после введения крысам тафцина интенсивность включения $[^3\text{H}]$ лейцина в белки нейронов исследуемых образований мозга (сенсомоторная и зрительная области коры больших полушарий и подкорковая структура—хвостатое ядро) снижалась на 15—46% по сравнению с контролем (табл. 1). Наиболее интенсивно реа-

Таблица 1

Влияние однократного (15 мин) воздействия тетрапептида тафцина (100 мг/кг) на интенсивность включения $[^3\text{H}]$ лейцина в белки нейронов сенсомоторной, зрительной коры и хвостатого ядра мозга крыс

Группы животных	Интенсивность включения $[^3\text{H}]$ лейцина $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	Отклонение от контроля, %	Площадь нейрона, $\mu\text{м}^2$ $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	Отклонение от контроля, %
Контроль Опыт	Сенсомоторная кора, слой III 0.0102 ± 0.001 0.0097 ± 0.001	-5	172.00 ± 1.07 170.87 ± 1.12	-1
	Сенсомоторная кора, слой V 0.0158 ± 0.001 0.0086 ± 0.001		382.05 ± 4.61 377.35 ± 4.84	
Контроль Опыт	Хвостатое ядро 0.0147 ± 0.001 0.0086 ± 0.001	41***	126.65 ± 0.95 128.28 ± 0.89	+1
	Зрительная кора, слой III 0.0080 ± 0.001 0.0059 ± 0.001		144.39 ± 0.69 141.11 ± 0.65	
Контроль Опыт	Зрительная кора, слой IV 0.0117 ± 0.001 0.0093 ± 0.001	-15	89.99 ± 0.55 87.33 ± 0.59	-3
	Зрительная кора, слой V 0.0068 ± 0.001 0.0051 ± 0.001	-25**	252.51 ± 2.06 252.97 ± 2.57	0

Примечание. Здесь и в табл. 2 в каждой структуре мозга исследовано 150—470 нейронов у контрольных и столько же у подопытных крыс. Интенсивность включения $[^3\text{H}]$ лейцина в белки нейронов (величина, выражающая отношение площади, занимаемой зернами серебра над нейроном, к площади самого нейрона) представлена в усл. ед., * $p > 0.05$, ** $p > 0.01$, *** $p > 0.001$ по сравнению с контролем.

гировали крупные пирамидные нейроны V слоя сенсомоторной коры и нейроны хвостатого ядра—в них исследуемый показатель снижался на 41 и 46% соответственно. В то же время включение [^3H]лейцина в ассоциативные нейроны III слоя сенсомоторной коры оставалось практически на контрольном уровне. Реакция нейронов зрительной области коры по сравнению с сенсомоторной выглядела более однородной: и ассоциативные нейроны III слоя и проекционно-эфферентные нейроны V слоя включали метку почти одинаково—на 25—26% меньше, чем в контроле, а в афферентных нейронах IV слоя она была ниже контрольной величины на 15%.

В отличие от тафцина длительное введение больших доз L-ДОФА вызывало увеличение включения [^3H]лейцина в белки нейронов исследуемых образований мозга крыс (табл. 2). Через 3 недели

Таблица 2

Влияние длительного (3- и 4-недельного) воздействия L-ДОФА (100 мг/кг) на интенсивность включения [^3H]лейцина в белки нейронов сенсомоторной коры и хвостатого ядра мозга крыс

Группы животных	Интенсивность включения [^3H] лейцина $\bar{x} \pm Sx$	Отклонение от контроля, %	Площадь нейрона, $\mu\text{м}^2$ $\bar{x} \pm Sx$	Отклонение от контроля, %
Сенсомоторная кора, III слой				
Контроль	0.1202 $\pm$ 0.003		158.93 $\pm$ 1.21	
Опыт 3 недели	0.1430 $\pm$ 0.003	$\pm 19^*$	172.76 $\pm$ 1.28	± 9
Опыт 4 недели	0.1825 $\pm$ 0.008	$\pm 52^*$	185.24 $\pm$ 1.56	± 17
Сенсомоторная кора, V слой				
Контроль	0.1369 $\pm$ 0.004		320.55 $\pm$ 4.50	± 9
Опыт 3 недели	0.2272 $\pm$ 0.003	$\pm 66^{**}$	393.37 $\pm$ 4.01	± 3
Опыт 4 недели	0.3747 $\pm$ 0.01	$\pm 174^{***}$	361.87 $\pm$ 4.10	
Хвостатое ядро				
Контроль	0.0761 $\pm$ 0.003		114.38 $\pm$ 0.92	± 3
Опыт 3 недели	0.1367 $\pm$ 0.004	$\pm 79^{**}$	110.64 $\pm$ 1.07	± 3
Опыт 4 недели	0.1659 $\pm$ 0.009	$\pm 118^{**}$	115.37 $\pm$ 1.21	

включение метки возрастало на 19, 66 и 79% соответственно в нейронах слоев III и V сенсомоторной коры и нейронах хвостатого ядра, а через 4 недели после введения L-ДОФА включение [^3H]лейцина в указанных образованиях мозга увеличивалось по сравнению с контролем соответственно на 52, 174 и 118%. В этом эксперименте, так же как и при воздействии тафцином, ассоциативные нейроны III слоя сенсомоторной коры давали более слабую реакцию, чем проекционно-эфферентные нейроны V слоя этой же области коры.

Обсуждение результатов

Проведенная работа показала, что краткосрочное (15 мин) действие тетрапептида тафцина (модель повышенной эмоциональной активности, сопровождающейся усилением негативно-эмоциональных

проявлений и повышением у животных способности находить выход из стрессовой ситуации) характеризуется снижением включения [^3H] лейцина в белки нейронов, исследованных пяти образований мозга крысы. Причем это обнаруживается в разных типах нейронов (ассоциативных и проекционно-эфферентных) сенсомоторной, зрительной коры и нейронах подкорковых образований мозга—хвостатого ядра.

Как следует из данных литературы [17], под действием тафцина в нейронах сенсомоторной коры и нейронах хвостатого ядра изменяется содержание белка (интерферометрическое исследование) и меняются размеры клеток. Было обнаружено, что тафцин действует угнетающе на активность лейциламинопептидазы. Ее активность снижается на 30% во фракции клеточных митохондрий и на 50—80% во фракциях легких и тяжелых синантосом мозга кролика [18]. Влияние тафцина на синаптические мембраны прослеживается и при определении SH-группы во фракции тяжелых синантосом. До 30% повышается их содержание в низкомолекулярных тиолах и в замаскированных SH-группах белков [9]. Из литературы известно, что антипсихотические препараты (фенотиазинового и нефенотиазинового ряда) подавляют синтез белка, ДНК и особенно РНК [19—21]. Такое действие указанных препаратов объясняется тем, что они связывают специальные рецепторные места [20]. Исходя из того, что тафцину приписывают свойства антипсихотического препарата [3], можно предположить, что в основе снижения синтеза белка при действии тафцина также лежит связывание им специальных рецепторных мест.

Длительное введение крысам в больших дозах L-ДОФА (100 мг/кг), позволяющее создавать модель эмоционального страха с нарушением условнооборонительного поведения, приводит, как показала настоящая работа, к противоположному действию по сравнению с действием тафцина—к увеличению включения [^3H] лейцина во всех исследуемых типах нейронов сенсомоторной коры и нейронах хвостатого ядра. Причем интенсивность включения нарастала во времени—она была существенно выше через 4, чем через 3 недели.

Ряд данных свидетельствует о том, что длительное воздействие животных L-ДОФА может привести к изменению в обмене белков мозга. Так, небольшая доза L-ДОФА (25 мг/кг) при 2-недельном введении кроликам увеличивала активность лейциламинопептидазы во фракции нейронов и глии сенсомоторной коры на 150 и 130% соответственно, а в аналогичных фракциях хвостатого ядра—на 70 и 20% соответственно [22]. За этот же период в нейронах III слоя сенсомоторной коры, нейронах хвостатого ядра и N. accumbens мозга крысы аналогичная доза препарата увеличивала примерно в равной мере (от 24 до 48%) содержание как структурированных белков (интерферометрическое исследование) в нейронах, так и размеры клеток [23]. Это поддерживает мнение о том, что существует взаимосвязь между обменом дофамина, сульфгидрильно зависимыми ферментами и структурными белками [24]. Однако наряду с изменением обмена дофамина, который претерпевает изменения под влиянием длительного введения L-ДОФА [11—13] и может в свою очередь влиять на обмен белков, вероятно, и сама экзогенно вводимая L-ДОФА может оказывать влияние на обмен белков. Так, было показано, что L-ДОФА непосредственно связана с изменениями, возникающими в поведении животных, при введении им больших доз этого препарата [25]. Поэтому вопрос о прямом или опосредованном действии на синтез белка длительно вводимой L-ДОФА остается открытым.

Таким образом, проведенная работа показала, что испытуемые препараты—тетрапептид тафцин и L-ДОФА вызывают противоположные по своему действию изменения в синтезе белка в исследуемых типах нейронов. Тафцин через 15 мин после введения приводит к снижению включения [^3H] лейцина в белки нейронов, а длительно (до 4-х недель) вводимый препарат L-ДОФА повышает включение метки. Причем интенсивность включения [^3H] лейцина нарастает по мере удлинения действия препарата. Реакция разных типов нейронов неодинаковая. Наиболее интенсивно вне зависимости от испытуемого препарата реагируют проекционно-эфферентные нейроны V слоя и ассоциативные нейроны подкорковых образований мозга.

AUTORADIOGRAPHIC STUDY OF PROTEIN SYNTHESIS IN BRAIN OF RATS TREATED WITH TUFTSIN AND L-DOPA

KH. DOERKOV R. M.

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

The present autoradiographic study was carried out to determine changes of ^3H -Leucine incorporation into proteins of brain neurons of rats treated with Tuftsin L-Thr-L-Lys-L-Pro-L-Arg (300 $\mu\text{g/kg}$) or L-3, 4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) (100 mg/kg). The neurons of layers III and V of motor cortex, layers III, IV and V of visual cortex and neurons of n. caudatus were examined. The injection of Tuftsin to rats decreased [^3H]-Leucine incorporation in proteins of the studied neurones by 15—46% after 15 min. In contrast, the daily administration of L-DOPA to rats for 3 and 4 weeks led to increase in [^3H]-Leucine incorporation in neurons of various types. The labile incorporation increased from 19 to 79% in 3 weeks and from 52 to 174% in 4 weeks as compared with the control level. Tuftsin and L-DOPA induced more prominent changes in the same types of neurons (large pyramid cells of layer V and neurons of n. caudatus). The action of Tuftsin and L-DOPA on protein metabolism in brain is discussed.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ашмарин Н. П. — В сб.: Фармакология нейропептидов, с. 102—111, М., 1982.
2. Вальдман А. В., Пошивалов В. П. Фармакологическая регуляция интративного поведения. Л., Медицина, 1984.
3. Вальдман А. В., Бондаренко Н. А., Козловская М. М., Русаков Д. Ю., Калихевич В. Н., Ардемасова З. А. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 93, № 4, с. 49—52, 1982.
4. Козловская М. М., Клуша В. Е., Бондаренко Н. А. — В сб.: Нейрохимические основы психотропного эффекта, с. 95—105, М., 1982.
5. Вальдман А. В., Козловская М. М., Ашмарин Н. П., Минеева М. Ф., Анохин К. В. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 92, № 7, с. 31—33, 1981.
6. Kantak K. M., Mezeck K. A. Psychopharmacol., v. 96, p. 468—476, 1988.
7. Айвазовили Н. М., Норданшвили Г. С., Николашвили М. Н. Нейрохимия, т. 4, № 2, с. 141—147, 1985.

8. Абдулов Н. А., Рожанец В. В. — В сб.: Фармакология нейропептидов, с. 40—45, М., 1982.
9. Доведова Е. Л., Качалова Л. М., Орлова Е. И. Журн. невропатол. и психиатрии, т. 86, № 7, с. 1025—1028, 1986.
10. Лаврецкая Э. Ф., Ашмарин И. П., Калихевич В. И., Чаморовская Л. Т., Балабан П. М., Леонтьева Л. И., Захаров Н. С. Хим.-фармацевт. журн., т. 15, № 1, с. 20—23, 1981.
11. Klowans H. L., Goetz C., Nausieda P. A., Weiner W. J. Ann. Neurol., v. 2, p. 125—129, 1977.
12. Wilner K. D., Butler I. J., Seifert W. E., Clement-Cornier Y. C. Biochem. Pharmacol., v. 29, p. 701—706, 1980.
13. Jackson D. M., Walters J. R., Miller I. P. Brain Res., v. 250, p. 271—282, 1982.
14. Доведова Е. Л. Журн. невропатол. и психиатрии, т. 88, № 7, с. 19—21, 1988.
15. Громова Е. А. — В сб.: Нейромедиаторные механизмы памяти и обучения, с. 3—25, Пушкино, 1984.
16. Rogers A. W. Techniques of autoradiography, Amsterdam—London—New York, Elsevier Publishing Company, 1967.
17. Чеботарева Т. Л., Герштейн Л. М. Нейрохимия, т. 5, № 2, с. 180—184, 1986.
18. Камышева А. С. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 107, № 2, с. 209—211, 1989.
19. Raghupathy E., Peterson N., McKean C. M. Biochem. Pharmacol., v. 19, p. 993—1000, 1970.
20. Barker G. A., Santalo R., Blumenstein J. Biological Psychiatry, v. 12, p. 159—169, 1977.
21. Whalley S. A., Nimgaonkar V. L., Rajendran M. Y. Biochem. Soc. Trans., v. 15, p. 688—689, 1987.
22. Камышева А. С. — В сб.: Структурно-функциональные основы интегративной деятельности мозга, с. 103—104, М., 1988.
23. Герштейн Л. М., Сергутина А. В., Чеботарева Т. Л. — В сб.: Структурно-функциональные основы интегративной деятельности мозга, с. 103—104, М., 1988.
24. Spina M. B., Cohen G. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 86, p. 1389—1400, 1989.
25. Nakazato T., Akiyama A. Brain Res., v. 490, p. 332—338, 1989.

Поступила 26.IX.1989

МИКРОТОМ-РЕЗАК МНТ-84

НТК «Микротехника» освоил выпуск микротом-резака МНТ-84 (авт. свид. № 1141303) для приготовления переживающих срезов нативной (нефиксированной, незамороженной) ткани мозга для различных молекулярно-клеточных прижизненных исследований. Переживающие срезы—уникальный объект для изучения: метаболизма, высвобождения и захвата нейротрансмиттеров и других нейроактивных соединений, скрининга фармакологических соединений, электрофизиологических параметров нервных и глиальных клеток и других биохимических, биофизических и иммуноцитохимических исследований нервных клеток *in vitro*. Приборы, аналогичные МНТ-84, в СССР и за рубежом не выпускаются.

Основные параметры:

- толщина срезов—300—600 мкм
- регулировка толщины срезов—плавная
- скорость резки—1 срез за 2 с
- максимальная площадь среза— 5×5 мм

Микротом снабжен электроприводом, блоком питания, устройством дистанционного управления, устройством для изготовления стандартных держателей объекта из агара. Микротом удобен в работе, компактен, создает максимальную комфортность в работе. Планируется выпуск дополнительных съемных блоков для изготовления срезов нативной ткани толщиной 100—300 мкм, вибротомная приставка, блок для изготовления срезов фиксированной ткани толщиной 5—25 мкм.

Запросы-заказы на изготовление микротом-резака МНТ-84 направлять по адресу: 142292, г. Пушкино, АБ-5-6, НТК «Микротехника».





ВЛИЯНИЕ ЛИШЕНИЯ ПАРАДОКСАЛЬНОЙ ФАЗЫ СНА НА СОДЕРЖАНИЕ СУММАРНЫХ БЕЛКОВ И ИХ МЕТАБОЛИЗМ В ЯДРАХ НЕЙРОНОВ И ПЕРИНЕЙРОНАЛЬНЫХ ГЛИОЦИТОВ РЯДА ОТДЕЛОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

ГЛУЩЕНКО Т. С., ДЕМИН Н. Н., КЛЕННИКОВА В. А., ТАРАНОВА Н. П.

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

Показано, что 24-часовое лишение крыс парадоксальной фазы сна (при значительном увеличении суммарной продолжительности медленноволновой) сопровождалось усилением интенсивности метаболизма белков (по включению в них метки) в ядрах нейронов V слоя и перинейрональных глиоцитов III слоя двигательной зоны коры больших полушарий головного мозга при неизменности содержания белков в ядрах клеток обоих исследованных слоев. В ядрах клеток зрительной зоны обнаружено повышение содержания белков без сдвигов включения метки (за исключением ядер нейронов V слоя, в которых оно снижалось, что может указывать на торможение белкового метаболизма в клетках зрительной зоны, в противоположность его активированию в двигательной). Эти данные были сопоставлены с аналогичными, ранее опубликованными, касающимися ядер клеток дорзального ядра шва, синего пятна и $5A_3$ -поля гиппокампа.

В настоящее время уже установлен определенный комплекс нейрорхимических характеристик процессов сна, его медленноволновой (МФС) и парадоксальной (ПФС) фаз [1—3]. С использованием оригинального метода прижизненной биопсии во время МФС и ПФС, точно регистрируемых ЭЭГ-методом, был выявлен ряд фактов [2, 4], характеризующих пластический и энергетический метаболизм лишь в больших пирамидных нейронах темного отдела коры больших полушарий (КБП). В нашей лаборатории еще с конца 60-х годов также развивается серия исследований некоторых отделов головного мозга крыс в целях разработки различных вопросов нейрорхимии сна, в частности, и на уровне отдельных клеток систем нейрон-перинейрональные глиоциты [2, 5—8]. При этом при определении белков и РНК большое внимание было уделено изучению клеток и таких структур, имеющих прямое отношение к циркадианным процессам бодрствования-сон [9—12], как серотонинергическое дорзальное ядро шва (ДЯШ) [13] и адренергическое синее пятно (СП) [5].

У крыс эпизоды естественного сна в циркадианных циклах очень кратковременны (около 20 мин) и их весьма трудно контролировать в серийных биохимических исследованиях. В связи с этим в большинстве наших работ, прежде всего посвященных вопросу причин

необходимости сна, изучали последствия либо полной депривации сна, либо избирательного лишения ПФС, особо необходимой для репаративных процессов в нейронах [2, 6, 8]. Такую искусственную 24—48-часовую бессонницу рассматривали как модель затянувшегося бодрствования. При этом были установлены разнообразные, специфические для каждой структуры, количественные сдвиги суммарных цитоплазматических белков и РНК и—практически в ядрах—перинеурональных глицитов исследованных отделов головного мозга. Затем в серии работ [14, 15] с использованием количественной цитофотометрии и автордиографии были изучены эффекты 24-часового лишения ПФС на содержание и метаболизм белков в ядрах нейронов и глицитов ДЯШ, СП и поля СА₃ гиппокампа (ГК).

В целях расширения дальнейшего изучения нейробиохимических коррелятов сна и его нарушений нам представлялось целесообразным изучить влияние лишения ПФС на содержание белков в ядрах нейронов и их глияльных клеток-сателлитов и на включение в эти белки DL[³H]фенилаланина в III и V слоях двигательной и зрительной зон КБП и сопоставить эти данные с полученными ранее для ядер клеток указанных выше структур—ДЯШ, СП и ГК. Все эти важные структуры головного мозга так или иначе взаимосвязаны между собой многими морфологическими проводниками, передающими эфферентные и афферентные импульсы [16]. Изучение же метаболизма именно ядерных белков в системах нейрон-глициты вызывает особый интерес в силу высокой реактивности ядер и их роли в регуляции белкового синтеза, обеспечивающего течение биохимических процессов во всей клетке.

Материалы и методы

Опыты проводили на взрослых крысах-самцах линии *Wistar* массой 180 ± 10 г. Контролем служили бодрствовавшие животные, находившиеся в состоянии относительного физиологического покоя. Для избирательного лишения ПФС использовали метод Jouvét [17] с помещением крыс на маленькие площадки (5×5 см), расположенные над водой. Исследование проводили через 24 ч после начала опыта—в срок, по полученным в нашей лаборатории данным, наиболее адекватный для оценки специфического влияния лишения ПФС. За 1 ч до умерщвления контрольных и подопытных животных (быстрой декапитацией) им внутрибрюшинно вводили DL[³H]фенилаланин (У. А. 1,5 Ки/мм, В/О «Изотоп») в дозе 10 мКи/г. Извлеченный на холоде головной мозг фиксировали в охлажденной смеси Карнуа, обезжировали по общепринятой схеме и заливали в парафин. В параллельных срезах двигательной и зрительной зон КБП (толщиной 5 мкм) методом количественной цитофотометрии определяли содержание белков в ядрах нейронов и перинеурональных глицитов III и V слоев, а интенсивность включения метки в исследуемые белки—автордиографически в этих же срезах по подсчету зерен восстановленного серебра. Используемые методы в деталях описаны ранее [15]. Средние арифметические величины находили по результатам исследования 100—150 клеток; у каждого животного исследовали по 20—25 клеток. Статистическую обработку выполняли по критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Все усредненные результаты, полученные при исследовании ядер клеток указанных выше зон КБП головного мозга крыс, представлены на рисунке и сопоставлены с ранее опубликованными [14, 15] подобными результатами исследования других структур головного мозга.

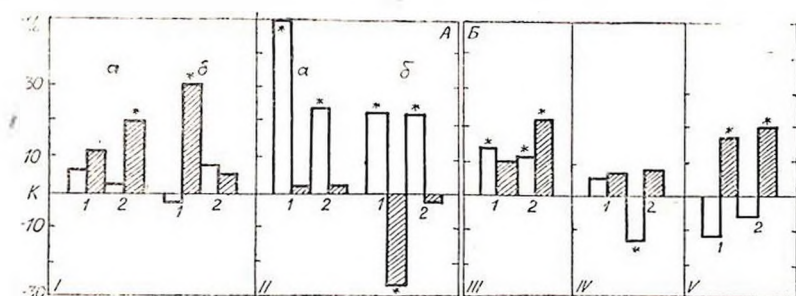


Рис. Содержание суммарных белков и включение в них метки (после введения 2,3-DL-[³H]фенилаланина) в ядрах нейронов (1) и их перинейрональных глиоцитов (2): А—двигательной (1) и зрительной (II) зон коры больших полушарий (α—III слой клеток, β—V слой клеток), Б—дорзального ядра шва (III), синего пятна (IV), зоны СА₃ гиппокампа (V) головного мозга крысы после 24-часового лишения их парадоксальной фазы сна. Столбики: белые—содержание белков, заштрихованные—включение метки. По оси ординат—% от величины в контроле (бодрствовавшие intactные животные). *—статистически достоверные данные.

На рисунке (А) можно видеть, что 24-часовое лишение ПФС вызывало в III и V слоях как двигательной, так и зрительной зон КБП большие сдвиги в судьбе ядерных белков их клеток, причем разные и по величине, и по направленности. Так, если в ядрах нейронов и глиоцитов III слоя *двигательной* зоны коры не было выявлено изменений в содержании белков, а в ядрах нейронов и включения метки в белки, то в ядрах глиоцитов интенсивность включения метки увеличивалась (+20%). В V слое же было установлено лишь большое (+31%) повышение интенсивности включения метки в белки ядер нейронов. Во многом противоположные изменения были обнаружены в случае *зрительной* зоны коры. В этой структуре при стабильной величине включения метки в ядерные белки как нейронов, так и глиоцитов III слоя, содержание белков в ядрах нейронов повышалось на 50%, а в ядрах глиоцитов на 24%. В V слое не наблюдали изменения включения метки в белки ядер глиоцитов, но в ядрах нейронов отмечено его существенное снижение (—27%). При этом содержание белков в ядрах не только глиоцитов, но и нейронов повышалось.

В результате можно допустить (ср. [18]), что лишение ПФС заметно активировало метаболизм белков в глиоцитах III слоя *двигательной* зоны КБП, но это не сопровождалось сдвигом равновесия между ана- и катаболизмом белков как в ядрах глиоцитов, так и в ядрах нейронов, поскольку содержание белков не отличалось от контроля. В V слое же, видимо, резкое повышение интенсивности мета-

болизма белков в ядрах нейронов также лишь поддерживало величину нормального содержания белков. Что же касается зрительной зоны, то можно думать о торможении метаболизма белков в ядрах клеток ее систем нейрон-глиоциты: несмотря на отсутствие сдвигов интенсивности включения метки в белки ядер нейронов III слоя и глиоцитов V слоя при значительном ее снижении в нейронах V слоя, содержание ядерных белков повышалось во всех исследованных клетках, особенно в ядрах нейронов III слоя.

При рассмотрении этих данных следует иметь в виду, что 24-часовое лишение крыс ПФС по методу Jouvet вызывает в их циркадианном цикле бодрствование—сон не только выпадение ПФС, но и значительное сокращение доли бодрствования при соответствующем развитии дремотного состояния (МФС₁) и типичной МФС₂ (с закрытием глаз) [19].

Сравним эти эффекты 24-часового лишения ПФС в исследованных зонах КБП с данными [14, 15], характеризующими влияние такого же нарушения сна в других структурах головного мозга (рисунков, б).

Так, в расположенном в среднем мозгу преимущественно серотонинергическом ДЯШ в ядрах нейронов и их глиальных клетках-сателлитах содержание суммарных белков незначительно, но достоверно увеличивалось (соответственно на 14 и 11%) на фоне существенного повышения (+22%) интенсивности включения метки в ядерные белки глиоцитов—«трофических компонентов» систем нейрон-глия. В то же время содержание белков в цитоплазме нейронов ДЯШ при таких же условиях лишения ПФС снижалось [13]. Эти данные могут указывать на крайнее напряжение интенсивности метаболизма белков в системах нейрон-глия ДЯШ. Его функциональная активность участвует в инициации и поддержании МФС—основного состояния животных при лишении их ПФС в условиях наших опытов. Возможно, с чрезмерной длительностью эпизодов МФС и связано отмеченное повышение метаболизма белков в клетках ДЯШ, компенсаторное в условиях, затрудняющих развитие нормального сна. Следует указать, что нейроны ДЯШ дают обширные проекции в вышележащие структуры—переднелатеральную область гипоталамуса, дугообразное ядро, ГК [16].

Гораздо более спокойную картину можно констатировать в случае ядер клеток также находящегося в стволе головного мозга СП—самой крупной его адренергической структуры. При лишении ПФС в ядрах его нейронов содержание белков и их метаболизм практически не отличались от аналогичных величин у контрольных животных; в ядрах же глиоцитов содержание белков даже несколько снижалось (—14%) при относительно неизменной интенсивности включения в них метки. Содержание же белков в цитоплазме нейронов СП при 24-часовом же лишении ПФС не отличалось от контроля [5]. Итак, обращает на себя внимание такое отсутствие заметной реакции белкового метаболизма в ядрах клеток СП, способствующего бодрствованию, активации головного мозга. Нейроны СП дают многочисленные проекции в различные отделы головного мозга.

В тех же условиях лишения ПФС, так же как в ДЯШ, оно сопровождалось активированием метаболизма белков и в ядрах клеток поля СА₃ ГК: небольшое (—12%), но уменьшение содержания белков в ядрах нейронов имело место несмотря на одновременное увеличение (+18%) интенсивности включения метки в эти белки; в ядрах же глиальных клеток-сателлитов содержание белков не менялось

при таком же, как и в ядрах нейронов, увеличении включения метки (+20%). Можно допустить, что эти данные свидетельствуют о некотором истощении ядерных белков в нейронах исследуемого поля ГК при общем повышении метаболизма белков в системах нейрон-глия ГК—структуры археокортекса, участвующей (наряду с другими важными функциями в организации форм поведения), в частности, и в регуляции состояний бодрствования и сна. Состояние же МФС при лишении ПФС сопровождается в ГК слишком продолжительной высокой тета-активностью и Δ -волнами.

Итак, среди структур головного мозга, имеющих отношение к регуляции циклов бодрствование-сон, 24-часовое лишение крыс ПФС при значительной продолжительности МФС и сокращенном бодрствовании вызывало у них сильное активирование метаболизма белков в ДЯШ, поле СА₃ ГК и двигательной зоне КБП при заторможенности в зрительной зоне и СП. Существенное преобладание анаболизма белков над их распадом при нормальной интенсивности включения метки в ядрах клеток зрительной зоны может указывать на отсутствие возбуждения зрительной системы, характерного и для бодрствования, и для ПФС. В то же время стрессорное состояние, связанное и с невозможностью принятия животными в течение продолжительного времени лежачего положения вместе с вынужденной гипокинезией, видимо, может служить причиной того, что поддержание нормального уровня содержания белков в ядрах клеток исследованных слоев двигательной зоны в наших условиях лишения ПФС требовало значительного повышения метаболизма белков в ядрах глиоцитов III слоя и особенно в ядрах нейронов V слоя.

THE INFLUENCE OF REM-SLEEP DEPRIVATION ON TOTAL PROTEIN CONTENT AND PROTEIN TURNOVER IN NEURONAL AND PERINEURONAL GLIOCYTE NUCLEI OF RAT BRAIN

GLUSHCHENKO T. S., DOEMIN N. N., KLENIKOVA V. A., TARANOVA N. P.

Pavlov Institute of Physiology, USSR Academy of Sciences, Leningrad

It has been shown that 24 h REM sleep deprivation (coupled with a significant increase of the slow wave sleep and a decreased wakefulness) was accompanied by a rise in the protein turnover rate (measured by labeling after DL-³H-phenylalanine injection) in layer V neuron and in layer III perineuronal gliocyte nuclei of the cortical motor area. The protein content in the cell nuclei of both layers investigated remained unchanged. In cell nuclei of the visual area there was an increase in protein content (in layer III neurons, in particular) in the absence of any changes in the labeling rate (with the exception of a considerable drop in layer V of neuron nuclei). Such data may point to some inhibition of protein metabolism in neuron-glia systems of visual area contrary to its activation in the motor one. These findings were contrary to its activation in the motor one. These findings were compared with earlier similar data for cell nuclei of m. raphe dorsalis, l. coeruleus and CA₃-zone of the hippocampus.

ЛИТЕРАТУРА

1. Демин Н. Н. Успехи соврем. биол., т. 76, с. 132—144, 1973.
2. Демин Н. Н., Коган А. Б., Моисеева Н. Н. Нейрофизиология и нейрохимия сна. Л., Наука, 1978.
3. Giorditta A., Capano C. P., Zucconi G. G. — In: Handbook of Neurochemistry, 2nd ed. (ed. A. Lajtha), v. 8, p. 443—476, N. Y., L., Plenum Press, 1985.
4. Kogan A. B., Feldman G. L., Gusatinsky V. N., Burikov A. A., Verbitsky E. V., Kondratyeva L. A., Chigrinov I. A., Fedorenko G. M. — In: Neurobiology of sleep-wakefulness cycle (ed. T. Ontani). p. 379—390, Tbilisi, Metsnereba, 1988.
5. Демин Н. Н., Маликов У. М., Рубинская Н. Л. Физиол. журн. СССР, т. 66, с. 1626—1631, 1980.
6. Демин Н. Н. Нейрохимия, т. I, с. 20—27, 1982.
7. Демин Н. Н., Шелепина Е. П., Перобкова Л. Н., Крапивин С. В., Воронина Т. А. Физиол. журн. СССР, т. 72, с. 723—728, 1986.
8. Demin N. N. — In: Neurobiology of sleep-wakefulness cycle (ed. T. Ontani), p. 241—254, Tbilisi, Metsnereba, 1988.
9. Jouvet M. Ergebn. Physiol., B. 64, S. 165—305, 1972.
10. Жуваз М. — В кн.: Саморегуляция процесса сна (ред. Н. Н. Моисеева), с. 40—46, Л., 1977.
11. Koella W. P. Die Physiologie des Schlafes: Eines Einführung, Gustav Fisher, Verlag, Stuttgart, N. J., 1988.
12. Hobson J. A. Sleep. N. Y., Sc. Amer. Library. A Division of Lippincott, 1989.
13. Маликов У. М., Панов А. Н. Докл. АН СССР, т. 257, с. 501—503, 1981.
14. Кленикова В. А., Глуценко Т. С. — В кн.: Функции нейроглии (под ред. А. Н. Ройтбака), с. 50—53, М., Наука, 1987.
15. Кленикова В. А., Глуценко Т. С., Тунева С., Тенчева Ц. Физиол. журн. СССР, т. 68, с. 9—11, 1982.
16. Оленев С. Н. Конституция мозга. Л., Медицина, 1987.
17. Rujot J., F. Mouret J., Jouvet M., Glowinski J. Science, v. 159, p. 112—114, 1968.
18. Певзнер Л. З. Функциональная биохимия нейроглии. Л., Наука, 1972.
19. Карманова Н. Г., Максимук В. Ф., Панов А. Н., Рубинская Н. Л., Хомуцкая О. Е. Физиол. журн. СССР, т. 64, с. 1074—1081, 1978.

Поступила 28.VI.1989



ВЛИЯНИЕ НАРУШЕНИЙ СНА НА АКТИВНОСТЬ АТРАз НЕЙРОНОВ И ГЛИОЦИТОВ ГИППОКАМПА У КРЫС, СЕЛЕКТИРОВАННЫХ ПО ПОРОГУ ВОЗБУДИМОСТИ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

ТАРАНОВА Н. Н., КЛЕННИКОВА В. А., ВАЛДО А. Н.,
ШИРЯЕВА Н. В., КИЛАГИНИ Д. А., ЛЮБАТИНА Н. Г.

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

Цифрофотометрическим методом исследована активность Na^+ , K^+ -АТРазы нейронов и глиоцитов гиппокампа у крыс двух линий, селективированных по порогу возбудимости. Показано, что в порке у крыс обеих линий активность Na^+ , K^+ -АТРазы, и Mg^{++} -АТРазы в глиоцитах соответственно в 1 и 6 раз выше, чем в нейронах. При этом у крыс с высоким порогом возбудимости активность Na^+ , K^+ -АТРазы в нейронах оказалась на 50% выше, чем у крыс с низким порогом возбудимости. Депривация парадоксальной фазы сна вызывала резкое, в 2,4 раза повышение активности этого фермента в нейронах гиппокампа у крыс обеих линий. Выявлены также изменения функционального состояния периферической нервной системы и ЦНС. Обнаружено повышение возбудимости периферического отдела НС, наиболее резко выраженное у крыс с высоким порогом возбудимости. Функциональные сдвиги в ЦНС после депривации приводили к снижению способности к образованию условного рефлекса активного избегания у крыс с низким порогом возбудимости. В то же время известный амнезический эффект депривации парадоксальной фазы сна четко проявился лишь у крыс с низкой возбудимостью НС. Предполагается, что резкое повышение активности Na^+ , K^+ -АТРазы в нейронах гиппокампа является одной из причин изменения уровня их активации и в значительной мере обуславливает развитие нарушений условнорефлекторной деятельности животных после длительных нарушений сна.

Депривация сна или длительные его нарушения вызывают заметные сдвиги в функциональном состоянии ЦНС и в поведении, повышение возбудимости коры и других структур мозга, появление агрессивности, гиперфагии, нарушение обучения и консолидации следов памяти как у экспериментальных животных, так и у человека [1, 2]. В основе этих нарушений, по-видимому, лежат изменения некоторых метаболических процессов в мозгу. Так, например, показано, что избирательное лишение крыс парадоксальной фазы сна (ПФС) в течение 24 ч приводит к перестройке метаболизма белков и нуклеиновых кислот в нейронах и глиоцитах некоторых структур мозга [3], вызывает ряд биохимических изменений непосредственно в си-

наптосомах [4, 5], а также развитие конформационных изменений в синаптических мембранах [6]. В некоторых отделах мозга были отмечены также изменения активности мембраносвязанных ферментов, в частности АТРаз [7], что подтверждает представления о том, что биохимическая модификация мембранных структур клеток мозга в условиях длительных нарушений сна не может не отразиться на функциях клеточных мембран нейронов и глии [4, 5].

Поскольку Na^+ , K^+ -АТРаза обеспечивает транспорт ионов через возбудимые мембраны, генерацию трансмембранного потенциала, непосредственно влияя на возбудимость нервной клетки, а также на освобождение и поглощение нейротрансмиттеров, значительный интерес представляет вопрос, существует ли какая-либо зависимость между активностью АТРаз мозга и уровнем возбудимости НС. Известно, что порог возбудимости является одним из основных параметров в оценке функционального состояния НС, и показано, что линии крыс, селектированные по порогу возбудимости периферического отдела НС, аналогичным образом различаются по пороговым характеристикам возбудимости и центральных отделов НС [8, 9]. Принимая во внимание важную роль глинокамина в процессах обучения и регуляции поведения, в настоящей работе мы ставили задачу провести сравнительное исследование активности АТРаз в нейронах и глиоцитах глинокамина у крыс двух линий, селектированных по порогу возбудимости. Поскольку ПФС находится под контролем тета-ритма глинокамина [2], представляло интерес также выявить характер изменения активности этих ферментов и функционального состояния периферических и центральных отделов НС после 24-часового лишения ПФС у крыс этих линий в зависимости от исходного уровня возбудимости НС.

Материалы и методы

Опыты ставили на крысах-самцах линий, селектированных по высокому (ВП, в среднем 2,72 В) и низкому (НП, 0,48 В) порогам возбудимости большеберцового нерва 18—20-го поколения отбора в возрасте 5 месяцев [8]. Животных выращивали в условиях лабораторного вивария при 12-часовом световом дне и комнатной температуре на стандартном рационе, дававшемся неограниченно. Лишение ПФС вызывали по методу Jouvet и соавт. [10] с использованием малых площадок. Активность АТРаз определяли на нефиксированных свежемороженых срезах глинокамина толщиной 10 мкм, гистохимическим методом Wachstein, Meisel [11] в нашей модификации [7], которая позволяет количественно оценить активность АТРаз в отдельных клетках на срезах головного мозга крысы. Оптическую плотность окраски продуктов АТРазной реакции в клетках измеряли методом 2-флюовой цитофотометрии [12] на микроскопе-фотометре МЦФУ-1 при длинах волн 505 и 615 нм. Суммарную активность АТРаз выражали в единицах оптической плотности ($\times 10$) в пересчете на 1 мин инкубации. Активность Na^+ , K^+ -АТРазы вычисляли по разнице между суммарной активностью АТРаз и активностью Mg^{2+} -АТРазы, выявляемой в присутствии специфического ингибитора Na^+ , K^+ -АТРазы оубаина. Учитывая, что нейроны и глиоциты различаются по размерам клеток и условиям фотометрирования (увеличение, площадь зонда), для сравнения активности АТРаз двух типов клеток вычисляли У. А. АТРаз, в расчете на единицу фотомет-

рируемой площади (на 1 мкм). Среднее арифметическое величины активности АТРаЗ нейронов и глиоцитов для каждого животного находили по данным фотометрии 20—25 клеток. Статистическую обработку всего цифрового материала (по 80—90 клеток от животных каждой экспериментальной группы) проводили по непараметрическому критерию Розенбаума [13].

Пороги возбудимости болюсберцового нерва определяли по двигательной реакции задней конечности крысы при действии прямоугольных стимулов длительностью 50 мс [14]. Эти изменения проводили до начала и сразу после окончания 24-часового лишения ПФС. Одновременно проводили определение порога возбудимости у контрольных животных тех же линий, находившихся в обычных клетках в том же помещении, что и подопытные животные.

Влияние депривации ПФС на функциональное состояние центральных отделов НС оценивали по скорости выработки условного рефлекса активности избегания (УРАИ) и по уровню сохранения условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ). Обучение УРАИ (100 сочетаний условного и безусловного раздражения) проводили по методу В. К. Федорова (1974) сразу после депривации ПФС.

Выработку УРПИ проводили непосредственно перед началом депривации ПФС [16]. Сохранение УРПИ проверяли дважды: через 15 мин и 20 ч после прекращения депривации ПФС. Параллельно тестировали по всем методикам контрольных крыс. Статистическую обработку результатов проводили по критериям Стьюдента, а также Вилкоксона-Манна-Уитни [13].

Результаты и обсуждение

Активность АТРаЗ определяли в пирамидных нейронах зоны СА₃ гиппокампа и в перинейрональных сателлитных глиоцитах.

Результаты, представленные в табл. 1, показывают, что у контрольных крыс обеих исследованных линий активность как Na⁺, K⁺-АТРаЗы, так и Mg²⁺-АТРаЗы в глиоцитах соответственно в 4 и 6 раз

Таблица 1

Удельная активность (У. А.) АТРаЗ нейронов и глиоцитов зоны СА₃ гиппокампа у крыс двух линий, селектированных по порогу возбудимости НС

Линии крыс	У. А. АТРаЗ (10 ⁴ мин мкм ²)		
	Общая АТРаза	Na ⁺ , K ⁺ -АТРаза	Mg ²⁺ -АТРаза
Н Е Й Р О Н Ы			
Линия ВП (высокий порог)	2.90 ± 0.03	1.00 ± 0.09	1.90 ± 0.11
Линия НП (низкий порог)	2.48 ± 0.07 p < 0.02	0.61 ± 0.05 p < 0.05	1.55 ± 0.05 p < 0.05
Г Л И О Ц И Т Ы			
Линия ВП (высокий порог)	22.8 ± 1.1	9.7 ± 0.1	13.1 ± 0.4
Линия НП (низкий порог)	20.9 ± 0.7	1.1 ± 0.7	10.0 ± 0.6 p < 0.02

выше, чем в нейронах, что подтверждают результаты, полученные нами ранее при цитофотометрическом исследовании активности АТРаз мозга у крыс линии *Wistar*, разводящихся без отбора [7], и согласуются с данными литературы, полученными на обогащенных глиальных и нейрональных фракциях [17]. Такой высокий уровень активности АТРаз глии, по-видимому, и обеспечивает поддержание более высокого трансмембранного потенциала глиальных клеток в покое по сравнению с нейронами [18]. Кроме того, выявились и некоторые межлинейные различия. Так, у крыс с высоким порогом возбудимости (линия ВП), находящихся в состоянии относительного физиологического покоя активность Na^+ , K^+ -АТРазы в нейронах оказалась на 50% выше, чем у крыс с низким порогом возбудимости. Активность Mg^{2+} -АТРазы и в нейронах, и в глиоцитах у этих крыс тоже оказалась примерно на 20% выше, чем у крыс линии НП.

Депривация ПФС в течение 24 ч приводила у крыс линии НП к значительному повышению общей активности АТРаз в нейронах гиппокампа (на 38—40%) за счет резкого повышения (в 2,4 раза) активности Na^+ , K^+ -АТРазы (рис. 1). По-видимому, это связано с

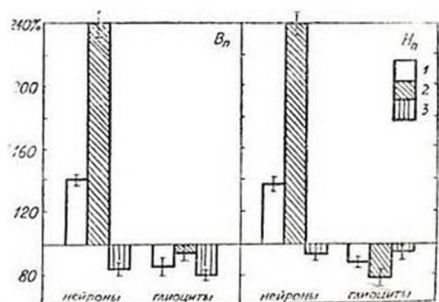


Рис. 1. Влияние 24-часовой депривации парадоксальной фазы сна на активность АТРаз нейронов и глиоцитов зоны СА₁ гиппокампа у крыс с высоким (Вп) и низким порогом (Нп) возбудимости НС. За 100% принят уровень активности АТРаз у контрольных животных, не подвергавшихся депривации парадоксальной фазы сна, $p < 0,05$. 1—общая АТРаза, 2— Na^+ , K^+ -

АТРаза, 3— Mg^{2+} -АТРаза

длительным возбуждением и активацией нейронов гиппокампа при депривации ПФС и активным поступлением Na^+ внутрь клетки. Обычно Na^+ -насос работает ниже его максимальной способности и любое увеличение концентрации внутриклеточного Na^+ активирует работу насоса [19], чтобы обеспечить удаление избытка Na^+ из клетки. В глиальных клетках, напротив, активность этого фермента несколько снижалась (на 24%). Физиологические изменения концентрации экстраклеточного K^+ мало влияют на активность Na^+ -насоса, но отмеченное нами снижение активности глиальной Na^+ , K^+ -АТРазы может затруднить поглощение глиоцитами увеличенно-

го количества K^+ , поступившего из нейронов в межклеточную среду, и привести к деполяризации клетки [20].

У крыс линии ВП после депривации ПФС также обнаружено резкое повышение активности Na^+ , K^+ -АТФазы в нейронах, в 2,4 раза (рис. 1), но при этом происходило некоторое снижение активности Mg^{2+} -АТФазы (на 16%). Поскольку Mg^{2+} -АТФаза обеспечивает захват нейротрансмиттеров в синаптические везикулы [19], то снижение ее активности в нейронах гиппокампа у крыс линии ВП, по-видимому, может привести к нарушению синаптических процессов.

В глиоцитах гиппокампа этой линии крыс в отличие от линии НП, уровень активности Na^+ , K^+ -АТФазы при лишении ПФС практически не изменялся, но при этом снижалась активность Mg^{2+} -АТФазы примерно на 21% (рис. 1).

Таким образом, депривация ПФС вызывала резкое повышение активности Na^+ , K^+ -АТФазы в нейронах гиппокампа у крыс линий НП и ВП. В то же время активность Mg^{2+} -АТФазы достоверно снижалась как в нейронах, так и в глиоцитах, но только у крыс с низкой возбудимостью (линия ВП), что и составляет главное отличие функционального ответа АТФаз, этих мембраносвязанных ферментов клеток гиппокампа, на такую длительную функциональную нагрузку, как 24-часовое лишение ПФС.

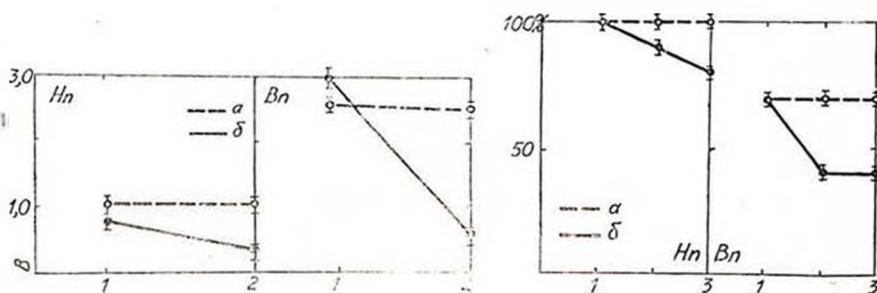


Рис. 2. Влияние 24-часовой депривации парадоксальной фазы сна на пороги возбудимости нервно-мышечного аппарата у крыс линии ВП и НП. По оси ординат—значение порога возбудимости (В). а—контрольная группа крыс, б—крысы, подвергавшиеся 24-часовой депривации парадоксальной фазы сна. 1—до опыта, 2—после опыта

Рис. 3. Влияние 24-часовой депривации парадоксальной фазы сна на сохранение условного рефлекса пассивного избегания у крыс линий ВП и НП. По оси ординат—процент крыс, получивших электрический ток. а—контрольная группа крыс, б—крысы, подвергавшиеся депривации парадоксальной фазы сна. 1—до опыта, 2—после опыта, 3—через 20 ч после опыта

Исследование влияния депривации ПФС на уровень возбудимости нервно-мышечного аппарата у тех же крыс выявил снижение порога возбудимости у крыс обеих линий (рис. 2), однако более значительное у крыс ВП (в 7,7 раза, а у крыс НП—в 2 раза). Следует отметить, что при этом порог возбудимости у крыс обеих линий достиг практически одинакового, очень низкого предела—0,3—0,4 В. Что касается контрольных животных тех же линий, не подвергавшихся депривации ПФС, то достоверных изменений порога возбудимости за 28

тот же период у них не отмечено (рис. 2). Таким образом, у крыс обеих линий 24-часовое лишение ПФС приводило к одностороннему изменению функционального состояния периферического отдела НС—повышению его возбудимости до одинакового, возможно, предельного уровня.

Можно было ожидать, что депривация ПФС вызовет также односторонние с периферической НС сдвиги и в функциональном состоянии ЦНС у крыс обеих линий. В пользу этого предположения свидетельствовало наличие генетической связи между порогом возбудимости периферической НС и ЦНС [9], а также между порогом возбудимости ЦНС и способностью животных к обучению [2] и обнаруженные нами в настоящей работе односторонние и сходные по глубине изменения активности Na^+ , K^+ -АТФазы нейронов гиппокампа.

Таблица 2

Влияние 24-часовой депривации ПФС на обучение условного рефлекса активного избегания крыс линии ВП и НП (n=8)

Линия крыс	Условия опыта	Суммарное число условных рефлексов	Суммарное время, необходимое для выполнения избегания.	P
Линия ВП (высокий и порог)	Контроль Депривация ПФС	13,75±4,94 16,75±3,10	685,46±3,76 641,86±10,3	
Линия НП (низкий порог)	Контроль Депривация ПФС	23,25±5,62 10,25±2,05	111,98±19,6 685,37±9,3	p<0,05

Изучение способности к образованию УРАИ (табл. 2) и сохранению УРПИ (рис. 3) у крыс указанных линий после лишения ПФС подтвердило это предположение. Так, депривация ПФС существенно снизила способность к образованию УРАИ у крыс линии НП (достоверное увеличение времени, необходимого для выполнения избегания), а также почти в два раза сократило количество животных линии ВП, сохранивших УРПИ.

Способность к образованию УРАИ у крыс линии с высоким порогом возбудимости и к сохранению УРПИ у животных линии с низким порогом возбудимости практически не изменялась. Следовательно, депривация ПФС снижает способность к обучению УРАИ преимущественно у животных с высоким исходным уровнем возбудимости, тогда как у крыс с исходно низкой возбудимостью ее резкое повышение после депривации ПФС не обеспечивало сохранения УРПИ, что свидетельствует о нарушении процессов консолидации памяти. Таким образом, амнезический эффект, который носил стойкий характер и даже усиливался при тестировании через 20 ч после прекращения депривации ПФС, четко проявляется лишь у животных с низкой возбудимостью НС.

Ранее нами было показано, что депривация ПФС вызывает у крыс ряд изменений биоэлектрической активности мозга, в том числе исчезновение фазического компонента тета-ритма гиппокампа, появление притативных знаков и перераспределение пиков мощности в спектрограммах активации и пространственной синхронизации гиппо-

кампа и коры, то есть с нарушением необходимых условий для процессов образования и упрочения условнорефлекторных связей и для извлечения информации из памяти. Это позволяет думать, что отмеченное нами снижение способности к сохранению УРПИ у крыс линии ВП, в значительной мере обусловлено угнетением тета-ритма и изменением уровня активации нейронов гиппокампа.

По-видимому, обнаруженное нами резкое повышение активности Na^+ , K^+ -АТФазы в нейронах гиппокампа (рис. 1) является одной из причин изменения "уровня" активации и в значительной мере обуславливает развитие нарушений условнорефлекторной деятельности животных после длительного лишения их ПФС.

Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что лишение крыс обеих линий ПФС привело к существенным и однонаправленным сдвигам в активности АТФаз мозга и в функциональном состоянии их НС—как в периферическом, так и центральном отделах, ответственных за выработку и сохранение оборонительных условных рефлексов. Анализ полученных данных позволяет предположить существование определенного оптимума в активности АТФаз мозга, обеспечивающего тот уровень возбудимости, который необходим для консолидации памятного следа и осуществления процесса обучения.

EFFECTS OF SLEEP DISTURBANCES ON THE ACTIVITY OF ATPase OF NEURONS AND GLYOCYTES IN HIPPOCAMPUS OF RATS SELECTED ACCORDING OF THE EXCITATION THRESHOLD OF THE NERVOUS SYSTEM

TARANOVA N. P., KLENIKOVA V. A., VAIDO A. I., SHIRYAEVA N. V., KULAGIN D. A., LOPATINA N. G.

Pavlov Institute of Physiology, USSR Academy of Sciences, Leningrad

We have analyzed by cytophotometry the activity of Na^+ and K^+ -ATPases of hippocampal neurons and glyocytes of two rat strains selected according to the excitation threshold. In the norm both strains of rats exhibit the activity of Na^+ , K^+ and Mg^{2+} -ATPases exceeding that of neurons by a factor of 4 and 6. At the same time, in rats with high excitation threshold the activity of Na^+ and K^+ -ATPase in neurons was 50% higher than in rats with low excitation threshold. REM-sleep deprivation lead to abrupt (2,4-fold) increase in the activity of these enzymes in hippocampal neurons of both rat strains. Changes in functional state of the PNS and CNS were noted. PNS was more prone to excitation in rats with low excitation threshold. Functional changes in the CNS after REM-sleep deprivation resulted in diminished capacity to form CRAA in rats with low excitation threshold. At the same time, the well-known amnesic effect of REM-sleep deprivation was clearly present only in rats with low excitation of the CNS. A sharp increase in the activity of Na^+ and K^+ -ATPases in hippocampal neurons is a possible causative factor, leading to variation of the activation level; it appears to be responsible for the abnormal reflex activity after prolonged REM-sleep deprivation.

ЛИТЕРАТУРА

1. Демин Н. П., Коган А. Б., Моисеев Н. П. Нейрофизиология и нейрохимия сна. Л., Наука, 1978.
2. Ontani T. — In: Neurobiology of sleep-wakefulness cycle (ed. T. Ontani), p. 19—39, Tbilisi, Metsnereba 1988.
3. Паков А. Н., Маликов У. М. Цитология, т. 2, с. 1381—1385, 1981.
4. Таганова Н. Р., Лисакова О. S. Neurochem. Int., v. 13, Suppl. 1. p. 178, 1988.
5. Таранова Н. П., Нилова Н. С. Физиол. журн. СССР, т. 72, № 8, с. 1065—1068, 1986.
6. Нилова Н. С. Нейрохимия, т. 3, № 4, с. 392—394, 1984.
7. Кленикова В. А., Таранова Н. П. Физиол. журн. СССР, т. 74, № 4, с. 490—496, 1988.
8. Зимкина А. М. — В кн.: Функциональные состояния мозга, М., МГУ, с. 6—20, 1975.
9. Александрова Н. П., Ширяева Н. В., Критин Ю. Г., Лопатина Н. Г. Докл. АН СССР, т. 259, № 5, с. 1233—1235, 1981.
10. Jonvet D., Vimont P., Delorme F., Jonvet M. Compt. rend. Soc. biol., v. 158, p. 756—759, 1964.
11. Wachstein M., Meisel E. Amer. J. Clin. Pathol., v. 27, № 1, p. 13—17, 1957.
12. Агроскин Л. С., Папаян Г. В. Цитофотометрия, Л., Наука, 1977.
13. Урбах В. Ю. Математическая статистика для биологов и медиков, М., Изд-во АН СССР, 1963.
14. Вайдо А. И., Ситдинов М. Х. Гепетика, т. 15, № 1, с. 144—146, 1979.
15. Федоров В. К., Ситдинов М. Х. Журн. ВНД, т. 24, в. 2, с. 431—433, 1974.
16. Федоров В. К., Ситдинов М. Х., Ширяева Н. В. Журн. ВНД, т. 22, в. 3, с. 624—627, 1972.
17. Peuzner L. Oligodendrocytes. — In: Handbook of Neurochemistry (ed. A. Lajtha) v. 1, p. 357—395, 1983.
18. Глебов Р. П., Крыжановский Г. Н. Функциональная биохимия синапсов, М., Медицина, 1979.
19. Rossier B. C., Geering K., Kraehenbuhl J. P. Trends Biochem. Sci., v. 12, № 2, p. 483—487, 1987.
20. Ройтбак А. И. — В кн.: Функции нейроглии (под ред. А. И. Ройтбака), с. 205—213, М., Наука, 1987.
21. Соколова Н. Е., Таранова Н. П., Воронина Т. А., Неробкова Л. Н., Маркина Н. В. Нейрохимия, т. 7, № 4, с. 483—492, 1988.
22. Лопатина Н. Г., Пономаренко В. В. — В кн.: Физиология поведения: нейробиологические закономерности, Л., Наука, с. 9—59, 1987.

Поступила 28.IV.1989

Basal Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical Aspects (eds. G. J. Siegel, B. Agranoff, R. W. Alberts, P. Molinoff). Raven Press, New York, USA, 1008p. 1989.

Основы нейрохимии. Молекулярные, клеточные и медицинские аспекты. IV издание.

Четвертое издание «Основ нейрохимии» существенно переработано и расширено с учетом феноменального развития нейробиологии за последние годы. Более половины из 48 глав нового издания, в том числе и раздел по молекулярной нейробиологии, впервые включены в его состав. Остальные главы, существенно отредактированные для четвертого издания, включают современные концепции относительно функций мозга, поведения и нервно-психических заболеваний, выдвинутые на основе новых данных молекулярной генетики, биохимии мембран и органелл, полученных на мозгу человека с использованием методик, не нарушающих целостности этого органа.

Новое в четвертом издании:

- появился раздел, посвященный молекулярной нейробиологии, включая экспрессию генов в НС, и генетические тесты на наследственные заболевания НС;
- главы, посвященные дискуссиям о молекулярном строении и механизмах мембранных каналов, рецепторах нейротрансмиттеров, активируемом рецепторами обмена фосфоинозитидов, G-белках, циклических нуклеотидах и фосфорилировании в регуляции передачи нервного сигнала;
- обзор молекулярной структуры и динамики цитоскелета клеток и биохимических изменений, наблюдающихся при развитии, регенерации и старении мозга;
- расширение знаний в области медицинской нейрохимии, включая новейшие концепции по патологии мозга при ишемии, гипоксии, энцефалопатии, коме, наследственных дефектах ферментов, нарушениях питания и метаболизма и дегенеративных изменениях мозга.

Книга предназначена для специалистов всех направлений нейро-наук.



УДК 577.164.11:577.112

ИЗУЧЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА И НЕБЕЛКОВЫХ КОМПОНЕНТОВ ТИАМИНСВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА СИНАПТОСОМ МОЗГА КРЫС

ПОСТОЕНКО В. А., ПАРХОМЕНКО Ю. М., ДОНЧЕНКО Г. В.

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

Исследован аминокислотный состав и содержание небелковых компонентов тиаминасвязывающего белка (ТСБ) синапсом мозга крыс. Показано, что белок является гликопротеином, его тиаминасвязывающая активность зависит от фосфолипидного окружения. Проведено исследование аминокислотного состава ТСБ. Отмечено высокое содержание остатков метионина и моноаминодикарбоновых аминокислот, характерных для структуры подобных белков, выделенных из других источников.

На основании полученных данных высказывается предположение о мембранной локализации ТСБ.

В настоящее время доказано, что процессы мембранного переноса большинства витаминов и коферментов, равно как и реализация их функций в специализированных клетках и клеточных структурах опосредованы специфическими белками [1].

Имеющаяся в литературе информация о тиаминасвязывающих белках касается главным образом клеток микроорганизмов [1]. Хорошо изучены и описаны ТСБ, выделенные из белка куриного яйца [2] и рисовых отрубей [3]. Сведения же о таких белках из тканей млекопитающих весьма ограничены и носят предварительный характер [1]. Не составляют исключения и ТСБ возбудимых клеток, которые в настоящее время привлекают особое внимание исследователей в связи с расшифровкой молекулярного механизма нейротропного эффекта тиамина [1, 4—6].

Ранее методом аффинной хроматографии нами впервые был выделен гомогенный препарат ТСБ из синапсом головного мозга крыс и изучен характер его специфического взаимодействия с тиамином и его фосфатами [7—9]. Показано, что белок имеет два участка связывания тиамина с K_d 3,1 мкМ и K_d 30 мкМ [8]. На основании полученных экспериментальных данных было высказано предположение о том, что ТСБ является интегральным белком синаптических мембран и играет определенную роль в реализации нейротропной функции тиамина.

Целью настоящей работы являются исследования некоторых фи-

зико-химических особенностей структурной организации ТСБ и их возможного значения для функционирования выделенного нами белка.

Материалы и методы

В работе использовали электрофоретически гомогенный препарат ТСБ, выделенный из синапсом мозга крыс методами аффинной хроматографии и гель-фильтрации на сефадексе G-200 [7]. Специфическое связывание [14 C] тиамина с белком определяли по методу, описанному нами ранее [7]. Препарацию ТСБ в присутствии нейраминидазы (100 мкг/мг белка), фосфолиаз A_2 (270 мкг/мг белка), С (360 мкг/мг белка), Д (540 мкг/мг белка) проводили в течение 30 мин при 37°. По истечении этого времени в среду инкубации добавляли меченый лиганд для измерения тиаминсвязывающей активности обработанного ферментами белка.

Аминокислотный состав гидролизата ТСБ определяли на анализаторе ААА-881 «Microtechna» (ЧССР). ТСБ гидролизовали в 6 н. HCl 24 ч. После гидролиза ионы хлора удаляли в эвекторе над щелочью. Триптофан определяли спектрофотометрически [10].

Суммарную фракцию фосфолипидов мозга крыс получали экстракцией метанол-хлороформной смесью [11] с последующей кристаллизацией в ацетоне на холоде [12].

Белки синаптических мембран мозга крыс, связывающие тиамин, идентифицировали методом электрофореза с DDS-Na. Данная методическая часть работы экспериментально подобрана нами. Испытывались различные концентрации DDS-Na, β -меркаптоэтанола, pH среды. Связывание белков синаптических мембран с [14 C] тиамином проводили до и после их обработки DDS-Na и β -меркаптоэтанолом. Для выявления специфического связывания ставились контрольные пробы: с 100-кратным избытком немеченого лиганда; с кипяченым белком; с БСА, обработанным DDS-Na.

Белки синаптических мембран мозга крыс солибилизировали в 0,05 М трис-HCl буфере, pH 8,3, содержащем 1% β -Cl-Na и 1% β -меркаптоэтанол. Затем в инкубационную смесь добавляли [14 C] тиамин (50 мкМ) и инкубировали 30 мин при 37°. Несвязавшуюся метку отделяли центрифугированием на микроколонках с сефадексом G-50 [13]. Полученный образец белков синаптических мембран, связанных с [14 C] тиамином, наносили на ПААГ (градиент от 5 до 20%, 40 мкЛ, 100 мкг белка). Параллельно с этими пробами наносили на гель и белки-маркеры. Электрофорез проводили в трис-боратной буферной системе [14]. По окончании электрофореза несколько полос геля с белками мембран и белками-маркерами окрашивали. Оставшиеся полоски геля с белками синаптических мембран разрезали по 0,5 см. Каждый полусантиметровый фрагмент геля растворяли в 30% растворе перекиси водорода с 1% NH_4OH при 65° в течение 5—6 ч и далее просчитывали радиоактивность в ЖС-103 на жидкостном сцинтилляционном счетчике SL-20 «Intertechnique» (Франция). Затем строили график профиля тиаминсвязывающей активности белков синаптических мембран мозга крыс. Величину M определяли по электрофоретической подвижности.

Нейтральные углеводы и фосфолипиды, входящие в состав ТСБ, определяли методами Seifter [16] и Васьковского [17].

Белок определяли по Bradford [13].

В работе использовали реактив: [тиазол-2-¹⁴C]тиамин фирмы "Amersham" (Англия) с удельной радиоактивностью 24 мКи/ммоль; нейраминидаза фирмы "P-L Biochemicals" (Швеция); фосфолипаза А₂, выделенная из яда пчелы, (N.A. 200 ед/мг белка), С—из *Bacillus cereus* (У.А. 100 ед/мг белка), Д—из *Streptomyces cinnamonensis*; миозин, β -галактозидаза, фосфорилаза В, БСА, овальбумин, карбоангидраза ("Sigma", США).

Результаты и обсуждение

В настоящее время в литературе накоплено достаточно сведений о том, что многие синапсомные белки, рецепторы гормонов, нейромедиаторов и нейропептидов являются сложными макромолекулами, содержащими в своем составе углеводные и липидные компоненты [19, 20].

Для выявления небелковых компонентов в функциональной единице ТСБ использовали методы специфического ферментативного гидролиза.

Согласно представленным данным (табл. 1), предварительная

Таблица 1

Влияние фосфолипаз и нейраминидазы на связывание [¹⁴C] тиамин
тиаминсвязывающего белка (n=4)

Воздействие	Специфическое связывание	
	нм/мин 5 мкг белка	%
Нативный белок	2448.3 ± 152.7	100
Фосфолипаза А ₂	1885.3 ± 104.5*	77.0
Фосфолипаза С	2036.0 ± 39.9	85.2
Фосфолипаза Д	1918.3 ± 49.6*	79.6
Нейраминидаза	4526.0 ± 242.3*	188.0

Примечание. *p < 0.05.

обработка ТСБ фосфолипазами А₂, С и Д вызывает определенное снижение (в среднем на 20%) тиаминсвязывающей активности белка. Количественное определение фосфолипидов в липидном экстракте ТСБ позволяет обнаружить в его составе лишь следы фосфатидилхолина (≤ 0.002 моль на 1 моль белка). На основании этих данных делается вывод, что фосфолипиды не входят в заметном количестве в состав структуры изолированного нами гомогенного ТСБ.

Однако, предполагая мембранную локализацию ТСБ, мы исследовали возможность влияния экзогенных фосфолипидов на тиаминсвязывающую активность белка. Как следует из табл. 2, преникубация препарата ТСБ с фосфолипидами мозга крыс (в течение 30 мин при 37° в соотношении 1, 2 и 4 моль фосфолипидов на 1 моль ТСБ) приводит к значительному повышению тиаминсвязывающей активности белка (особенно в соотношении 2 моль фосфолипидов на 1 моль белка).

По-видимому, фосфолипидное окружение участвует в формировании активного белкового центра акцепции тиамин. Предварительная обработка ТСБ нейраминидазой (табл. 1) приводит к увеличению его тиаминсвязывающей активности на 88,9%. Этот факт по-

воляет предположить наличие углеводного компонента в составе ТСБ, что подтвердилось результатами количественного анализа. В изолированном нами ТСБ обнаружено $5,90 \pm 0,36\%$ остатков нейтральных углеводов. Приведенные экспериментальные данные гово-

Таблица 2

Влияние фосфолипидов мозга крысы на связывание [14 C]тиамина тиаминасвязывающего белка ($n=3$)

Концентрация фосфолипидов, в моль на 1 моль ТСБ	Специфическое связывание [14 C] тиамина	
	на 1 мин 4мкг белка	%
Контроль	2161,0 $\pm$ 193	100
1:1	2672,5 $\pm$ 153*	123,7
2:1	4855,0 $\pm$ 315*	224,7
4:1	3376,4 $\pm$ 221*	156,3

Примечание. * $p < 0,05$.

рят о том, что выделенный ТСБ из синапсом мозга крысы является гликопротеином. Однако не исключена возможность, что функционально активной формой ТСБ *in vivo* является гликолипопротеин. Роль углеводных остатков для проявления функции гликопротеинов окончательно не установлена. Исходя из факта о повышении тиаминасвязывающей активности белка после его обработки нейрамини-

Таблица 3

Аминокислотный состав тиаминасвязывающего белка

Аминокислота	Количество остатков	Аминокислота	Количество остатков
Лизин	50	Аланин	60
Гистидин	10	1,2-Пистин*	7
Аргинин	33	Валин	34
Аспарагиновая кислота		Изолейцин	21
Аспаратин	103	Лейцин	65
Треонин	41	Метионин*	25
Серин	66	Тирозин	21
Глутаминовая кислота*		Фенилаланин	31
Глутамин	117	Триптофан*	12
Пролин	45		
Глицин	16	Всего	850

Примечание. * Определено полуколичественным методом.

** данные получены спектрофотометрическим определением.

дазой, можно предположить, что углеводы не входят в состав тиаминасвязывающих участков белка. Обработка нейраминидазой препарата ТСБ приводит, возможно, к высвобождению дополнительных тиаминасвязывающих группировок белка. По-видимому, углеводы маскируют эти участки, осуществляя таким образом регуляцию связывания тиамина белком. Эти результаты дают основание предполагать роль карбоксильных и амидных групп моноаминодикарбоновых кислот и их амидов во взаимодействии тиамина с белком [21], так как эти группы преобладают в структуре изучаемого ТСБ (табл. 3), и именно они играют решающую роль в связывании сигналовых кислот белками [22].

С целью выяснения особенностей структуры ТСБ изучали его аминокислотный состав (табл. 3). Прежде всего, обращает на себя внимание большое количество в составе белка моноаминодикарбоновых аминокислот и метионина. Преобладание моноаминодикарбоновых аминокислот подтверждается и ИЭТ, определенной нами ранее при pH 4,8—5,0 [8]. Из изолированных на сегодняшний день ТСБ аминокислотный состав описан для белков из трех объектов: молочнокислых бактерий [23], дрожжей [21], эритроцитов крови [24].

Наряду с различием в величине M_r и количественном соотношении отдельных аминокислот можно отметить и некоторое сходство в структуре описанных ранее и изолированного нами впервые из синапсом мозга крыс ТСБ, а именно, содержание большого количества моноаминодикарбоновых и серусодержащих аминокислот. По данным японских исследователей, изучавших ТСБ, выделенный из дрожжей, остатки кислых аминокислот играют существенную роль в связывании тиамина белком [22]. Они предполагают, что четвертичный атом тиазольного цикла тиамина (положительно заряженный) взаимодействует с отрицательно заряженными группировками на белке (COOH-группы глутаминовой и аспарагиновой кислот).

Кроме установленных фактов активации экзогенными фосфолипидами тиаминасвязывающей активности белка, наличия в его составе углеводных остатков и значительного количества гидрофобных аминокислот ранее нами получен еще ряд косвенных доказательств мембранного происхождения белка: значения K_d и сродство тиаминофосфатов идентичны как для препаратов изолированного из синапсом ТСБ, так и для тиаминасвязывающих участков белой природы синаптических мембран [7, 8, 24].

Однако изучение мембранной локализации выделенного ТСБ является предметом отдельных исследований и представляется важным для оценки функциональной роли белка.

Полученные данные свидетельствуют о сложности структуры изолированного белка и о несомненной регуляторной роли фосфолипидов и сигналов кислот во взаимодействии тиамина с ТСБ синапсом мозга крыс.

STUDY OF AMINOACID COMPOSITION AND NON-PROTEIN COMPONENTS OF THIAMINE-BINDING PROTEIN IN RAT BRAIN SYNAPTOSOMES

POSTOENKO V. A., PARKHOMENKO YU. M., DONCHENKO O. V.

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

The aminoacid composition of thiamine binding protein (TBR) has been studied in synaptosomes of rat brain alongside with its non-protein components. This protein belongs to glycoproteins and its thiamine-binding capacity depends on the phospholipid environment. The aminoacid composition of TBR was examined. High content of residues of methionine and monoaminodicarboxylic aminoacids, characteristic of such proteins isolated from other sources was detected. On the basis of the data obtained we propose that TBR is located in the membrane.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Халмурадов А. Г., Тоцкий В. Н., Чаговец Р. В. — В кн.: Мембранный транспорт коферментных витаминов и коферментов, с. 16—60, Киев, Наукова думка, 1982.
2. Mamiyama K., Adiga P. R. *Biochem. J.*, v. 193, p. 679—685, 1981.
3. Nishimura H., Uechara Y., Sempaku K., Iwashima A. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, v. 30, p. 1—10, 1984.
4. Kimura M., Itokawa Y. *J. Chromatogr.*, v. 211, № 2, p. 290—291, 1981.
5. Takenaka T., Yoshioka T., Inoue H. *Proc. Japan. Acad. B*, v. 54, p. 316—320, 1978.
6. Iwata H. *Vitamin (Загл.)*, v. 50, № 1, p. 1—12, 1976.
7. Постоенко В. А., Пархоменко Ю. М., Вовк А. П., Халмурадов А. Г., Донченко Г. В. *Биохимия*, т. 52, с. 1792—1797, 1987.
8. Постоенко В. А., Пархоменко Ю. М., Донченко Г. В. *Укр. биохим. журн.*, т. 59, № 6, с. 9—14, 1987.
9. Постоенко В. А. — В сб.: *Укр. биохим. съезд*, т. 2, с. 167—168, Киев, Наукова думка, 1987.
10. Демченко А. П. *Ультрафиолетовая спектрофотометрия и структура белков*, Киев, Наукова думка, 1981.
11. Folch J., Lees M., Sloan Stanley G. H. *J. Biol. Chem.*, v. 226, p. 497—511, 1957.
12. Small D. M., Bourges M. C., Derwichian D. G. *Biochim. Biophys. acta*, v. 125, p. 563—560, 1966.
13. Nishimura H., Yoshioka K., Iwashima A. *Anal. Biochem.*, v. 139, p. 373—376, 1984.
14. Кавецкий Р. Е., Казьмин С. Д. *Докл. АН СССР*, т. 230, № 1, с. 223—226, 1976.
15. Abita J., Chicheportiere R., Schweitz H., Lazdunski M. *Biochemistry*, v. 16, p. 1838—1844, 1977.
16. Seifter S., Dayton S., Novic B., Muntwyler E. *Arch. Biochem. and Biophys.*, v. 25, p. 191—200, 1950.
17. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Y., Vasantin I. M. *J. chromatogr.*, v. 114, № 1, p. 129—141, 1975.
18. Bradford M. *Anal. Biochem.*, v. 72, p. 248—254, 1976.
19. Глебов Р. Н., Крыжановский Г. П. *Функциональная биохимия синапсов*, М., Медицина, 1978.
20. Henryk M. *Handbook Neurochem. N. Y. London, Plenum Press*, v. 7, p. 111—134, 1984.
21. Henderson G. B., Zevety E. M., Kander R. J., Huennkens F. M. *J. Supramol. Struct.*, v. 6, № 2, p. 231—247, 1977.
22. Iwashima A., Nishimura H., Nishino H. *Vitamin*, v. 58, № 12, p. 577—588, 1974.
23. Аверин В. А. *Транспорт тиамина через биохимические мембраны*, Автореф. канд. дис., Вильнюс, Ин-т биохимии АН Литовской ССР, 1983.
24. Пархоменко Ю. М., Черныш Ю. П., Протасова З. С., Постоенко В. А. *Укр. биохим. съезд*, Киев, Наук. Думка, т. 1, с. 120—121, 1987.

Поступила 25.XII.1989

Опознавание углеводов в функции клеток.

В сборнике рассматривается роль углеводов в коммуникациях между отдельными клетками многоклеточных организмов. Обсуждаются термодинамика и пространственные ограничения во взаимоотношениях между олигосахаридами и белками. Дается анализ аминокислотных последовательностей, необходимый для опознавания углеводов и описывается использование согласованной последовательности для идентификации потенциальных углеводсвязывающих белков. Рассматриваются процессы распознавания в нервной клетке, медируемые непосредственно изолированными ганглиозидами и галактозидами, активирование специфическими ганглиозидами локализованной на мембране протенинказы в клетках нейробластомы, приводящее к запуску фосфорилирования некоторых белков клеточной оболочки, опознавание сигналами нейронами и ганглиями заднего корешка спинного мозга определенных олигосахаридов. Весьма интересна работа, посвященная выяснению роли олигосахаридов в модификации функции белка. Потенциальными читателями книги могут быть специалисты в области биохимии, нейробиологии, молекулярной и клеточной биологии и биотехнологии.

Central Cholinergic Synaptic Transmission (eds. M. Frotscher, U. Misgeld), Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland, 300 p., 1989.

Центральная холинергическая синаптическая передача.

В книге раскрываются междисциплинарные подходы к изучению холинергических синапсов в ЦНС млекопитающих. Книга предоставляет возможность ознакомиться с морфологией холинергических нейронов, их топографией и синапсами. Затем приводятся сведения о вызванном ацетилхолином постсинаптическом потенциале и изменениях в проводимости. В следующей главе обсуждаются типы центральных холинергических рецепторов и их модуляция. Последняя глава посвящена роли ацетилхолина в пластичности ЦНС. Книга обобщает последние достижения по расшифровке механизмов центральной передачи в холинергических синапсах с использованием приемов молекулярной биологии, иммуноцитохимии и других дисциплин.



АКТИВНОСТЬ СИНАПТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНОСВЯЗАННОЙ АХЭ В НОРМЕ И В УСЛОВИЯХ РАННЕЙ БИНОКУЛЯРНОЙ ДЕПРИВАЦИИ КРОЛИКА

ОРЛОВА Е. И.

НИИ мозга ВНИЦ психического здоровья АМН СССР, Москва

На фракциях синапсом (С и D) и субфракциях синапсомных мембран (C₂, C₄, C₆ и D₂, D₄, D₆ соответственно) зрительной, соматоторной и слуховой областей коры мозга кролика изучена активность АХЭ у животных, выросших в условиях нормального светового режима (норма) и 2,5-месячной ранней бинокулярной депривации. В норме АХЭ выявлена во всех мембранных субфракциях, но распределение ее активности в них в пределах каждой области очень неравномерно. Предполагается, что в субфракции объединяются мембраны синапсов, имеющих общее происхождение или локализацию на нейроне. Зрительная депривация, активируя АХЭ во фракциях синапсом, не влияет на состояние мембраносвязанной АХЭ зрительной области, что не согласуется с данными литературы о глубине воздействия депривации на проекционные нейроны. Делается вывод, что АХ не является медиатором синапсов проекционных зрительных нейронов.

Поиск медиаторного обеспечения передачи зрительных импульсов активно разрабатывается в современной нейробиологии. С этой целью часто используется модель ранней зрительной депривации, поскольку позволяет блокировать определенное морфо-функциональное звено анализатора—передачу сенсорных сигналов на проекционные нейроны. Морфологические и физиологические эксперименты показывают, что при бинокулярной депривации (конка) афферентные связи нейронов полей 17 и 18 страдают очень значительно [1, 2].

Данные о состоянии АХ-системы в мозгу животных (кролик, крыса), подвергнутых бинокулярной депривации разноречивы. В большинстве исследований, проведенных на фракционном материале зрительной коры депривированных животных—фракциях нейропила [3], неочищенных митохондрий и синапсом [4], не обнаружено различий в активности АХЭ по сравнению с нормой на сроках завершения постнатального онтогенеза. Изменения в активности холинэстеразы (ХАТ) или отсутствуют [5], или незначительны, в пределах 15–20% [3], как и изменения в количестве связанного с мускариновыми холинорецепторами лиганда [6]. Незначительность изменений не коррелировала с глубиной депривации; некоторые авторы пришли к выводу, что выращивание животных в темно-

те не влияет на обмен АХ и свойства М-холинорецепторов [3, 5, 6]. Однако в других публикациях снижение активности АХЭ в пределах 30% во фракции синапсом поля 17 и в нейрониле (гистохимическое исследование) слоев III, IV, V поля 17 мозга кроликов рассматривается как свидетельство важной роли холинергических механизмов в осуществлении зрительного акта [7].

Учитывая разноречивость литературных данных, а также сведения о возможном специфическом подавлении активности синаптической АХЭ, мы сочли целесообразным исследовать этот фермент в субфракциях синапсомных мембран. Известно, что только мембраносвязанная АХЭ участвует в первичной передаче [8] и, следовательно, прямо должна отражать недоразвитие этой медиаторной системы, если АХ является медиатором проекционных нейронов или их афферентов.

Материалы и методы

В работе использовали мозг 69 кроликов. Для эксперимента требовалось 1,2—1,5 г сырого веса ткани, поэтому мозг 2—3 животных объединялся. Субфракции синапсомных мембран изолировали раздельно из фракций легких (субфракции С₂, С₃, С₄) и тяжелых (D₂, D₃, D₄) синапсом в градиенте плотности сахарозы модифицированным методом, описанным ранее [9]. Субфракции С₂ и D₂ сконцентрированы на границе слоев 0,6—0,8 М сахарозы, субфракции С₃ и D₃—0,8—1,0 М, С₄ и D₄—1,0—1,2 М сахарозы. Чистота мембранных субфракций установлена с помощью биохимического и электронномикроскопического контроля [9, 10]. Исследованы субфракции синапсомных мембран зрительной, сенсомоторной и слуховой областей коры больших полушарий в двух экспериментальных группах животных—выращенных в условиях нормального светового режима (11—15-недельные кролики) и в условиях зрительной депривации (кроликов содержали в темновой камере с 5—7-дневного возраста до прозревания (до 10—11 недель жизни). Спектрофотометрически определяли активность АХЭ [11], а также содержание белка по Lowry. Достоверность оценивали по t-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

В норме в зрительной, сенсомоторной и слуховой областях во фракциях легких синапсом С величина У. А. АХЭ значительно (в 1,6—2 раза) превосходит таковую во фракциях тяжелых синапсом D, что неоднократно было показано ранее [4, 12]. Неоднородность по этому показателю еще более выражена при послышном сравнении субфракций синапсомных мембран (табл. 1). Максимальная активность АХЭ наблюдается в С₂, средняя—в D₂ и С₃, минимальная—в D₃, С₄, D₄, более чем в 3 раза различаясь в своих крайних значениях. Таким образом, субфракции синапсомных мембран весьма неравнозначны по активности АХЭ, и это в одинаковой мере относится к любой из исследованных областей.

В гистохимических (АХЭ-реакция) и иммуногистохимических (ХАТ-реакция) исследованиях показано неравномерное распределение холинергических терминалей по цитоархитектоническим слоям коры мозга млекопитающих [13—15]. Напоминалась аналогия, что неодинаковая У. А. АХЭ в наших субфракциях отражает цитоархитектонику АХ-окончаний, однако это, по-видимому, не так. Во-первых,

последующее распределение АХ-ергичных окончаний в разных областях неодинаково [13, 15]. Во-вторых, недавно получены доказательства, что селенность ХАТ-содержащих терминалей в областях новой коры обеспечивают нейроны крупноклеточных базальных ядер переднего мозга [15]. Показано также, что практически все (99%) ХАТ-позитивные окончания являются симметричными и располагаются они преимущественно на тонких веточках дендритов и аксонов [13].

Таблица 1

Величина Σ АХЭ по фракциях синапсом и субфракциям синапсомных мембран различных областей коры мозга кролика в норме (мкмоль АХ/мг белка-ч)

Фракция	Σ м	P_{C_1}	P_{C_2}	P_{D_2}	P_{D_3}
I	C	4.08 ± 0.35 (14)			0.01
	C ₂	15.66 ± 1.25 (14)			
	C ₃	8.38 ± 0.91 (14)	0.01		
	C ₄	5.18 ± 0.61 (14)	0.01	0.01	
	D	2.07 ± 0.24 (13)			
	D ₂	10.75 ± 1.36 (15)	0.02		
	D ₃	6.20 ± 0.70 (14)	0.01		0.02
	D ₄	1.40 ± 0.60 (12)	0.01	0.01	0.01
II	C	2.18 ± 0.78 (7)			0.05
	C ₂	11.00 ± 1.13 (8)			
	C ₃	6.00 ± 0.39 (7)	0.01		
	C ₄	3.94 ± 0.36 (7)	0.01	0.01	
	D	1.95 ± 0.49 (9)			
	D ₂	7.42 ± 1.10 (8)	0.05		
	D ₃	4.33 ± 0.56 (7)	0.01	0.05	0.05
	D ₄	3.76 ± 0.57 (9)	0.01	0.01	0.01
III	C	4.77 ± 0.51 (5)			0.01
	C ₂	13.33 ± 1.49 (5)			
	C ₃	7.41 ± 0.80 (5)	0.01		
	C ₄	1.48 ± 0.32 (4)	0.01	0.01	
	D	2.35 ± 0.51 (5)			
	D ₂	8.08 ± 1.09 (4)	0.05		
	D ₃	5.70 ± 0.66 (4)	0.01		
	D ₄	4.77 (1)			

Примечание. I, II, III—зрительная, сенсомоторная, слуховая области соответственно. В скобках обозначено количество опытов. P_{C_i} —вероятность по распределению Стьюдента по отношению к соответствующей фракции. В сетку внесены и проставлены значения вероятностей только в случае достоверных различий. Обозначения фракций см. в тексте.

Эти данные указывают на большую вероятность морфологической идентичности синапсов нейронов базальных ядер и концентрации их мембран не в разных, а в какой-то одной субфракции. Учитывая, что дендритные окончания этих нейронов составляют большую часть АХ-ергичных окончаний коры [15, 16], можно предположить, что это субфракция C₂, обогащенная АХЭ-содержащими синаптическими мембранами.

Общность происхождения холинергичных компонентов новой коры—нейронов базальных ганглиев и собственных нейронов [13, 16]—обеспечивает, по-видимому, сходство между областями в распределении фермента по мембранным субфракциям. Вместе с тем возможно, что

одинаковый набор ХАТ-терминалей в областях коры [13, 15] определяет одинаковое количество мембранных субфракций, а сходство их плотностных характеристик [15] — близкие количественные соотношения. Вероятность локализации АХЭ на синапсах других модальностей дополняет общую картину, так как их происхождение для всех областей новой коры также едино [16].

Таким образом, результаты, полученные нами в норме, позволяют предполагать, что субфракции объединяют мембраны синапсов, имеющих общее происхождение и клеточную локализацию.

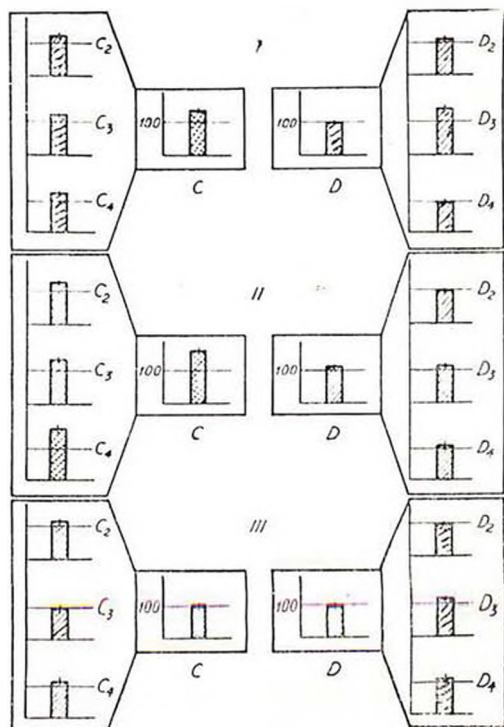


Рис. 5. А. АХЭ во фракциях синапсом и субфракциях синапсомных мембран в условиях зрительной депривации. Величины выражены в процентах по отношению к норме, принятой за 100%. I—зрительная область (12—13 опытов), II—сенсомоторная (9—12 опытов), III—слуховая (6 опытов). Зантрихованные в клетку столбики показывают достоверные отклонения от нормы

В условиях зрительной депривации величина У. А. АХЭ нарастает во фракциях легких синапсом С и в зрительной, и в сенсомоторной областях—на 30 и 60% соответственно (рисунок). На уровне синапсомных мембран изменения наблюдаются только в сенсомоторной области—в субфракции С₄ активность фермента нарастает на 59%, не отличаясь от контрольных значений в остальных суб-

фракциях. При этом содержание белка во фракциях и субфракциях достоверно не изменяется. Активацию АХЭ во фракции С в аналогичном эксперименте наблюдали и ранее [12].

Итак, по нашим данным, зрительная депривация не влияет на активность АХЭ синапсомембранных зрительной области, а изменения в активности мембраносвязанной АХЭ, наблюдаемые в субфракции С₄ сенсомоторной коры, в целом для области оказываются очень незначительными, так как последняя составляет всего 10% от общей активности мембраносвязанного фермента (табл. 2).

Тем не менее во фракциях синапсомембранной зрительной и сенсомоторной областей коры мозга депривированных животных нами обнаружена достоверно более высокая величина У. А. АХЭ, чем у контрольных. Ни в той ни в другой области это не может быть обусловлено только мембраносвязанной АХЭ. Активность фермента в субфракциях С₂, С₃, С₄, по нашим данным, составляет 22, 17, 15% соответственно от суммарной его активности во фракции С [10]. Даже с учетом недостоверных изменений общий эффект возрастания активности АХЭ в указанных субфракциях на 26, 11, 18% в зрительной области и на 22, 29, 59% в сенсомоторной (рисунки) не превышает, на уровне синапсомембраны 11 и 19% в соответствующих областях. Поэтому мы предполагаем, что нарастание величины У. А. АХЭ в синапсомембранах может происходить за счет водорастворимых форм фермента, на долю которых приходится 35% от суммарной активности синапсомембранной АХЭ [10].

Таблица 2

Общая активность АХЭ в субфракциях синапсомембранных сенсомоторной области коры мозга кролика в норме (мкмоль АХГ/ткань·ч)

Фракция	$M \pm m$	% распределения
C ₂	5.28 ± 0.62	38
C ₃	2.34 ± 0.28	17
C ₄	1.42 ± 0.34	10
D ₂	2.30 ± 0.45	16
D ₃	1.30 ± 0.19	9
D ₄	1.35 ± 0.20	10
Σ	13.99	100

Примечание. Обозначения и количество опытов те же, что и в табл. 1.

Могут ли полученные данные свидетельствовать о присутствии АХ в синапсах проекционных нейронов в качестве медиатора? По данным литературы, при зрительной (бинокулярной) депривации у 2-месячных кроликов выявлены признаки морфологической незрелости в большинстве синаптических контактов поля 17 как по строению активных зон [17], так и по количеству синаптических пузырьков [18]. Практически отсутствует функциональная специализация (селективность) нейронов полей 17 и 18 (кошка, 2,5 месяца депривации) и значительно снижена их электрофизиологическая активность [2, 19, 20]. Сравнительные данные в этих и других работах свидетельствуют, что морфологическое строение синапсов и физиологические характеристики нейронов полей 17 и 18 у депривированных животных к 2—2,5 месячной жизни соответствуют уровню нервов 3—7 дней (до созревания) нормального постнатального онтогенеза.

В свою очередь в исследованиях активности АХЭ на разных сроках онтогенеза показано, что в коре больших полушарий мозга млекопитающих (мышь, крыса, кролик) активность фермента на 7-й день постнатального развития не превышает 20% таковой у взрослого животного [21, 22]. Если бы АХ отражал эргичность синапсов проекционных нейронов, то в соответствии с данными приведенной литературы следовало ожидать заметного снижения активности АХЭ в каких-либо субфракциях синаптических мембран зрительной коры депривированных кроликов по отношению к контрольным. Подобная задержка возрастного развития—на уровне первых дней постнатального онтогенеза—выявляется в системе нидолалякклиаминов в обогащенных нервными окончаниями фракциях зрительной коры мозга зрительно депривированных крыс и кроликов [5, 23]. При этом существенно, что аналогичные изменения в двигательной или «остальной» коре менее выражены.

Таким образом, полученные нами данные в совокупности с известными из литературы позволяют заключить, что зрительная депривация не задерживает формирование АХЭ на ранней стадии онтогенеза. Это в свою очередь позволяет нам утверждать, что АХ не является медиатором ни зрительных афферентов, ни корковых проекционных нейронов, по крайней мере мономодальных. Результаты настоящей работы подтверждают вывод, сделанный большинством исследователей, изучавших обмен АХ в мозгу депривированных животных [3, 5, 6], и хорошо согласуются со сведениями о неравномерном распределении плотности ХАТ-позитивных волокон и терминалей исключительно за счет отростков из базального переднего мозга [15]. Скопление ХАТ/АХЭ-позитивных волокон и мускариновых мест связывания в слоях основного сосредоточения проекционных зрительных нейронов (7, 13), по-видимому, связано с непроекционной функцией АХ-системы коры, включая волокна нейронов базальных ядер, в работе зрительного анализатора [14, 24, 25].

MEMBRANE-BOUND SYNAPTIC ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY FROM NORMAL AND DARK-REARED RABBITS

ORLOVA E. I.

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

Two and a half months old normal or dark-reared rabbits were used in the present study. AChE activity from synaptosome fractions (C and D) and synaptosome membrane subfractions (C₂, C₃, C₄ and D₂, D₃, D₄, respectively) of visual, motor and auditory cortical areas were studied in both experimental groups. AChE was present in all membrane fractions of normal rabbits but the fraction distribution was very non-uniform in every area. It appears, that synaptic membranes of common origin and similar neuronal localization are present in every subfraction. Visual deprivation does not affect the membrane-bound AChE activity in the material from the visual cortex. This discrepancy with the literature, which describes a dramatic effect of visual deprivation on projective neurons allows us to conclude that acetylcholine is not the transmitter of projective visual neuron synapses.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Blakemore C., Van Slueters R. C. J. of physiol.*, v. 248, p. 663—716, 1975.
2. *Michalski A., Kossut M., Chmielewska J., Turlejski K. Acta neurobiol. exp.*, v. 44, № 1, p. 1—15, 1984.
3. *Sinha A. K., Rose S. P. R. J. Neurochem.*, v. 27, № 4, p. 921—926, 1976.
4. Доведова Е. Л. Журн. высш. нервн. деят., т. 27, в. 2, с. 306—313, 1977.
5. *Biesold D., Bigl V., Uzbekov M. Activitas Nervosa Superior*, v. 19, № 2, p. 154—156, 1977.
6. Бисольд Д., Шлабс Р., Ротс Т., Аурих М., Унгеауттер Э., Бигл В. Нейрофизиология, т. 16, № 5, с. 691—701, 1984.
7. Доведова Е. Л., Бусенок М. М. — В кн.: Структурно-функциональные основы организации мозга. М., вып. 7, с. 117—121, 1978.
8. *Koelle G. B. I. Pharmacol.*, v. 120, p. 488—503, 1957.
9. Боголенов Н. Н., Доведова Е. Л., Орлова Е. Н., Яковлева Н. Н. Архив анатомии, т. 89, № 11, с. 88—93, 1985.
10. Орлова Е. Н., Доведова Е. Л. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 90, № 10, с. 427—429, 1980.
11. *Hestrin S. J. Biol. Chem.*, v. 180, № 1, p. 249—261, 1949.
12. Доведова Е. Л. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 86, № 9, с. 424—426, 1978.
13. *Parnavelas J. G., Kelly W., Franke E., Eckenstein F. J. Neurocytol.*, v. 15, № 3, p. 329—336, 1986.
14. *Rear M. F., Caines K. M., Ebner F. F. J. Comp. Neurol.*, v. 237, № 4, p. 513—532, 1981.
15. *Eckenstein F. J., Baughman R. W., Quinn J. Neuroscience*, v. 25, № 2, p. 457—474, 1988.
16. *Mesulam M. M., Mufson E. J., Levey A. L., Wainer B. H. J. Comp. Neurol.*, v. 214, p. 170—197, 1983.
17. *Müller L., Pattiselanno A., Vrensen G. Brain Res.*, v. 205, № 1, p. 39—48, 1981.
18. *Vrensen G., de Groot D. Brain Res.*, v. 78, № 2, p. 263—278, 1974.
19. *Blakemore C., Price D. J. J. Physiol.*, v. 384, p. 393—399, 1987.
20. *Milleret C., Gary-Bobo E., Buisseret P. Exp. Brain Res.*, v. 71, № 1, p. 8—20, 1988.
21. Григорьева О. Н., Гусель В. А. Журн. эволюц. биохимии и физиологии, т. 17, № 1, с. 87—93, 1981.
22. *Hübmann C. F., Ebner F. F. Dev. Brain Res.*, v. 23, p. 225—241, 1985.
23. Узбеков М. Г., Мурфи Ш., Роуз С. П. Г., Пизарева З. Д. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 91, в. 4, с. 389—391, 1981.
4. *Sato H., Hat: Y., Haghara K., Tsumoto T. J. Neurophysiol.*, v. 58, № 4, p. 781—794, 1987.
25. *Sillito A. M., Kemp J. A. Brain Res.*, v. 289, p. 113—155, 1983.

Поступила 9.XI.1989



УДК 576.311.347.2/3:612.6

МЕМБРАННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ДЫХАНИЯ МИТОХОНДРИЙ И ГИДРОЛИЗА АТФ В ГОМОГЕНАТАХ МОЗГА КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА

ЛЕМІШКО В. В., СТРЕЛЯНИЙ С. М.

Харьковский государственный университет им. А. М. Горького

Исследовали функциональное состояние митохондрий мозга 1-, 3-, 12- и 24-месячных крыс непосредственно в гомогенатах ткани. Установлено, что с возрастом практически не изменяются интенсивность дыхания и степень его сопряжения с окислительным фосфорилированием, величина коэффициентов регуляции дыхания олигомицином и 2,4-динитрофенолом (ДНФ), скорость гидролиза АТФ гомогенатами в различных условиях инкубации — с Mg^{2+} и без Mg^{2+} , с ДНФ и без ДНФ, с Ca^{2+} и без Ca^{2+} . Полученные данные свидетельствуют, что в мозгу при старении не происходит существенных нарушений механизма митохондриального энергетического сопряжения и общей активности различных систем утилизации энергии АТФ.

Снижение функциональных возможностей организма при старении часто связывают с повреждением биомембран [1, 2]. Ранее в нашей лаборатории были получены данные, свидетельствующие о том, что возрастная структурно-функциональная перестройка мембран митохондрий и эндоплазматического ретикулума печени, в том числе уменьшение интенсивности ПОЛ, в значительной мере обусловлены изменением нейрогормональной регуляции [3, 4]. Это может указывать на важную, пейсмейкерную роль определенных структур мозга в проявлении старения периферических органов и тканей [5, 7]. Однако характер и механизмы метаболических и структурных нарушений нейронов при старении организма на уровне внутриклеточных мембранных структур изучены недостаточно.

Предполагается, что одной из причин ограничения функциональных возможностей мозга в старости является нарушение энергетического метаболизма [8, 9]. Вместе с тем, данные о возрастных изменениях дыхания, окислительного фосфорилирования и других свойств митохондриальных мембран мозга противоречивы [10—14]. Ввиду недостаточной изученности роли различных цитоплазматических факторов в регуляции окислительных процессов в мозгу представляет интерес более детальное изучение возрастных изменений энергетического обмена, мембранной регуляции активности дыхательной цепи и скорости гидролиза АТФ непосредственно в гомогенатах, тем более, что имеются данные о возможности появления в старости в ткани

мозга ингибиторов метаболических процессов, которые теряются в ходе фракционирования гомогенатов [15].

Целью настоящей работы явилось определение оптимальных условий инкубации гомогенатов мозга, при которых в максимальной степени проявлялась бы зависимость скорости дыхания и гидролиза АТФ от изменения проницаемости внутренней мембраны митохондрий для ионов водорода и изучение в этих условиях возрастных изменений активности дыхательной цепи, системы энергетического сопряжения и АТФазной активности.

Материалы и методы

В опытах использовали крыс-самцов линии *Wistar* 1-, 2-, 12- и 24-месячного возраста. После декапитации животного мозг (кроме заднего и продолговатого) извлекали и помещали на измельченный сахарозный лед (0,25 М сахараза). Охлажденный мозг продавливали через пресс и гомогенизировали в соотношении 2:3 в среде следующего состава: 0,25 М сахараза, 1 мМ трилон Б, 10 мМ трис-НСl буфер, рН 7,4. Время гомогенизации—30 с при 800 об/мин тефлонового пестика.

Дыхание измеряли полярографическим методом в базовой среде, содержащей (в мМ): сахарозу—100, KCl—75, KH_2PO_4 —10, MgCl_2 —2, трис-НСl буфер—10, рН 7,4, 30 мкл гомогената. Дополнительно в среду вносили субстраты и другие добавки в зависимости от схемы опыта: 5 мМ сукцинат, 2,5 мМ малат + 5 мМ глутамат или пируват, 1 мМ NADH, 1 мМ ЭГТА, 1 мг обезжиренного БСА («Serva», ФРГ), 1 мкМ ротенон, 1 мкг олигомицина, 20 мкМ цитохром С, 25, 50 и 75 мкМ 2,4-динитрофенол, 400 мкМ ADP. Общий объем среды—0,84 мл.

АТФазную активность измеряли потенциометрическим методом по скорости закисления среды инкубации [16]. Состав среды инкубации: 100 мМ сахараза, 75 мМ KCl, 3 мМ трис-НСl буфер, рН 7,5, 150 мкМ ЭДТА, 30 мкл гомогената, при общем объеме—1,68 мл. Дополнительно в среду вносили в зависимости от схемы опыта 1 мМ АТФ (при измерении активности без экзогенного Mg^{2+}), 1 мМ АТФ + 1 мМ MgCl_2 или CaCl_2 , 50 мкМ ДНФ, 4 мкг олигомицина. Для калибровки шкалы в полную систему вносили 120 мкМ KH_2PO_4 с каждой добавкой.

Все измерения проводили при температуре 37°. Белок измеряли по Lowry и соавт. в модификации Miller [17].

Результаты исследования

Изучение функционального состояния митохондрий непосредственно в гомогенатах мозга представляет определенные трудности, связанные с наличием в такой сложной системе жирных кислот и жирорастворимых низкомолекулярных соединений, ионов Ca^{2+} и других компонентов, способных вызывать разобщение или даже ингибирование дыхания. Ряд методических трудностей может быть исключен введением в среду инкубации соединений, в частности БСА и ЭГТА, специфически связывающих указанные вещества, мешающие изучению системы энергетического сопряжения митохондрий.

На рис. 1, а приведены четыре варианта кривых потребления кислорода гомогенатами мозга при окислении глутамата с малатом

в средах, отличающихся наличием БСА и ЭГТА. Видно, что наличие этих соединений в среде обеспечивает достаточно высокие значения дыхательного контроля, порядка 6, коэффициента ингибирования фосфорилирующего дыхания олигомицином (Ко), порядка 10, и коэф., фнцнента стимуляции олигомицинрезистентного дыхания разобщи- телем (Кр), порядка 10—12.

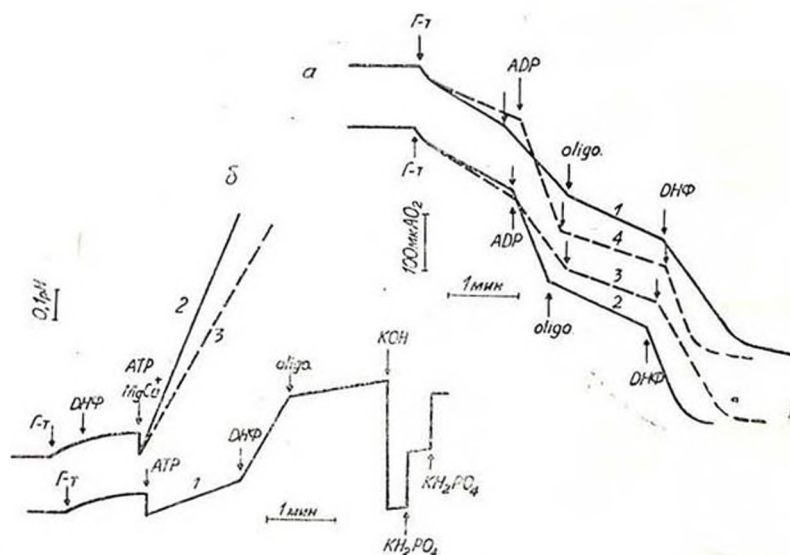


Рис. 1. Кривые потребления кислорода при окислении глутамата с малатом (а) и гидролиза АТФ (б) гомогенатами мозга крыс при различных условиях инкубации. а: 1—без БСА и ЭГТА, 2—с ЭГТА, 3—с БСА, 4—с БСА и ЭГТА; б: 1—без Mg²⁺ 2—с Mg²⁺, 3—с Ca²⁺ без Mg²⁺

Изучение возрастных изменений дыхания гомогенатов было проведено для двух вариантов условий инкубации—с БСА и без него— в средах, содержащих ЭГТА. Учитывая, что БСА может связывать олигомицин и разобинитель, уменьшая их действующие концентрации, олигомицин добавляли с некоторым избытком, но в обеих средах в одинаковом количестве, а ДНФ вносили в виде трех последовательных добавок до конечных концентраций 25, 50 и 75 мкМ. В расчет принималась максимальная скорость разобиненного дыхания, которая при окислении пирувата с малатом, а также сукцината наблюдалась при 25 мкМ ДНФ в среде без БСА и при 50 мкМ ДНФ— в среде, содержащей БСА.

Как видно из данных, приведенных в табл. 1, интенсивность митохондриального дыхания в состоянии 3 по Чансу в гомогенатах мозга практически не изменяется при старении крыс независимо от субстрата окисления. Не наблюдалось снижение скорости потребления кислорода и в разобиненном состоянии при окислении сукцината или глутамата с малатом, однако при использовании пирувата с малатом проявлялось отчетливое, хотя и небольшое, уменьшение скоро-

сти окисления между 1- и 3-месячным возрастом. По-видимому, в субэргатный период развития реализации максимальной активности дыхательной цепи лимитируется активностью переносчика аденин-нуклеотидов. Вероятность того, что его активность в данном случае частично заторможена жирными кислотами можно исключить по

Таблица 1

Интенсивность дыхания гомогенатов мозга крыс разного возраста в метаболических состояниях митохондрий 4 и 3 по Чансу и разоблащенном состоянии (Зр) и среде с БСА (+) и без БСА (—) ($n=13 \div 24$)

Метаболическое состояние	Субстрат окисления	БСА	Интенсивность дыхания, патом 0 мг белка · мин			
			1 месяц	3 месяца	12 месяцев	24 месяца
Состояние 4	глутамат	+	11,2±0,4	10,8±0,4	10,3±0,4	9,9±0,4
	+ малат	—	14,3±0,6	14,4±0,4	13,5±0,5	13,0±0,5
	пируват	+	12,5±0,4	11,2±0,4	10,4±0,2	10,5±0,5
	+ малат	—	16,7±0,6	14,7±0,5	13,8±0,4	13,7±0,5
	сукцинат	+	16,7±0,4	16,4±0,5	15,4±0,5	15,2±0,8
Состояние 3	глутамат	+	22,3±0,6	21,2±0,5	21,1±0,7	19,5±0,7*
	глутамат	+	66,0±1,1	64,0±2,0	66,0±1,3	63,0±1,1
	+ малат	—	61,6±1,7	63,3±1,4	62,0±1,5	58,0±1,8
	пируват	+	68,0±2,0	67,0±2,5	62,3±1,5	65,6±1,3
	+ малат	—	67,0±1,7	62,8±2,8	63,0±1,2	63,6±1,8
Состояние Зр	сукцинат	+	56,2±1,4	57,5±1,3	53,2±1,5	54,3±2,0
	сукцинат	—	56,3±1,4	56,5±1,5	54,7±1,6	52,5±1,3
	глутамат	+	69,5±2,3	66,0±2,2	67,8±2,0	62,5±1,6
	+ малат	—	65,2±2,6	68,1±1,8	63,6±2,6	62,6±1,6
	пируват	+	76,1±2,9	68,2±2,7*	64,3±1,6*	64,1±1,9*
	+ малат	—	79,6±3,8	66,8±3,4*	64,6±1,9*	64,4±2,0*
	сукцинат	+	51,8±1,3	52,4±1,5	49,1±1,7	49,1±1,9
	сукцинат	—	52,2±1,4	50,7±1,3	49,0±1,5	46,9±1,5

Примечание. * $p < 0,05$ по отношению к данным для 1-месячного возраста.

той причине, что наличие БСА в среде инкубации не оказывало существенного влияния на интенсивность дыхания в состоянии 3 ни в одной из возрастных групп животных. Вместе с тем, скорость потребления кислорода в состоянии 4 по Чансу значительно снижалась при наличии в среде инкубации БСА (табл. 1), что, вероятно, объясняется связыванием каких-то эндогенных разоблачающих факторов, возможно, свободных жирных кислот, но не ингибированием дыхательной цепи. Степень уменьшения интенсивности дыхания в состоянии 4 при добавлении в среду инкубации БСА практически не различалась для разных возрастных групп и субстратов окисления и составляла $31 \pm 1\%$.

Как видно из приведенных данных (табл. 1), интенсивность дыхания в состоянии 4 в гомогенатах мозга старых крыс была достоверно ниже, хотя и не значительно, по сравнению с 1-месячными, что относится прежде всего к окислению сукцината и пирувата с малатом в среде без БСА. Сходные данные были получены и для олигомицинрезистентного дыхания (рис. 2). По-видимому, одной из причин этого факта является повышенная концентрация эндогенных разоблачающих факторов, которые легко связываются БСА, в гомогенатах 1-месячных крыс.

Величина дыхательного контроля (ДК) при окислении глутамата с малатом гомогенатами мозга 12- и 24-месячных крыс в среде с БСА (табл. 2) была выше, чем у 1- и 3-месячных. При окислении

пирувата с малатом в среде с БСА максимальные значения ДК наблюдались у старых животных. В среде инкубации, не содержащей БСА, величина ДК была ниже, чем в среде с БСА, но и в этих условиях у 12- и 24-месячных крыс она была выше, чем у 1-месячных. При окислении сукцината возрастных различий ДК не наблюдалось.

Таблица 2

Дыхательный контроль, коэффициент ингибирования дыхания олигомицином (K_0) и коэффициент последующей стимуляции дыхания разбавителем 2,4-динитрофенолом (K_p) в гомогенатах мозга крыс разного возраста ($n=13-24$)

Измер. параметр	Субстрат окисления	БСА +, -	Величина измеряемого параметра по возрастам			
			1 месяц	3 месяца	12 месяцев	24 месяца
ДК	глутамат	+	6,0±0,2	6,0±0,1	6,6±0,2**	6,5±0,2**
	+ малат	-	4,0±0,1	4,4±0,1*	4,7±0,2*	4,5±0,1*
	пируват	+	5,5±0,1	6,0±0,2	6,0±0,1*	6,4±0,3*
	+ малат	-	4,0±0,1	4,3±0,2	4,6±0,1*	4,7±0,1*
	сукцинат	+	3,4±0,1	3,5±0,1	3,5±0,1	3,6±0,1
K_0	глутамат	+	2,5±0,1	2,6±0,1	2,4±0,1	2,7±0,1
	глутамат	+	9,8±0,9	10,8±1,1	10,4±0,9	11,7±1,0
	+ малат	-	6,3±0,5	5,9±0,4	7,6±0,8	6,9±0,5
	пируват	+	9,5±0,7	9,5±0,6	9,5±0,7	10,2±0,7
	+ малат	-	6,5±0,5	6,5±0,4	6,7±0,4	7,1±0,4
K_p	сукцинат	+	4,3±0,3	4,4±0,4	4,4±0,3	4,5±0,3
	сукцинат	+	3,1±0,2	3,2±0,2	3,7±0,3	3,6±0,2
	глутамат	+	10,4±1,1	11,3±1,3	10,7±0,9	12,3±1,3
	+ малат	-	6,7±0,6	6,4±0,6	7,5±0,7	7,5±0,6
	пируват	+	10,5±0,7	9,7±0,6	9,8±0,7	10,1±0,7
	+ малат	-	7,5±0,5	6,8±0,4	6,8±0,3	7,2±0,4
	сукцинат	+	4,0±0,2	4,0±0,3	4,0±0,2	4,2±0,3
	сукцинат	-	2,9±0,14	2,9±0,2	3,3±0,3	3,2±0,2

Примечание. * $p<0,02$ по отношению к данным для 1-месячного возраста, ** $p<0,05$ по отношению к данным для 3-месячного возраста.

Значения коэффициентов ингибирования фосфорилирующего дыхания гомогенатов мозга старых крыс олигомицином (K_0) были не ниже, чем у молодых. Сказанное в равной степени относится и к коэффициенту стимуляции олигомицинрезистентного дыхания разбавителем динитрофенолом (K_p) (табл. 2).

Таблица 3

Интенсивность дыхания гомогенатов мозга крыс разного возраста в различных условиях инкубации при последовательном внесении

добавок NADH, rotenon, сукцината, 2,4-динитрофенола и цитохрома C ($n=8$)

Условия инкубации (последовательное внесение добавок)	Интенсивность дыхания, патом 0 мл белка/мин			
	1 месяц	3 месяца	12 месяцев	24 месяца
и о снине суб траты	11,3±0,6	9,6±0,7	9,3±0,7*	8,1±0,7*
+ NADH	17,6±0,4	11,1±1,0	15,6±0,6*	14,0±1,0*
+ rotenon				
+ сукц. пат., rotenon	22,7±0,5	22,6±1,1**	20,1±0,8*	18,9±0,8*
+ ДНФ	60,8±1,7	59,4±3,2	55,0±3,0	53,9±2,9
+ цитохром	62,0±1,9	64,3±3,0	61,0±3,4	58,4±2,7

Примечание. * $p<0,05$ по отношению к данным для 1-месячного возраста, ** $p<0,02$ по отношению к данным 24-месячного возраста.

При другой схеме регистрации дыхания определяли скорость окисления эндогенных субстратов, NADH, затем, после практически полного ингибирования дыхания ротеноном, измеряли скорость окисления сукцината, без и в присутствии ДНФ, а также после добавления экзогенного цитохрома С. Результаты приведены в табл. 3. Как видно из полученных данных, в гомогенате мозга 1-месячных крыс несколько повышена скорость окисления эндогенных субстратов, тогда как добавка NADH приводит к одинаковому приросту скорости поглощения кислорода во всех возрастных группах. Полное ингибирование дыхания ротеноном свидетельствует о том, что в митохондриях мозга роль внешнего пути окисления NADH незначительна. Возрастная зависимость скорости окисления сукцината при данной схеме опытов не отличалась от предыдущей. Добавление цитохрома С не приводило к существенному повышению активности дыхательной цепи, что не позволяет говорить о сколь-нибудь значитель-

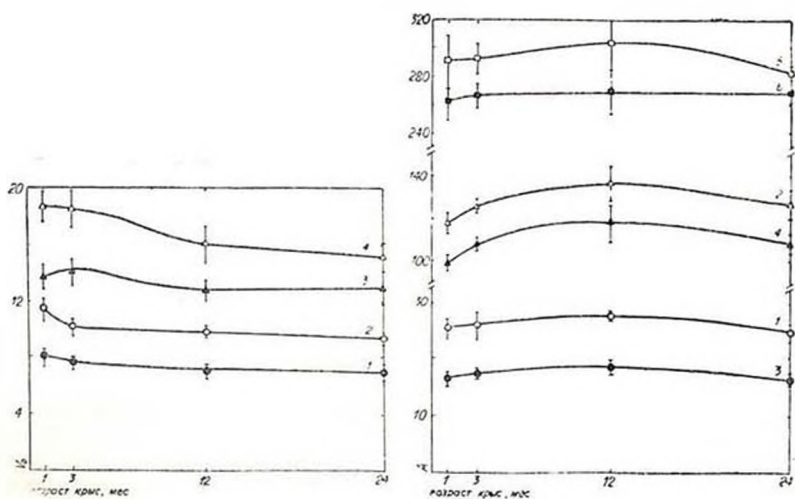


Рис. 2. Интенсивность олигомицинрезистентного дыхания (V_0) гомогенатов мозга крыс разного возраста (норм О/мг белка·мин; $n=13\pm 24$). 1, 2—при окислении пирувата+малата; 3, 4—при окислении сукцината; 2, 4—в среде без БСА; 1, 3—в среде с БСА

Рис. 3. АТРазная активность (А) гомогенатов мозга крыс разного возраста (норм μ моль/мг белка·мин; $n=5\pm 6$). 1—в среде без Mg^{2+} и ДНФ; 2—в среде без Mg^{2+} , с ДНФ; 3—олигомицинрезистентная в среде без Mg^{2+} , с ДНФ; 4—олигомицинчувствительная в среде без Mg^{2+} , с ДНФ; 5—в среде с Mg^{2+} и ДНФ; 6—в среде с Ca^{2+} и ДНФ

ном повреждении внешней мембраны митохондрий в процессе гоменизации мозга.

Изучение скорости ферментативного гидролиза АТР в гомогенатах мозга крыс разного возраста исследовали в средах, различаю-

щихся наличием Mg^{2+} и Ca^{2+} . Схемы разных постановок опытов при регистрации АТРазной активности показаны на рис. 1, б. В средах с Mg^{2+} или Ca^{2+} величина активности почти втрое превышала таковую в среде без этих ионов. В среде без Mg^{2+} гидролиз АТР осуществлялся почти всецело олигомицинчувствительной H^+ -АТРазой митохондрий с участием матриксного эндогенного Mg^{2+} . Надо отметить, что в гомогенатах сердца, например, величина ДНФ-стимулируемой олигомицинчувствительной активности в среде без g^{2+} была не ниже, чем в среде с Mg^{2+} [18]. Такие же данные были получены и для гомогенатов печени. Сказанное для гомогенатов сердца и печени справедливо и для гомогенатов мозга, поскольку данные согласуются со скоростью фосфорилирующего дыхания, и тем более важно для избирательного измерения олигомицинчувствительной H^+ -АТРазной активности митохондрий, что в гомогенатах мозга, в отличие от сердца и печени, в средах с Mg^{2+} проявляется очень высокая скорость гидролиза АТР другими АТРазами, ввиду известной специфичности тканей.

Как видно из данных, приведенных на рис. 3, общие Mg^{2+} - и Ca^{2+} -зависимые АТРазные активности гомогенатов мозга в средах с ДНФ не изменяются с возрастом крыс и практически не различаются между собой. Не выявлено также существенных возрастных различий АТРазной активности и в среде без Mg^{2+} , как общей ДНФ-стимулируемой, так и ее олигомицинчувствительной составляющей; надо лишь отметить несколько более высокий уровень этих активностей в среднем возрасте крыс. В среде без Mg^{2+} и без ДНФ АТРазная активность, в том числе и олигомицинчувствительная, тоже не зависела от возраста крыс. Поскольку величина последней в указанных условиях измерения всецело определяется проницаемостью внутренней мембраны митохондрий для ионов водорода, приведенные данные не позволяют судить о сколь-нибудь значительных структурных нарушениях мембраны при старении организма.

Обсуждение результатов

Нейроэндокринный подход к анализу механизмов старения животных и человека является, очевидно, наиболее всеобъемлющим и последовательным, поскольку включает в себя системный, клеточный и субклеточный уровни исследований, а также позволяет принимать во внимание влияние факторов окружающей среды [7]. Многие возрастные нарушения физиологических функций и структурно-метаболические особенности клеток периферических органов могут быть объяснены изменением нейроэндокринной регуляции. В этой связи представляет интерес выяснение механизмов старения самой нервной ткани. В работах некоторых авторов высказывались предположения о том, что нарушение биоэнергетических процессов в нейронах может быть одной из важных причин старения, снижения устойчивости организма к стрессорным воздействиям [8, 12], на том основании, что

при старении значительно снижается активность дыхательной цепи [8, 12] и содержание цитохромов в митохондриях [12]. По данным других исследователей (см. ссылки к работе Chiu, Richardson [8]), при старении снижается и содержание самих митохондрий в клетках. Это должно было бы приводить к снижению интенсивности тканевого дыхания еще более значительному, чем для изолированных митохондрий. Однако, как видно из полученных данных (табл. 1, 3), существенных изменений скорости потребления кислорода гомогенатами ткани мозга при старении крыс не происходит.

В работе [19] не было обнаружено возрастных различий интенсивности дыхания синапсомной фракции гомогенатов мозга при окислении глутамата, сукцината или α -кетоглутарата. Не обнаружено значительных изменений активности дыхательной цепи и дыхательного контроля митохондрий мозга при старении мышей [10]. Вместе с тем, при отсутствии различий в величинах дыхательного контроля и коэффициента фосфорилирования в митохондриях мозга 2- и 24-месячных крыс [13, 14], у старых животных наблюдалось уменьшение скорости окисления глутамата или глутамата с малатом.

Об отсутствии существенных возрастных изменений активности систем утилизации энергии АТР в мозгу крыс свидетельствуют полученные данные (рис. 3) об относительной стабильности различных АТРазных активностей: Mg^{2+} , Ca^{2+} -зависимых, ДНФ-активируемой олигомицинчувствительной и активности, контролируемой структурным состоянием, а именно ионной проницаемостью внутренней мембраны митохондрий. Эти данные не позволяют предполагать, что в мозгу старых крыс митохондриальные мембраны более повреждены, чем у молодых, тем более, что скорость генерации свободных радикалов этими органеллами с возрастом сильно снижается [19], а интенсивность свободнорадикального окисления липидов в гомогенатах мозга по меньшей мере не повышается [20]. Не выявлено различий Mg^{2+} -АТРазной активности гомогенатов и Mg^{2+} , ДНФ-АТРазной активности митохондрий мозга 6—8 и 24—26-месячных крыс [11, 21]. С возрастом не происходит снижения Na^+ , K^+ -АТРазной активности микросом мозга [5].

Вместе с тем, имеются данные о том, что при старении происходит снижение скорости поглощения Ca^{2+} синапсомными старыми крыс, что связано с уменьшением активности системы транспорта Ca^{2+} в митохондриях [22—24]. Предполагается, что этим можно объяснить ухудшение памяти, способности к обучению и нарушение нейроэндокринной регуляции физиологических функций в старости. Принимая во внимание результаты настоящей работы и данные других исследователей об отсутствии существенных возрастных изменений активности дыхательной цепи, степени сопряжения дыхания с окислительным фосфорилированием, а также общей активности систем утилизации энергии АТР в мозгу, можно сделать вывод, что отмеченное в литературе уменьшение активности системы транспорта Ca^{2+} в митохондриях при старении крыс весьма специфично [22, 24], что механизмы старения мозга реализуются более отчетливо на уровне регуляторных систем, в частности на уровне Ca^{2+} -регуляции энергетического обмена, чем путем повреждения непосредственно биоэнергетических механизмов, что согласуется с выводом о гормональной обусловленности возрастной структурно-функциональной перестройки биомембран периферических тканей [3].

RESPIRATION REGULATION OF MITOCHONDRIAL RESPIRATION AND ATP HYDROLYSIS IN BRAIN HOMOGENATES OF RATS OF VARIOUS AGE

LEMESHKO V. V., S RELYANY S. M.

A. M. Gorky State University, Kharkov

Functional states of brain mitochondria of 1-, 3-, 12- and 24-months old rats were examined directly in tissue homogenates. We found that respiration intensity, the extent of oxidative phosphorylation coupling, and the coefficient of respiration control by oligomycin and 2,4 DNP as well as the rate of ATP hydrolysis were practically age-independent under different conditions of homogenate incubation (with or without Mg^{2+} , DNP or Ca^{2+}). The data obtained do not point out to any essential disturbance of mitochondrial energy coupling mechanism and overall activity of various ATP utilization systems in aging rat brain.

ЛІТЕРАТУРА

1. Harman D. Relat. between. Norm. Aging and Disease Symp., Amer. Aging Assoc., Sept., 1982, p. 45—84, New York, 1985.
2. Фролькис В. В. Физиол. журн., т. 30, № 5, с. 559—566, 1984.
3. Лемешко В. В. Автореф. докт. дис., Минск, 1983.
4. Лемешко В. В., Бабенко Н. А., Попова Л. Я., Белостоцкая Л. П., Козлова Е. В., Кулаева Е. В., Бронкович В. М., Цымбал Л. В. Укр. биохим. журн., т. 58, № 1, с. 63—68, 1986.
5. Leslie P. B., Maw-Shung L., Landfield P. W. Amer. J. Physiol., v. 247, № 5, R850—R855, 1984.
6. Timiras P. S. Relat. between Norm. Aging and Disease Symp., Amer. Aging Assoc., Sept. 1982, p. 151—156, New York, 1985.
7. Meites J., Goya R., Takahashi S. Exp. Gerontol., v. 22, № 1, p. 1—15, 1987.
8. Chiu Y. J. D., Richardson A. Exp. Gerontol., v. 15, № 6, p. 511—517, 1980.
9. Smith C. B. Trends Neurosci., v. 7, № 6, p. 203—208, 1984.
10. Weindruch R. H., Chung M. K., Verity A. M., Waleord R. L. Mech. Ageing and Develop., v. 12, № 4, p. 375—392, 1980.
11. Потанин Р. Н. Укр. биохим. журн., т. 55, № 5, с. 563—566, 1983.
12. Floyd R. A., Harmon H. J., Nank S. K. Biophys. J., v. 45, № 2, Pt. 2, p. 298, 1984.
13. Wei P., Michel R., Rossignol P. Mech. Ageing and Develop., v. 26, № 2—3, p. 277—282, 1984.
14. Vitorica J., Clark A., Marchado A., Sastretegui J. Mech. Ageing and Develop., v. 23, № 3, p. 255—256, 1985.
15. Априян Г. В., Паронян Ж. А., Мкртчян Г. А., Адуц Э. Г. Всесоюзный симпозиум «Молекулярные и клеточные механизмы старения, 1981, Тезисы докл., Киев, с. 13—14, 1981.
16. Болдырева А. А. — В кн.: Транспортные аденозинтрифосфатазы, с. 69—78, М., Изд-во МГУ, 1977.
17. Miller G. L. Adv. Chem., v. 31, № 5, p. 961—966, 1959.
18. Лемешко В. В., Маланда Н. Укр. биохим. журн., т. 61, № 1, с. 64—71, 1989.
19. Адуц Э. Г., Паронян Ж. А., Априян Г. В., Ахасердян Э. С. Нейрохимия, т. 4,

- № 4, с. 423—426, 1985.
20. Лемешко В. В., Пикигченко Ю. В., Соич Н. В., Овсянников С. Е. Укр. биохим. журн., т. 59, № 2, с. 50—57, 1987.
 21. Потапенко Р. Н. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 90, № 12, с. 677—678, 1980.
 22. Leslie S. W., Chandler L. J., Barr E. M., Farrar R. P. Brain Res., v. 329, № 1—2, p. 177—183, 1985.
 23. Vitorica J., Satrustegui J. Brain Res., v. 378, № 1, p. 36—48, 1986.
 24. Vitorica J., Satrustegui J. Biochim. et biophys. acta: Bioenergetics, v. 851, № 2, p. 209—216, 1986.

Поступила 28.XII.1989

МОДИФИКАЦИЯ ЛИПИДНОЙ КОМПОНЕНТЫ НАРУЖНЫХ
МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ МЕМБРАН ГОЛОВНОГО МОЗГА
МЫШЕЙ И КИНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МЕМБРАНОСВЯЗАННОЙ
МАО ПРИ ИЗМЕНЕНИИ АКТИВНОСТИ
СЕРОТОНИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ВВЕДЕНИЕМ
АНТИОКСИДАНТА

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

Институт химической физики АН СССР, Москва

При облегчающем активацию серотонинергической системы действии антиоксиданта ионола изучены изменения липидов наружных митохондриальных мембран головного мозга мышей и кинетических свойств мембраносвязанной МАО. Через 18 ч после внутрибрюшинного введения ионола в дозе 20 мг/кг увеличиваются соотношения фосфолипиды/белок, фосфолипиды/общие липиды, снижается уровень холестерина, уменьшается микровязкость липидного бислоя (оцененная методом спинного зонда); происходит интенсификация ПОЛ; несколько изменяется процентный состав фосфолипидов.

В то время как субстратная зависимость скорости реакции дезаминирования тирамина подчиняется кинетике Михаэлиса-Ментен, в случае серотонина наблюдается сложная зависимость начальной скорости реакции от его концентрации и в опыте, и в контроле. Это проявляется в наличии промежуточного плато на начальном участке и двух максимумов—при низких и высоких концентрациях субстрата, связанных с присутствием двух типов МАО—А и В. Для обоих типов фермента отмечается субстратное ингибирование, степень которого в опытных пробах меньше, чем в контроле. Для МАО типа А в опыте имеет место сдвиг субстратной зависимости в область более высоких концентраций серотонина. Для МАО типа А установлено, что при низких концентрациях субстрата скорость реакции в опыте ниже, чем в контроле, при высоких—наоборот. Особенности субстратной зависимости для серотонина объясняются с точки зрения наличия на мембране связывающих серотонин участков («рецепторов»), способных при связывании лиганда оказывать влияние на свойства фермента, локализованного в их окружении. Изменения свойств липидной фазы наружных митохондриальных мембран и кинетического поведения МАО обсуждаются с точки зрения их вклада в осуществление серотонинергической передачи.

Данная работа является частью исследований роли липидов клеточных мембран как модулятора активности серотонинергической нейромедиаторной системы. Предыдущие работы [1, 2] посвящены изучению роли липидов первичных окончаний (фракции синапсом головного мозга мышей), где сосредоточены собственно процессы восприятия и трансдукции серотонинового сигнала. Показано, что при ингибировании и активации серотониновой системы, оцениваемым по

соответствующим поведенческим тестам, имеют место существенные изменения в составе и структуре липидной компоненты, причем эти изменения не просто сопровождают процесс трансмиссии, а включены в него и являются для него существенными.

Не менее важными для функционирования серотониновой системы этапами являются процессы синтеза и деградации медиатора. Основным путем деградации серотонина является его окислительное дезаминирование МАО наружных митохондриальных мембран.

Целью настоящей работы было изучение роли состояния липидной компоненты этих мембран в функционировании локализованной в них МАО при изменении активности серотонинергической системы. В качестве воздействия, модулирующего активность этой системы, использовали антиоксидант (АО)—ингибитор свободнорадикального ПОЛ 4-метил-2,6-дитретбутилфенол (нонол).

Материалы и методы

В работе использовали 320 беспородных мышей массой 18—23 г, содержавшихся на общесвиарном рационе.

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

Для выделения митохондрий мышей быстро деканитировали, извлекали головной мозг и помещали на лед. Гомогенизацию и все дальнейшие операции проводили при 4°.

Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования с очисткой от синапсом в градиенте плотности сахарозы [3]. Наружные мембраны митохондрий выделяли, не используя осмотический шок и центрифугирование в градиенте плотности сахарозы [4].

Содержание белка определяли по методу Lowry и соавт. [5], не используя в качестве стандарта БСА.

Экстракцию липидов проводили методом, описанным Кейтсом [6].

Антиокислительную активность липидов определяли, используя метилолеатную окислительную модель [7].

Состав фосфолипидов наружных митохондриальных мембран определяли методом ТСХ на силикагеле. В качестве системы растворителей использовали смесь хлороформ:метанол:уксусная кислота:вода (50:30:8:4). Количество отдельных фракций фосфолипидов оценивали по содержанию Р_i в снятых с пластинок пятнах [8].

Содержание общего холестерина в липидах определяли спектрофотометрически [9].

Мерой микровязкости липидной фазы наружных митохондриальных мембран было время корреляции вращения (τ_c) спинного зонда, представляющего собой меченную по карбоксильной группе нитроксильным радикалом жирную кислоту с цепочкой из 8 атомов углерода. Регистрацию спектров ЭПР проводили на ЭПР-спектрометре «Bruker» (ФРГ). τ_c рассчитывали по формуле для быстро вращающихся зондов [10]:

$$\tau_c = 6,65 \cdot \Delta H \cdot (\sqrt{I_{-1} \cdot I_{+1}} - I) \cdot 10^{-10} \quad \text{с где}$$

I_{+1} и I_{-1} —интенсивности низко- и высокопольной компоненты дифференциального спектра поглощения, ΔH (гаусс)—расстояние между экстремумами высокопольной компоненты.

Активность МАО определяли в митохондриях мозга мышей (суб-

страт—серотонин гидрохлорид) по количеству выделившегося в результате реакции аммиака без его предварительной отгонки по методике, описанной нами в предыдущей работе [11]. Очищенную фракцию митохондрий суспендировали в 50 мМ фосфатном буфере (pH 7,6). Реакцию проводили в пробирках с пришлифованными пробками. Окисление вели кислородом воздуха при 37°, постоянно встряхивая. Среда инкубации содержала 0,5 мл суспензии митохондрий (0,5—0,7 мг белка), 0,3 мл фосфатного буфера. Реакцию начинали добавлением 0,1 мл раствора субстрата серотонина в том же буфере. Для фиксации реакции в среду инкубации (0,9 мл) добавляли 0,5 мл этанола («Merck», ФРГ). Белок осаждали центрифугированием (3000 об/мин, 10 мин), к супернатанту, количественно отделенному от осадка, добавляли 50 мкл реагента (раствора, содержащего в этом объеме по 10 мкмоль о-фталевого альдегида и 2-меркаптоэтанола). В «слепые» (или «нулевые») пробы этанол приливали до добавления субстрата. Пробы, закрытые пробками, оставляли на 2 ч в темном месте, после чего измеряли флуоресценцию при $\lambda_{\text{вх.зб.}} = 413$ нм, $\lambda_{\text{исп.}} = 480$ нм. Для снятия калибровочных кривых использовали сернокислый аммоний (ос. ч), который добавляли в «слепые» пробы, чтобы учесть влияние на флуоресценцию веществ, содержащихся в суспензии митохондрий. По соответствующим калибровочным кривым определяли количество выделившегося в реакции аммиака и рассчитывали активность фермента. Изучение кинетических кривых выделения аммиака в описанных выше условиях инкубации показало, что для корректного расчета начальной скорости реакции время инкубации не должно превышать 5 мин. При определении активности МАО все реактивы готовили на бидистиллированной воде.

Активность МАО наружных митохондриальных мембран с тирамином в качестве субстрата определяли методом изотермической отгонки выделившегося в результате реакции аммиака с последующей несселеризацией [20].

Результаты и обсуждение

В предыдущих работах мы показали, что предварительное введение АО облегчало активацию серотонинергической системы п-хлорамфестином (п-ХА) [1, 2]. Активирующее действие п-ХА проявляется в возникновении специфического серотонинергического синдрома встряхивания головы у мышей [1]. На фоне предварительно введенного за 18 ч до п-ХА нопола этот синдром усиливался в 1,5 раза ($35,7 \pm 1,6$ встряхиваний в мин после тестирующего введения п-ХА по сравнению с $23,7 \pm 1,7$ у животных, не получавших нопола) [1].

Для выявления вклада липидной компоненты мембран в изменение активности серотонинергической системы через влияние на функционирование МАО мы изучали следующие за введением нопола изменения в составе и структуре липидной фазы наружных мембран митохондрий и изменения в кинетическом поведении МАО.

В табл. 1, 2 приведены данные об изменениях в липидах наружных мембран головного мозга мышей, наблюдавшиеся через 18 ч после введения 20 мг/кг нопола. Из таблиц видно, что после указанного воздействия при практически не изменившемся соотношении липиды/белок наблюдается существенное увеличение соотношения фосфолипиды/белок и двукратное увеличение содержания фосфолипидов в общих липидах. Содержание холестерина значительно падает, су-

Таблица 1

Изменение содержания фосфолипидов в наружных мембранах митохондрий головного мозга мышей через 18 ч после внутрибрюшинного введения 4-метил-2,6-дитретбутилфенола (инола) в дозе 20 мг/кг

Фракции фосфолипидов	Содержание фосфолипидов					
	% от суммы фосфолипидов			мкг / мг белка		
	конт. роль	опыт	опыт / контроль	конт. роль	опыт	опыт / контроль
Сфингомиелин	12.5±0.3	11.7±1.1	0.94	2.2±0.7	4.5±0.4	2.0*
Фосфатидилхолин	33.9±1.8	32.3±3.9	0.95	6.2±0.9	10.8±1.8	1.7*
Фосфатидилинозит - фосфатидилсерин	11.3±1.7	12.5±1.3	1.3*	2.6±0.7	6.8±0.5	2.6*
Фосфатидилэтаноламин	28.3±3.2	27.9±1.7	0.98	5.6±0.3	9.8±0.5	1.7*
Кардиолипин - фосфатидная кислота	8.7±1.2	7.1±1.6	0.81	2.0±0.2	2.2±0.6	1.1
Сумма фосфолипидов				18.2±2.3	34.1±3.8	1.9*

Примечание. В таблице представлены данные 4-х опытов; *— $p \leq 0,05$, **—контрольным животным вводили Твин-80 (2%-ный раствор).

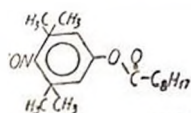
Таблица 2

Изменения в липидной компоненте наружных мембран митохондрий головного мозга мышей через 18 ч после внутрибрюшинного введения 4-метил-2,6-дитретбутилфенола (инола) в дозе 20 мг/кг

Параметры	Контроль**	Опыт	Опыт / Контроль
фосфолипиды (мкг Р)	10,7±2,5	21,3±1,1	2,0*
общие липиды (мг)			
фосфолипиды (мкг Р)	18,2±2,3	34,1±3,8	1,9*
белок (мг)			
общие липиды (мг/мг)	1,7±0,2	1,6±0,2	0,94
белок (мг/мг)			
холестерин (мкг/мг)	58±6	36,5±4,5	0,63*
общие липиды (мг/мг)			
холестерин (моль/моль)	0,25±0,03	0,1±0,02	0,35*
фосфолипиды (моль/моль)			
микровязкость при 25°C ± 10с **	2,5±0,5	1,4±0,3	0,56*
АОА липидов (ул. ед.) ***	—2200±400	—5500±900	—3300* (опыт) / контроль

Примечание. В таблице приведены данные 4-х опытов; *— $p \leq 0,05$, **—контрольным животным вводили Твин-80 (2%-ный раствор),

***—зонд



****—АОА-антиокислительная активность липидов

ущественно снижается и соотношение холестерина/фосфолипиды. Антиокислительная активность липидов наружных мембран митохондрий через 18 ч после введения нитрола значительно уменьшена по сравнению с контролем, то есть можно предположить интенсификацию ПОЛ в митохондриях опытной группы. В соответствии с увеличением содержания общих фосфолипидов наблюдается увеличение количества отдельных фракций в расчете на мг белка. Что касается процентного содержания тех или иных фосфолипидов, то для большинства фракций оно практически не меняется. Исключение составляют фосфатидилсерин и фосфатидилинозит, суммарное содержание которых в общих фосфолипидах достоверно увеличивается. Описанным выше изменениям в составе фосфолипидов и их АОА соответствует и изменение структуры мембраны—микровязкость липидного бислоя (оцененная по η , использованного спинного зонда) в опыте практически вдвое ниже, чем в контроле.

Таким образом, облегчающее активацию серотониновой системы введение антиоксиданта привело к выраженным изменениям в ряде параметров, характеризующих липиды наружных митохондриальных мембран головного мозга.

Будучи интегральным мембраносвязанным белком, МАО является липидзависимым ферментом, кинетические свойства которого зависят от состава и свойств липидного микроокружения. В рамках настоящей статьи, к сожалению, невозможно процитировать все касающиеся этого вопроса работы. Сошлемся только на результаты экспериментов, в которых, как и в данной работе, модификацию липидов митохондриальных мембран проводили введением n -нитро-АО. Было исследовано влияние состава и структуры липидной компоненты на кинетические свойства МАО наружных митохондриальных мембран печени при использовании в качестве субстрата тирамина гидрохлорида [13]. Оказалось, что важными факторами, влияющими на сродство мембраносвязанной МАО к субстрату, V и на степень характерного для этого фермента субстратного ингибирования, являются содержание кислых фосфолипидов, степень окисленности липидов, микровязкость липидного бислоя.

Используя в качестве субстрата тирамин, мы исследовали кинетические свойства МАО наружных мембран митохондрий мозга мышей после введения нитрола. Оказалось, что для наружных мембран митохондрий мозга зависимость начальной скорости реакции от концентрации тирамина имеет такую же форму, как и в случае наружных мембран митохондрий печени, свидетельствующую об ингибировании «избытком» субстрата (рис. 1). Левая ветвь кривой подчиняется уравнению Михаэлиса-Ментен. Используя координаты Лайнхувера-Берка и метод Корниш-Боудена [14], получили значения V в контроле и в опыте 126 ± 3 и 85 ± 4 нмоль $\text{NH}_3/\text{мг}$ белка в мин и K_m $(4,0 \pm 0,1) \times 10^{-4}$ и $(2,8 \pm 0,6) \times 10^{-4}$ М соответственно. Процент субстратного ингибирования при $S_0 = 10$ мМ составлял в контроле 59%, в опыте—53%. Сопоставляя полученные после введения нитрола изменения кинетических параметров МАО наружных мембран митохондрий мозга (субстрат тирамин) с изменениями в липидной компоненте и сравнив их с цитированными выше данными по ферменту, локализованному в митохондриях печени [13], можно заключить, что МАО мозга и печени идентичны в плане регуляторного влияния липидной фазы на кинетические свойства фермента. Это касается и связи K_m с содержанием кислых фосфолипидов, и влияния микровязкости на K_m и степень субстратного ингибирования, и трансформирующего влияния на активность МАО интенсификации ПОЛ.

Показав на примере тирамина в качестве субстрата, что МАО в печени и мозгу идентичны, приступили к изучению активности МАО митохондрий мозга по отношению к серотонину. Следует отметить, что при использовании тирамина определяли активность фермента в суспензии наружных мембран митохондрий, а при использовании серотонина—в суспензии целых митохондрий, имея в виду, что на поверхности митохондрий могут существовать рецепторы для серотонина, которые могут быть потеряны в процессе фрагментации митохондрий и очистки наружных мембран, а связывание серотонина с рецепторами может менять свойства мембран, что будет сказываться и на активности фермента.

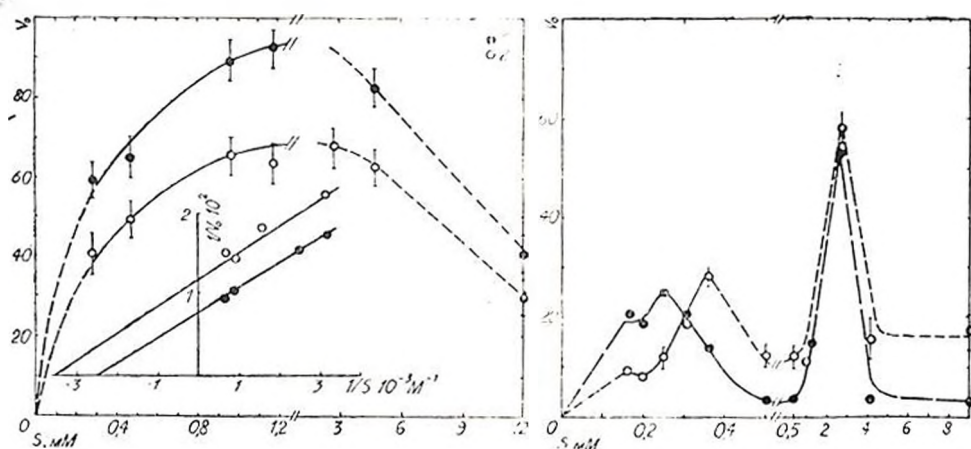


Рис. 1. Зависимость начальной скорости реакции окислительного дезаминирования тирамина гидрохлорида МАО наружных мембран митохондрий головного мозга мышей от концентрации субстрата (в $\text{ммоль NH}_3/\text{мг белка} \cdot \text{мин}$) 1—контроль, 2—опыт (18 ч после введения внутривенно мышам ипонола в дозе 20 мг/кг). Среда инкубации содержала 1,0 мл суспензии наружных митохондриальных мембран (0,1 мг белка), 0,6 мл фосфатного буфера pH 7,6; 0,2 мл раствора тирамина гидрохлорида. Представлены результаты 4-х опытов. Для получения каждой точки проводили 3—4 параллельных определения

Рис. 2. Зависимость начальной скорости реакции окислительного дезаминирования серотонина гидрохлорида МАО митохондрий мозга мышей от концентрации субстрата (в $\text{ммоль NH}_3/\text{мг белка} \cdot \text{мин}$). 1—контроль, 2—опыт (18 ч после внутривенного введения ипонола мышам в дозе 20 мг/кг). Среда инкубации содержала 0,5 мл суспензии митохондрий (0,5—0,7 мг белка), 0,3 мл фосфатного буфера pH 7,6, 0,1 мл раствора серотонина гидрохлорида в том же буфере. Представлены результаты 3-х опытов. Для получения каждой точки проводили 4—6 определений скорости реакции. Величины погрешности среднего арифметического вычислены для каждой точки, но на кривых они указаны в тех случаях, когда превышают диаметр выбранных символов

На рис. 2 представлена зависимость начальной скорости реакции окислительного дезаминирования МАО митохондрий мозга мышей контрольной и опытной группы от концентрации серотонина. Амплитуда изменений скорости при изменении концентрации субстрата, как видно из рисунка, в обоих случаях одна и та же. Это позволяет предположить, что количество ферментного белка одинаково в митохондриях опытной и контрольной групп, то есть введение животным ипонола вряд ли сказалось на биосинтезе фермента. Из рис. 2

видно, что имеются области концентраций серотонина, где скорость реакции в опыте меньше, чем в контроле, есть участки, где, напротив, скорость реакции, катализируемой митохондриальной МАО опытной группы, превышает контрольный уровень. Эта разница позволяет сделать предположение о возможных различиях в кинетических параметрах МАО, связанных с различиями в микроокружении фермента.

Представленные на рис. 2 субстратные зависимости имеют очень сложный характер; они не являются тривиальными, что для такого сложного аллостерического фермента как МАО не удивительно. В литературе описаны случаи, когда авторы получали для локализованной в митохондриальной мембране МАО не менее сложную субстратную зависимость (и именно для субстрата серотонина) [15]. Как в опыте, так и в контроле на кривой субстратной зависимости обнаружено два выраженных максимума—в области относительно низких и в области относительно высоких концентраций субстрата. С чем это может быть связано?

В настоящее время считается, что МАО в мембранах представлена главным образом двумя типами фермента А и Б, отличающимися по субстратной специфичности, то есть по родству к соответствующим субстратам. Это не значит, что МАО типа А дезаминирует только свойственные ей субстраты (в том числе и серотонин), а МАО Б только «свой» субстрат. Степень участия того или иного типа МАО в дезаминировании зависит от концентрации субстрата-аминна [16]. Если родство МАО А по отношению к серотонину оценивается K_m примерно 0,07 мМ, то родство МАО Б к серотонину (не являющегося, как принято считать, ее субстратом)— K_m порядка 2 мМ [17]. Увеличение концентрации серотонина приводит, таким образом, к увеличению доли участия МАО типа Б в его дезаминировании [18].

Наличие «горбов» на кривой зависимости скорости реакции от концентрации серотонина, на наш взгляд, нельзя объяснить иначе, чем дезаминированием серотонина разными формами МАО. В области концентраций серотонина 0,1—0,5 мМ функционирует, по-видимому, форма А. Следует отметить, что именно эта область отражает реальное содержание серотонина в головном мозгу [20]. Этот факт подтверждает распространенное мнение, что в нормальной ситуации серотонин в мозгу дезаминируется исключительно МАО А, хотя количество МАО этого типа в серотонинергических нейронах очень мало [21].

Данные на рис. 2 кривые можно интерпретировать следующим образом. С увеличением концентрации серотонина активность МАО А сначала растет, затем падает, достигая минимального значения при $S_0 = 0,5$ мМ. Это вполне соответствует известным из литературы данным об ингибировании МАО высокими концентрациями субстрата. При концентрации серотонина порядка 0,5 мМ активность фермента в большой степени ингибирована. При концентрациях, превосходящих 1,0 мМ, активность (теперь уже, по-видимому, только формы Б) снова возрастает, достигая максимума, затем снова наблюдается ингибирование высокими концентрациями субстрата.

В опыте и в контроле отмечается односторонняя зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата. В области функционирования МАО Б кривые практически идентичны. Отличие состоит только в степени ингибирования субстратом. Из рис. 2 видно, что в опыте она меньше, чем в контроле. Характеризующее степень ингибирования отношение V при $S_0 = 9$ мМ к V при $S_0 = 3$ мМ

составляет в контроле 0,1, в опыте—0,28. Это соответствует полученным ранее данным (с тирамином в качестве субстрата) о понижении степени субстратного ингибирования МАО с уменьшением микровязкости липидного бислоя [13].

Наибольший интерес представляет сравнение субстратных зависимостей для опыта и контроля в области функционирования МАО А, так как, как уже говорилось выше, серотонин в мозгу дезаминируется исключительно этим типом фермента. Начальный участок полученных кинетических кривых, на наш взгляд, дает основание расценить их как так называемые кривые с промежуточным плато, наличие которого в субстратной зависимости описано для ряда аллостерических ферментов [22]. Чаще всего оно обусловлено существованием переходящих друг в друга форм фермента, отличающихся степенью кооперативности по эффектору-субстрату [22]. В каких же двух формах может существовать МАО типа А в мембране, чтобы это приводило к кривой с промежуточным плато? Нам кажется вероятным следующее объяснение. Помимо связывания серотонина на молекуле МАО (на каталитическом или аллостерическом эффекторном центре), может происходить связывание амина с расположенными на митохондриальной мембране участками связывания («рецепторами») серотонина. Нужно отметить, что такая возможность уже допускалась для объяснения сложного кинетического поведения митохондриальной МАО по отношению к серотонину [15]. Известно, что при связывании серотонина на митохондриальной мембране меняется структура липидного микроокружения «рецептора» [23]. Это должно сказаться на конформации расположенных вблизи молекул фермента, а это, в свою очередь, скажется на взаимодействии каталитических и эффекторных центров, то есть и на кинетической кооперативности. Общий пул молекул фермента складывается из молекул, локализованных вблизи «рецепторов» серотонина, и молекул, «удаленных» от них. Таким образом, мы можем иметь «смесь» двух форм фермента, отличающихся по кинетической кооперативности. Объяснив таким образом наличие промежуточного плато, рассмотрим различия, имеющиеся в субстратной зависимости МАО в опыте и в контроле. Как видно из рис. 2, различие прежде всего заключается в сдвиге субстратной зависимости для опыта в область более высоких концентраций серотонина. В соответствии с этим при концентрации амина меньшей 0,3 мМ скорость ферментативной реакции в опыте ниже, при концентрациях, больших 0,3 мМ—выше, чем в контроле. Интересно отметить, что по полученным нами данным (они будут приведены в другой публикации) количество серотонина в ткани головного мозга мышей через 18 ч после введения ипонола в 1,5 раза превышает уровень медиатора в мозгу контрольных животных. Обращает на себя внимание тот факт, что сдвиг субстратной зависимости в опыте по сравнению с контролем таков, что, начиная с концентрации субстрата примерно 0,2 мМ и, по крайней мере, до 0,35 мМ, скорость реакции в опыте и в контроле одинакова при концентрации серотонина в опыте примерно в 1,5 раза превышающей контрольный уровень (а это, как говорилось выше, как раз реально наблюдавшееся увеличение количества серотонина в мозгу мышей опытной группы). Можно себе представить, что именно этот сдвиг субстратной зависимости позволяет реализоваться повышенному уровню серотонина в опыте. При дальнейшем увеличении концентрации серотонина проявляется, по-видимому, компенсаторное увеличение скорости дезаминирования в опыте по сравнению с контролем. Таким образом, наблюдавшееся после действия ипонола изме-

нения кинетических свойств МАО могут вносить вклад в увеличение количества серотонина (см. начальный участок рис. 2—уменьшение скорости в опыте), реализацию действия этого увеличенного количества и возвращение его к нормальному уровню (увеличение скорости в опыте по сравнению с контролем при «больших» концентрациях субстрата). Какое значение могут иметь при этом изменения в липидной компоненте мембраны? В случае введения мышам инола мы наблюдаем уменьшение микровязкости липидного бислоя (табл. 2). Известно, что текучесть липидной фазы влияет на связывание серотонина с рецепторами на синаптических мембранах. Согласно концепции «вертикального перемещения», с уменьшением вязкости (увеличением текучести) уменьшается доступность связывающих участков для лиганда [24]. Такую ситуацию мы и имеем после введения инола. Изменения в связывании серотонина отразятся на соотношении форм фермента, расположенных в зоне и вне зоны действия рецептора. Если принять это во внимание, то не вызывает удивления наблюдаемый в опыте сдвиг субстратной зависимости. В изменение скорости реакции может вносить свой вклад изменение интенсивности ПОЛ (проявляющееся в уменьшении АОА) мембранных липидов митохондрий опытной группы за счет уменьшения количества эффективных каталитических участков вследствие их трансформации [20]. Известно, что интенсификация ПОЛ ингибирует рецепторное связывание серотонина [25], что также может проявиться в форме и положении кривой субстратной зависимости. Большая текучесть липидной фазы «опытных» мембран может обеспечить меньшую степень ингибирования «избытком» субстрата [13], что будет способствовать нормализации увеличенного уровня серотонина.

Все вышесказанное позволяет заключить, что модификация липидов митохондриальных мембран головного мозга, изменяя кинетические свойства МАО, может вносить вклад в реализацию стимулирующего действия АО на серотонинергическую систему. Этим подтверждается важная роль липидной компоненты клеточных мембран на различных этапах функционирования данной нейромедиаторной системы.

CHANGES OF MOUSE BRAIN MITOCHONDRIAL OUTER MEMBRANE LIPID PHASE AND KINETIC PROPERTIES OF MEMBRANE-BOUND MONOAMINE OXIDASE (MAO) AFTER THE ADMINISTRATION OF AN ANTIOXIDANT IN VIVO

MOLOCHKINA YE. M., BOROVOK N. V., BURLAKOVA YE. B.

Institute of Chemical Physics, USSR Academy of Sciences, Moscow

Changes of mouse brain mitochondrial outer membrane lipid phase were studied after the activation of the serotonergic system by an antioxidant. Eighteen hours after the administration of ionol (20 mg/kg) we observed an increase in the phospholipid/protein and phospholipids/total lipids ratio. The level of cholesterol decreased and lipid bilayer fluidity (evaluated by the spin probe technique) decreased as well. Lipid peroxidation intensified and some changes in the level of phospholipids were noted. The relationship between the substrate concentration and the reaction rate was hyperbolic with tyramine as a substrate but a complex and non-standard with serotonin, i. e., the curve had a plateau

and two maxima—one at low and the other at high substrate concentration. These maxima are attributed to two MAO types —A and B. Both MAO types are substrate-inhibitable, but the inhibition was less in the experimental group, than in the control one. After ionol injection the curve shifted towards higher serotonin concentrations for MAO type A. Mitochondrial type A MAO of animals, which received AO, deaminated serotonin slower at low substrate concentrations and faster at high substrate concentrations as compared with control mitochondria. The type of substrate dependence is discussed from the point of view of a possible existence of serotonin „receptors“ on the mitochondrial membrane. Changes in mitochondrial outer membrane lipid phase and kinetic properties of MAO are discussed in terms of their contribution to serotonergic transmission.

ЛИТЕРАТУРА

1. Боровок Н. В., Молочкина Е. М., Дубинская Н. И., Бурлакова Е. Б. Нейрохимия, т. 7, № 2, с. 178—188, 1988.
2. Боровок Н. В., Молочкина Е. М. — В сб.: II Международная школа-конф. молодых ученых соц. стран «Молекулярные основы биотехнологии», с. 51—52, Пушкино, 1987.
3. Методы биохимических исследований (под ред. Прохоровой М. И.), Л., Изд-во ЛГУ, 1982.
4. Schinatlman C., Ervin V. G., Greenwalt J. W. J. Cell. Biol., v. 32, № 2, p. 729—735, 1967.
5. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall K. J. J. Biol. Chem., v. 193 № 1, p. 423—434, 1951.
6. Кейтс М. Техника липидологии, М., Мир, 1975.
7. Бурлакова Е. Б., Алесенко А. В., Молочкина Е. М., Пальмина Н. П., Храпова Н. Г. Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте, М., Наука, 1975.
8. Биохимическое исследование мембран (под ред. Мэдди Э.), М., Мир, 1979.
9. Sperry W. H., Webb M. J. Biol. Chem., v. 187, p. 96—106, 1950.
10. Кузнецов А. Н. Метод спинного зонда, М., Наука, 1976.
11. Молочкина Е. М., Боровок Н. В. Нейрохимия, т. 8, № 2, с. 311, 1989.
12. Бурлакова Е. Б. — В сб.: Биохимия липидов и их роль в обмене веществ, с. 23—25, М., Наука, 1981.
13. Бурлакова Е. Б., Кайране Ч. Б., Молочкина Е. М., Хохлов А. П. Вopr. мед. химии, т. 30, № 1, с. 66—72, 1984.
14. Корниш-Бовден Э. Основы ферментативной кинетики, М., Мир, 1979.
15. Васильевых Л. Т., Горкин В. З., Каган З. С. Биохимия, т. 44, № 9, с. 1542—1550, 1979.
16. Murphy D. L., Garrick N. A., Cohen R. M. -In: Antidepressants, p. 209—227, Elsevier Science Publ., 1983.
17. Pearce I. B., Roth J. A. Biochem. Pharmacol., v. 33, p. 1809—1811, 1984.
18. Вережкина И. В., Асина В. В., Горкин В. З., Машковский М. Д. Нейрохимия, т. 6, № 3, с. 332—339, 1987.
19. Глебов Р. Н., Крыжановский Г. Н. Функциональная биохимия синапсов, М., Медицина, 1978.
20. Горкин В. З. Аминоксидазы и их значение в медицине, М., Медицина, 1981.

21. Denney R. M., Denney C. B. *Pharmac. Ther.*, v. 30, p. 227—259, 1985.
22. Курганов Б. И. Аллостерические ферменты, М., Наука, 1978.
23. Rosenberg P. H. *Arch. Pharmacol.*, v. 307, p. 199—203, 1979.
24. Heron D. S., Shinitzky M., HersHKovitz S. D. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA, Biol. Sci.*, v. 77, p. 7463—7467, 1980.
25. Либс М. Л., Богданова Е. Д., Розенберг А. Е., Прилико Л. П., Козлов Ю. П., Казан В. Е. *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, т. 92, № 11, с. 552—554, 1981.

Поступила 10.XI.1989

Neurobiology of Invertebrates Transmitters, Modulators and Receptors (Symposia Biologica Hungarica 36) eds. J. Székely, K. Sándor, Akadémiai Kiadó, Budapest, 750 p., 1988.

Нейробиология трансммиттеров, модуляторов и рецепторов беспозвоночных.

Настоящее издание содержит материалы симпозиума, входящего в рамки II Международного конгресса по нейробиологии, охватывающие широкий спектр исследований нейронов мозга и поведения беспозвоночных животных. К ним относятся физиология, фармакология и локализация специфических химических соединений, пептидергические механизмы, проблемы модуляции, интеграции и обучения, равно как и ионные каналы и внутриклеточные механизмы процессов, происходящих в мозгу моллюсков и членистоногих. В книге обсуждаются также аспекты исследования нейротрансмиттеров, как взаимодействие трансммиттеров и модуляторов, взаимосвязь между химическими веществами и ионными каналами, роль внутриклеточных процессов в ходе и после действия трансммиттеров, равно как и иммунохимическое детектирование локализации трансммиттеров. Новые результаты, полученные с помощью простых модельных систем, расширяют основы знаний, полезных для понимания сходных процессов в ЦС высших животных и человека. Значительный интерес к рассматриваемым в сборнике материалам симпозиума вызывает и то обстоятельство, что они представлены широким кругом авторитетных исследователей из 15 стран мира.



СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ МОЗГА ПРИ ПОВРЕЖДЕНИИ МИНДАЛИНЫ И ТРАНСПЛАНТАЦИИ В ПОВРЕЖДЕННЫЙ УЧАСТОК ЭМБРИОНАЛЬНОЙ МОЗГОВОЙ ТКАНИ

ГУЛЯЕВА Н. В., ЕРМАКОВА И. В., КУРБАТОВА М. Б.,

ЛОСЕВА Е. В., ЛУЦЕКИНА Е. А., ОБИДИН А. Б., ХОНИЧЕВА Н. М.

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии АН СССР, Москва

В работе использовали 2 типа повреждения амигдалы у крыс: прокол стек-
лянной иглой с введением 0,1 мл физиологического раствора (I) и электрокоагу-
ляцию амигдалы (II). Через 10 дней после повреждения I или через 2 месяца после
повреждения II наблюдали достоверное снижение продуктов свободнорадикаль-
ного окисления липидов, сопровождающееся активацией перехвата супероксидных
радикалов в гомогенатах коры больших полушарий мозга. Сходные изменения на-
блюдали и в сыворотке крови животных. Через 1 месяц после повреждения I все
изученные параметры были в пределах нормы. В липидных экстрактах коры боль-
ших полушарий после повреждений I и II наблюдали снижение содержания хо-
лестерина и повышение содержания фосфолипидов. Трансплантация эмбриональ-
ной мозговой ткани в область повреждения усиливала все эффекты повреждения
миндалины. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в отдаленные сро-
ки после повреждения миндалины происходят генерализованные адаптивно-компен-
саторные сдвиги в ткани мозга, усиливающиеся при трансплантации.

Известно, что повреждение мозга, наряду с непосредственным
повреждающим действием, вызывает мобилизацию компенсаторно-
адаптивных механизмов. Так, показано, что повреждение мозга ока-
зывает эффекты, свидетельствующие о зависимом от времени после
повреждения повышении нейротрофной активности ткани мозга [1].
В определенный период после повреждения мозга мышцей (например,
через 1 неделю) увеличивается выживаемость животных в условиях
ишемического инсульта [2]. Эти и другие факты демонстрируют
реализацию адаптивно-компенсаторных процессов в реакции орга-
низма на повреждение. Мозговая ткань, введенная в поврежденный
мозг, способна усиливать в нем компенсаторно-восстановительные
процессы [3].

Ранее было показано, что снижение уровня свободнорадикаль-
ного окисления (СРО) в мозгу и сыворотке крови является биохимическим
коррелятом состояния адаптации животных к экстремаль-
ным условиям [4, 5], что позволяет предположить наличие опреде-
ленных компенсаторных сдвигов СРО при компенсаторно-регенера-
тивных процессах после повреждения мозга. Задачей настоящей ра-

боты была оценка состояния СРО липидов мозга при повреждении миндалины и трансплантации в поврежденный участок эмбриональной мозговой ткани.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на 70 белых беспородных крысах-самцах (масса к началу эксперимента 150—200 г). В работе использовали 2 типа повреждения мозга: 1) односторонний прокол стеклинной иглой диаметром 0,8 мм с введением 0,1 мл физиологического раствора в область миндалевидного комплекса; 2) обширное двустороннее удаление миндалины коагуляцией (ток 3,0 мА, 25—30 с). Частично животных с повреждением миндалины одновременно с введением физиологического раствора вводили 0,1—0,2 мм³ мозговой ткани из области миндалины 18—20-дневных эмбрионов крыс. В случае электрокоагуляции трансплантацию проводили через 5 дней. Все операции производили стерестактически под нембуталовым наркозом (40 мг/кг массы внутривенно). Правильность повреждения или удаления миндалины, а также приживление трансплантата подтверждали морфологически.

Животных декантировали через 10 суток или 1 месяц после прокола и через 2 месяца после коагуляции. Выделяли кору больших полушарий, в гомогенатах которой определяли содержание продуктов СРО, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [6], диеновых конъюгатов и кетодиенов [7], а также супероксидсминазную активность [8]. В липидных экстрактах мозга [9] измеряли содержание флуоресцирующих продуктов СРО [10], антиоксидентную активность в кумольной модели [11], содержание холестерина и фосфолипидных фракций [12]. В одной из экспериментальных серий дополнительно определяли содержание ТБК-активных продуктов [6], конъюгированных диенов и кетодиенов [7] и неферментативную супероксидперехватывающую активность [8] в сыворотке периферической крови.

Результаты исследования

В табл. 1 представлены данные о содержании в коре больших полушарий продуктов СРО и супероксидсминазной активности, а также характеристики липидного состава ткани мозга у крыс, взятых через 10 суток после прокола мозга и через 2 месяца после электрокоагуляции. Видно, что в обоих случаях повреждение мозга вызывает снижение уровня продуктов СРО, сопровождающееся активацией перехвата супероксидных радикалов. Трансплантация в поврежденный участок эмбриональной мозговой ткани усиливает эти изменения (исключение составляет лишь уровень кетодиенов). В серии исследований с электрокоагуляцией миндалины дополнительно исследовали уровень СРО в сыворотке крови (табл. 2). Содержание ТБК-активных продуктов в сыворотке крыс с коагуляцией миндалины составляло 54,5, а с трансплантацией—16,7% от контрольного уровня, содержание конъюгированных диенов—47,3 и 24,3%, кетодиенов—33,5 и 12,5%, интенсивность неферментативного перехвата супероксидных радикалов 192,6 и 296,6% (все различия между группами достоверны при $p < 0,01$). Поскольку изменения в крови близки к изменениям в мозгу, эффект повреждения мозга и нейротрансплантации на СРО можно считать генерализованным.

Влияние повреждения миндалин на характеристику свободнорадикального окисления и спектр липидов компоненты больших полушарий мозга крыс

Показатель	Условия опыта			
	прокол n=7	прокол + трансплан- тация n=7	электроко- агуляция n=19	электрокоа- гуляция + трансплантация n=5
ТБК-активные продукты	43.0** (29.2—54.2)	15.4*** (11.3—18.8)	56.1** (19.4—68.2)	18.3*** (12.9—21.2)
Конъюгированные ли- пены	83.3** (55.6—97.2)	38.9*** (27.8—55.6)	50.7** (41.1—61.6)	27.4*** (20.6—34.2)
Кетодienes	53.9** (38.5—76.9)	18.5** (—76.9)	36.8** (26.3—52.6)	13.2*** (0—26.3)
Основа Шиффа	87.4** (84.5—90.1)	77.9*** (75.4—80.6)	94.0** (90.2—96.3)	86.4*** (83.5—89.9)
Супероксидперехваты- вающая активность	179.7** (171.9—187.5)	209.4*** (200.0—218.8)	174.3** (160.1—188.1)	260.0*** (256.1—264.1)
Антиокислительная ак- тивность липидов	90.6** (85.6—98.4)	68.8*** (63.9—74.2)	71.9** (66.2—75.0)	62.4*** (58.9—65.7)
Окисляемость фосфоли- пидов	108.9 (100.0—112.1)	117.8*** (111.9—120.1)	117.1** (109.3—121.6)	120.4** (118.3—126.0)
Суммарные фосфоли- пиды	114.3** (110.4—119.3)	126.2*** (124.0—130.9)	112.6** (109.6—116.1)	126.0*** (123.0—130.9)
Холестерин	94.5** (91.1—96.3)	87.2*** (81.9—90.3)	80.1** (75.9—83.9)	64.7*** (60.3—69.5)
Холестерин / фосфоли- пиды	81.8** (78.3—83.1)	69.1*** (65.5—74.9)	71.1** (66.9—75.0)	51.5*** (49.0—55.1)
Сфингомиелин	70.6** (63.9—76.3)	31.4*** (26.9—33.0)	7.4** (62.4—75.0)	29.7*** (26.6—33.4)
Фосфатидилхолин	104.0** (100.0—107.3)	115.3*** (111.4—120.9)	101.5 (100.0—103.4)	115.8*** (112.8—120.6)
Фосфатидилсерин	106.8** (100.0—109.9)	110.0*** (109.9—112.6)	108.0** (100.0—110.3)	120.0*** (114.5—122.7)
Фосфатидилэтаноламин	106.2** (100.0—110.4)	115.4*** (111.1—119.9)	110.5** (103.5—112.6)	113.5*** (112.6—116.3)
Фосфатидилинозит	87.5** (80.1—93.1)	72.7*** (68.9—74.4)	74.8** (72.0—77.4)	45.6*** (40.3—49.9)

Примечание. Все показатели даны в % от контроля (n=15), принятого за 100% (в скобках—минимальные и максимальные величины). В соответствии с непараметрическим критерием Уилкоксона-Манна-Уитни обозначены достоверные отличия от группы «контроль» *p<0.01, **p<0.001 и от группы «прокол» или «электрокоагуляция» соответственно *p<0.01, **p<0.001. Срок наблюдения после прокола—10 суток, после коагуляции—2 месяца.

Таблица 2

Влияние электрокоагуляции миндалин и трансплантации на состояние свободнорадикального окисления в сыворотке крови животных

Показатель	Контроль n=12	Электрокоа- гуляция n=19	Электрокоагуля- ция + трансплан- тация, n=5
ТБК-активные продукты (ед. опт. пл./мл сыворотки)	2.7±0.1 100%	1.5±0.1** 54.5%	0.5±0.1*** 16.7%
Конъюгированные липены (ед. опт. пл./мл сыворотки)	0.52±0.07 100%	0.25±0.05** 47.3%	0.13±0.04*** 24.3%
Кетодienes (ед. опт. пл./мл сыво- ротки)	0.20±0.05 100%	0.07±0.02** 33.5%	0.03±0.01*** 12.5%
Неферментативный перекрут супер- оксидных радикалов (усл. ед.)	40±3 100%	77±6** 192.5%	119.±9*** 296.6%

Примечание. Достоверность различий обозначена как в табл. 1.

Содержание различных продуктов СРО коррелировало в мозгу животных; обнаружена также корреляция между уровнями одномоментных продуктов СРО в мозгу и крови. Так, в серии экспериментов с проколом мозга и нейротрансплантацией, включавшей 19 животных (группы «контроль», «прокол» и «прокол+трансплантация»), обнаружены следующие корреляции: ТБК-активные продукты—конъюгированные дисны, мозг $r=0,83$; ТБК-активные продукты—основания Шиффа, мозг $r=0,87$; ТБК-активные продукты—перехват супероксидных радикалов, мозг $r=0,80$; ТБК-активные продукты—мозг—кровь $r=0,90$; конъюгированные дисны—мозг—кровь $r=0,85$.

Из представленных в табл. 2 данных о состоянии липидной компоненты мозга крысы видно, что на изученных сроках повреждение мозга вызывает накопление фосфолипидов, снижение уровня холестерина и отношения холестерин—фосфолипиды. Окисляемость (расчетная величина, характеризующая отношение содержания легкоокисляемых липидов фосфатидилэтаноламина, фосфатидилсерина и фосфатидилинозита к содержанию трудноокисляемых фосфатидилхолина и сфингомиелина) возрастает, что, очевидно, вносит определенный вклад в снижение антиокислительной активности липидных экстрактов. Корреляционный анализ позволил выявить обратную линейную зависимость между антиокислительной активностью и содержанием фосфолипидов, прямую—между антиокислительной активностью и содержанием холестерина и обратную—между содержанием суммарных фосфолипидов и холестерина (коэффициенты корреляции в серии из 19 животных контрольных, с проколом и трансплантацией составляют соответственно $r=-0,81$, $-0,82$ и $-0,85$).

Изменения фосфолипидного спектра липидных экстрактов мозга в результате прокола или электрокоагуляции включали накопление фосфатидилсерина, фосфатидилэтаноламина и (недостовверное в случае коагуляции) фосфатидилхолина. Более выраженным было снижение содержания фосфатидилинозита и сфингомиелина. Трансплантация в поврежденный мозг эмбриональной мозговой ткани усиливала эффекты, выявленные после повреждения мозга, причем эффект трансплантации, как правило, был статистически достоверным (за исключением повышения окисляемости при коагуляции).

В серии, включавшей группу животных, подвергнутых проколу мозга в области миндалины с последующей трансплантацией, и соответствующую контрольную группу (всего 17 животных), не было обнаружено достоверных различий между подопытной и контрольной группами ни по одному из изученных параметров через 1 месяц после прокола (данные не приводятся).

Обсуждение результатов

Представленные результаты свидетельствуют о том, что повреждение мозга, в данном случае включающее и селективное повреждение миндалины, в отдаленные сроки после воздействия вызывает снижение интенсивности СРО, отмечаемое в мозгу и в крови и, следовательно, имеющее генерализованный характер. При этом происходит накопление фосфолипидов, прежде всего легкоокисляемых, и снижение доли холестерина в составе общих липидов мозга, следовательно, снижение отношения холестерин—фосфолипиды. Такие изменения окисляемости липидов и доли холестерина при снижении СРО соответствуют схеме Бурлаковой, согласно которой уровни СРО, индивидуальных липидов и их окисляемости являются взаимосвязанными переменными [13]. Повышение окисляемости фосфолипидов и источника холестерина неизбежно приводят к наблюдаемо-

му нами снижению антиокислительной активности липидов мозга. По данным Бурлаковой и соавт. [14] и нашим собственным данным, основные изменения липидного состава и фосфолипидного спектра в гомогенатах мозга при изменении интенсивности СРО соответствуют таковым в мембранных фракциях мозга, например, в синапсомах. В связи с этим полученные нами на гомогенатах коры больших полушарий результаты правомерно рассматривать относительно свойств мембран мозга.

Важно отметить, что изменения, подобные выявленным при повреждении мозга, соотношения СРО, интенсивности перехвата супероксидных радикалов и липидного состава гомогената, клеточных и субклеточных фракций мозга наблюдались нами ранее в условиях долговременной адаптации животных к хроническому эмоционально-болевого стрессу, когда развитию стадии адаптации соответствовало стабильное и длительное снижение уровня СРО на фоне усиленного перехвата супероксидных радикалов и снижения отношения холестерин-фосфолипиды. В соответствии с существующей точкой зрения [15], компенсаторные процессы—важные адаптивные реакции систем организма на повреждение—реализуются на основе тех же закономерностей, что и другие адаптационные реакции организма. Снижение СРО и липидные перестройки, наблюдаемые нами после повреждения мозга, могут быть рассмотрены как нейрохимические корреляты долговременной компенсации организма в ответ на это воздействие. Естественно, что степень компенсации и ее длительность зависят от характера повреждения. Из данных табл. 1 видно, что степень ингибирования СРО в мозгу и степень изменения липидной компоненты очень близки через 10 суток после прокола и через 2 месяца после коагуляции миндалин (второе воздействие значительно сильнее). При этом продолжительность компенсаторных изменений в ответ на более слабое воздействие (прокол) значительно меньше: через 1 месяц после прокола изменения отсутствуют, а через 2 месяца после коагуляции ярко выражены.

Трансплантация эмбриональной ткани в поврежденный участок мозга усиливает все изменения, вызываемые повреждением на стадии компенсации: ингибирование СРО, активацию супероксидперехватывающей активности, снижение уровня холестерина, отношения холестерин-фосфолипиды, антиокислительной активности, содержания сфингомиелина и фосфатидилинозита, повышение содержания суммарных фосфолипидов, фосфатидилсерина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилхоллина. Основываясь на упомянутой выше трактовке полученных данных в рамках реализации стадии долговременной компенсации, можно заключить, что эти результаты указывают на повышение уровня компенсации при трансплантации в поврежденный участок эмбриональной мозговой ткани. Этот вывод полностью подтверждает известный факт об усилении компенсаторно-регенеративных процессов в мозгу реципиента под влиянием нейротрансплантата [3].

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о том, что параметры СРО и липидный состав мозга являются нейрохимическими коррелятами компенсаторно-регенеративных процессов в мозгу.

LIPID PEROXIDATION INDUCED BY DAMAGE OF AMYGDALA AND TRANSPLANTATION OF EMBRYONIC BRAIN TISSUE INTO DAMAGE AREA

GULYAEVA N. V., ERMAKOVA I. V., KURBATOVA M. B., LOSEVA E. V.,
LUSHCHEKINA E. A., OBIDIN A. B., KHONICHEVA N. M.

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

Two types of rat amygdala damage were experimentally studied: (1) a puncture followed by injection of physiological solution (0.1 ml) into the damaged area and (2) electrocoagulation. Ten days after type 1 damage or two months after type 2 damage a stable LPO inhibition and increase of superoxide scavenging in cerebral cortex was observed. One month after type 1 damage these parameters returned to the normal level. A decrease in cholesterol level and increase in phospholipids were detected in lipid extracts of the cortex. Both types of damage decreased lipid peroxidation and increased non-enzymatic superoxide scavenging in the serum. Transplantation of embryonic brain tissue into the damaged area stimulated these effects. The data suggest that the damage of amygdala results in adaptive compensating generalized changes, which are stimulated by transplantation.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nieto-Sampedro M., Lewis E. R., Cotman C. W., Manthorpe M., Skaper S. D., Barlin G., Longo F. M., Varon S. *Science*, v. 217, № 3, p. 860—861, 1982.
2. Takahata Y., Shimoi K. *Brain Res.*, v. 381, № 2, p. 368—371, 1986.
3. Полежаев Л. В., Александрова М. А. Трансплантация ткани мозга в норме и патологии. М., Наука, 1986.
4. Гуляева Н. В., Левшина И. П., Обидин А. Б. — В сб.: Фундаментальные достижения нейробиологии—медицине, с. 181—182, Горький, 1987.
5. Обидин А. Б. — В сб.: Всесоюзный симпозиум по биохимии липидов, с. 202, Алма-Ата, 1987.
6. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. *Anal. Biochem.*, v. 95, № 2, p. 351—358, 1979.
7. Костюк В. А., Потанович А. И., Лунец Е. Ф. *Вопр. мед. химии*, т. 30, № 4, с. 125—127, 1983.
8. Nishikimi M., Rao N. A., Yagi K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 46, № 2, p. 843—854, 1972.
9. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. H. *J. Biol. Chem.*, v. 226, № 3, p. 497—509, 1957.
10. Fletcher B. L., Dillard C. J., Tappel A. L. *Anal. Biochem.*, v. 52, № 1, p. 1—9, 1973.
11. Кудрик А. Н., Смоленский В. Ф., Хусаинов В. И., Абиндер А. А. *Авт. свидетельство СССР № 1273801*, 1985. *Бюлл. изобр.* № 44, 1986.
12. Osborn N. N. — In: *Microrochemical analysis of nervous tissue*, p. 122—152. New York, Pergamon Press, 1974.
13. Бурлакова Е. Б. — В сб.: Свободнорадикальное окисление липидов в норме и патологии, с. 74—83, М., Наука, 1978.

14. Буракова Е. Б., Архипова Г. В., Чернявская Л. Н. Биол. мембраны, т. 4, № 2, с. 165—171, 1987.
15. Меерсон Ф. З. — В сб.: Физиология адаптационных процессов, с. 481—491, М., Наука, 1986.

Поступила 20.XII.1989

Calcium and Calcium Binding Proteins. Molecular and Functional Aspects. Springer—Verlag, Berlin, 260 p., 1988.

Кальций и кальцийсвязывающие белки. Молекулярные и функциональные аспекты.

Книга является актуальным обзором существующих сведений о роли кальция и кальцийсвязывающих белков в некоторых биологических системах, в том числе в скелетных, сердечной и гладких мышцах. Особое внимание уделяется EF—и кальцийсвязывающим белкам (парвальбумину, кальмодулину), их роли в различных внутриклеточных процессах в связи с особенностями их молекулярного строения. Рассматриваются различные механизмы регуляции концентрации внутриклеточного кальция на молекулярном уровне, в том числе модуляция перемещения кальция между вне- и внутриклеточным пространством, а также между цитоплазмой и другими клеточными образованиями, например, митохондриями, саркоплазматическим ретикуломом.



УДК 612.82+577.15/17

**СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫЙ БАНК ДАННЫХ ПО ПРИРОДНЫМ
РЕГУЛЯТОРНЫМ ОЛИГОПЕПТИДАМ EROR—MOSCOW****ЗАМЯТНИН А. А.**

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

К настоящему времени известно несколько сотен природных олигопептидов, участвующих в функционировании нервной, иммунной и эндокринной систем. Сведения об их структуре и функциях занесены в специально созданный банк данных. В нем собрана информация о 619 регуляторных олигопептидах с суммарным числом 11158 аминокислотных остатков. Большинство молекул содержит около 10 остатков при выбранном интервале от 2 до 50. На основании полученных результатов дано определение различия между олиго- и полипептидами.

Известно, что относительно небольшие природные соединения олигопептиды в сравнении с белками обладают не только существенно меньшим числом аминокислотных остатков, но и заметно иным спектром биологической активности [1]. Эти вещества привлекают к себе все большее внимание ввиду их важной роли в функционировании различных регуляторных систем организма. Короткие пептиды обладают свойством быть регуляторами различных отделов нервной (нейропептиды), иммунной (пептидные иммуномодуляторы), эндокринной (пептидные гормоны) систем. При этом отмечено, что один и тот же олигопептид способен участвовать в различных типах регуляторных процессов [2, 3], и это позволяет считать их полифункциональными.

Наибольшая информация о структуре и функциях природных молекул пептидной природы к настоящему времени заключена в банке данных, основой которых являются аминокислотные и нуклеотидные последовательности [4—6]. При этом сформированы банки данных как для любых природных пептидных структур [4], так и банки, специализированные по различным структурным и функциональным категориям, например, для сигнальных пептидов [5] или для характеристики функциональных свойств α -химотрипсина [6].

Для того, чтобы иметь возможность рассматривать класс регуляторных олигопептидов с единых позиций, нами сформирован банк данных об их структуре и функциях, ограниченный определенным спектром функциональной активности. Этот банк построен на основе доступных данных, с использованием специальных программ типа DBASE для персонального компьютера системы IBM—PC/AT.

Ему присвоено название EROP — Moscow (Endogenous Regulatory Oligopeptides).

Методические приемы

Основой банка является специализированный файл SEQUENCE, предназначенный для характеристики однозначной величины — первичной структуры природных одноцепочечных пептидных молекул, а также для внесения сопутствующих сведений. Таким образом, каждая запись содержит уникальную природную аминокислотную последовательность, не встречающуюся в других записях.

Таблица:

• Display structure Structure for file: A: SEQUEN31
 DBF Number of records: 00619
 Date of last update: 01/04/89
 Primary use database

Fid	Name	Type	Width	Dec
001	FAM:NMB::K	C	006	
002	FAM:NAME::K	C	004	
003	PEP:NMB::K	C	003	
004	PEP:NAME::K	C	041	
005	ABB:NAME::K	C	013	
006	FST:B:C::K	C	003	
007	FST:SPEC::K	C	003	
008	FST:ORG::K	C	003	
009	FST:SUB::K	C	003	
010	EDG:ORIG::K	L	001	
011	EXG:SPEC::K	C	003	
012	MPTRINBAFK	C	010	
013	PRECURS::K	L	001	
014	AAR:SUM::K	N	002	
015	TSR:SUM::K	N	002	
016	M:W:::K	N	006	001
017	SEQ:1:::K	C	053	
018	SEQ:3:::V	C	209	
019	SYN:NAME::V	C	015	
020	TAXON:::V	C	027	
021	ANIX:SEQ::V	C	004	
022	ALL:B:CL::V	C	015	
023	ALL:SPEC::V	C	015	
024	ALL:ORG::V	C	015	
025	ALL:SUB::V	C	015	
026	SS:BONDS::V	C	006	
027	N:STND:R::V	C	012	
028	SEQ:REF::V	C	240	
029	COMMENTS::V	C	210	
030	YEAR:SEQ::V	C	035	
031	COUNTRY::V	C	006	
032	ADD:INFM::V	C	019	

* Total *

01001

Распечатка структуры файла SEQUENCE (31-й релиз). Каждому полю соответствует сокращенное название вводимой в банк характеристики (1—5: нумерация и названия олигопептидов и их семейств; 6—9: биологическая локализация олигопептида, выделения впервы; 10—11: эндогенность/экзогенность; 12: известные типы функций; 13: наличие данных о предшественнике; 14—15: число аминокислотных остатков, концевых радикалов; 16: величина Mr; 17—18: аминокислотные последовательности; 19: синонимы названия олигопептида; 20: таксон; 21: способ определения последовательности; 22—25: прочие источники выделения; 26—27: до-

Файл SEQUENCE, как и все другие файлы банка, содержит константную и переменную части (таблица). Первая составлена из полей 1—17 и содержит сведения об общих характеристиках олигопептида, включающих терминологию, элементы классификации, биологический источник, из которого данный олигопептид был выделен впервые, аминокислотную последовательность, величины числа аминокислотных остатков и величины M , перечень основных типов активности, наличие сведений о предшественнике. Эти данные целесообразно повторять и во всех других файлах, предназначенных для подробной характеристики функциональных или иных свойств олигопептида. Переменная часть, различная для разных файлов, занимает поля с 18 по 32 и в случае файла SEQUENCE содержит более подробные сведения о структуре, источниках выделения, литературные ссылки и другие сопутствующие сведения.

Для определенности нами были выбраны четыре произвольные широко распространенные функциональные характеристики, которыми часто описывают активность нейропептидов: влияние на сокращение гладкой мускулатуры, регуляция кровяного давления, терморегулирующие свойства и рилизинговая активность. Олигопептид считался активным в том случае, если он обладал одним (или более) типом указанной активности, и это служило основанием для включения его в банк данных [10].

Банк данных EROP—Moscow сформирован с помощью стандартных программ типа dBase. В то же время создан целый ряд специализированных программ, которые позволяют решать задачи, связанные с особенностями структуры, функций, локализации и т. д. В целом сформированный банк представляет собой также самостоятельный объект исследований, на котором можно проводить анализ сходства и различий важнейших характеристик регуляторных олигопептидов.

Результаты исследования

По публикациям, содержащим данные до 1988 г. включительно, в банк данных введены сведения о 525 природных олигопептидах, обладающих заданным спектром активности. Как выяснилось, указанное выше ограничение спектра функциональной активности не привело к отсеиванию большинства олигопептидов, широко известных не по выбранным нами функциям. Среди введенных в банк структур оказались натрийуретические пептиды млекопитающих, адипокинетические гормоны насекомых и другие, одни названия которых уже свидетельствуют об иных типах функциональной активности. Реальный функциональный спектр активности указанных 525 олигопептидов много богаче, чем выбранный вначале и включает в себя действие многих из них на поведенческую, сон, обучаемость, память, диурез, иммунитет и т. д. (подобная особенность, по нашему мнению, заслуживает отдельной публикации). Нами были обнаружены также еще 94 олигопептида, для которых в настоящее время отсутствуют указания о принадлежности к заданному вначале функциональному

полнотелые характеристики химической структуры: 28, 30—31: ссылки на публикации по определению первичной структуры; 29, 32: комментарии и дополнительная информация). Константные и переменные поля помечены соответственно буквами K и V. Типы полей обозначены тремя буквами: C—текстовая, N—числовая и L—логическая информация, Width характеризует длину поля. Для числовых данных можно указать количество знаков после запятой (Dec).

спектру активности. Сведения об этих олигопептидах также включены в банк данных.

Таким образом, на 1 января 1989 г. банком данных описано 619 природных олигопептидов с общим числом аминокислотных остатков, равным 11158. Если учитывать не только боковые, но и концевые радикалы олигопептидов, то суммарное число всех выступающих из пептидного остова радикалов составит 12310.

Спектр биологических источников регуляторных олигопептидов оказался довольно широким. Включенные в банк молекулы выделялись из 6 биологических типов: Protozoa, Coelenterata, Echinodermata, Amphipoda, Mollusca и Chordata. Среди последних наибольшее число получено из представителей млекопитающих (от мыши до слона) и многочисленных видов лягушек.

Существующие белковые банки данных достаточно полно отражают аминокислотные последовательности, содержащие многие десятки, сотни и даже тысячи аминокислотных остатков. В описываемый же нами банк данных включены олигопептиды с числом остатков от 2 до 50 (рис. 1). Как оказалось, именно в этом интервале раз-

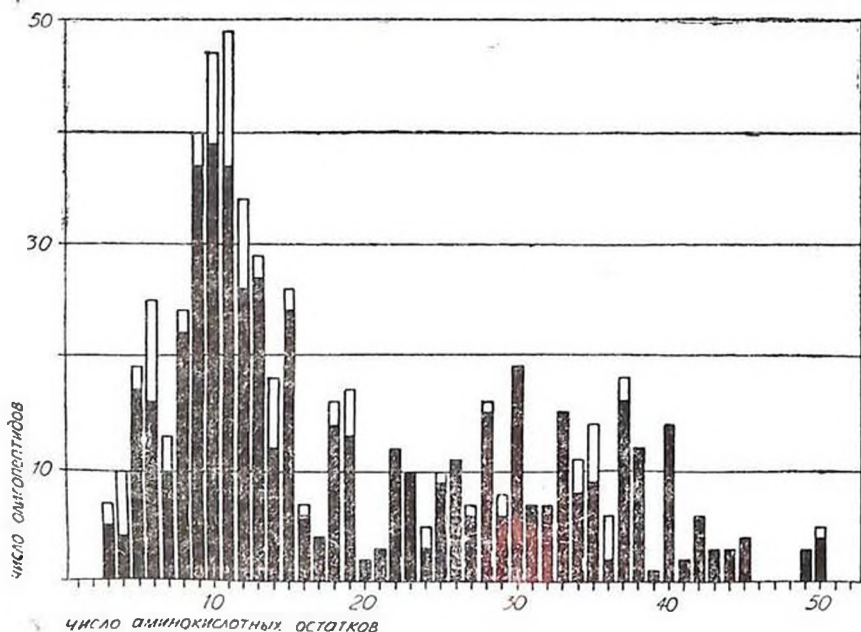


Рис. 1. Распределение числа регуляторных олигопептидов по числу аминокислотных остатков N. Затрихованная часть представляет собой число олигопептидов с заданным (см. текст) спектром активности.

местилось наибольшее число олигопептидов, обладающих наиболее характерными регуляторными свойствами, которые описываются заданным нами спектром функциональной активности. Следует также

отметить, что ввиду значительной конформационной подвижности олигопептидов [11] их выступающие наружу радикалы (боковые и концевые) хорошо доступны окружению (например, рецепторам). В то же время, из-за усиления внутримолекулярных взаимодействий конформационная подвижность олигопептидов с увеличением длины молекулы падает и при $N > 50$, где N — число аминокислотных остатков; из них могут образовываться достаточно устойчивые глобулы с иным спектром функциональной активности [12]. Этим, по-видимому, можно объяснить то, что на рис. 2 число олигопептидов с заданным длиной молекулы при больших N заметно снижается. В этом распределении достаточно ясно виден максимум вблизи $N = 10$, а также, возможно, и в районе 30 аминокислотных остатков. Заметим при этом, что среднее число аминокислотных остатков в одном олигопептиде из 619 должно было бы равняться примерно 18. Выявленные на рис. 2 преимущественные области содержания числа аминокислотных остатков могут оказаться оптимальными с физико-химической точки зрения для взаимодействия лиганда с рецептором.

Обсуждение результатов

Сформированный банк данных вместе с имеющимися для него стандартными и специально созданными программами может быть основой для структурно-функционального классифицирования любого нового природного или искусственно синтезированного (но составленного из стандартных аминокислотных остатков) олигопептида. После введения в банк сведений о его аминокислотной последовательности в результате соответствующей обработки можно ответить, например, на следующие вопросы:

обладает ли исследуемый олигопептид аминокислотной последовательностью, характерной для уже ранее известной молекулы; является ли этот олигопептид фрагментом уже изученного;

имеется ли структурное сходство у исследуемого олигопептида с каким-либо уже известным, а также к какому структурно-функциональному семейству он может быть отнесен;

имеет ли исследуемый олигопептид уникальную (новую) аминокислотную последовательность, не выявленную ранее ни для одного из изучавшихся олигопептидов.

Таким образом, выявление достаточного сходства структуры (на уровне аминокислотной последовательности) изучаемого олигопептида и представителя хорошо изученного семейства может открыть новые возможности прогнозирования его функциональных свойств до проведения соответствующего биологического тестирования.

На основании полученных результатов можно также сделать попытку ответить на вопрос о том, какие пептиды следует считать малыми (олигопептидами), а какие большими (полипептидами). Для этого воспользуемся соображениями о малых и больших числах, упомянутыми автором в 1958 г. на семинаре А. Н. Колмогорова, которые не удалось обнаружить в опубликованном виде [13].

В случае чисел малыми предлагалось называть такие, величина которых составляет значение порядка величины системы счисления (то есть в десятичной системе величину порядка 10). Большими же числами тогда будут те, которые много больше величины системы счисления.

Аналогом порядка системы счисления в пептидах естественно выбрать число составляющих их аминокислотных остатков, природное разнообразие которых описывается величиной 20. Продолжая

аналогно, олигопептидами будем называть такие молекулы, для которых N порядка 20, то есть $N > 20$ или $N \leq 20$ при $N \neq 1$. В то же время для полипептидов (обычно белков) $N \gg 20$. Однако вследствие физико-химического сходства ряда радикалов аминокислотных остатков (остатки треонина и серина, аргинина и лизина и др.) [1] реальная система счисления в случае олигопептидов составит величину, меньшую, чем 20.

На основании проведенных рассуждений рассмотрим общую схему распределения природных пептидов в зависимости от числа N . На рис. 3 вся занимаемая ими область находится в пределах от 2 (дипептиды) до примерно 10 аминокислотных остатков. Левое и правое подраспределение относится к олиго- и полипептидам соответственно. Их частичное перекрывание обусловлено многообразием возможных вариантов аминокислотных составов и последовательностей, среди которых в области перекрывания могут обнаружиться молекулы с явной тенденцией к глобулярной структуре при достаточно малых N (этому, например, способствует наличие дисульфидных мост-

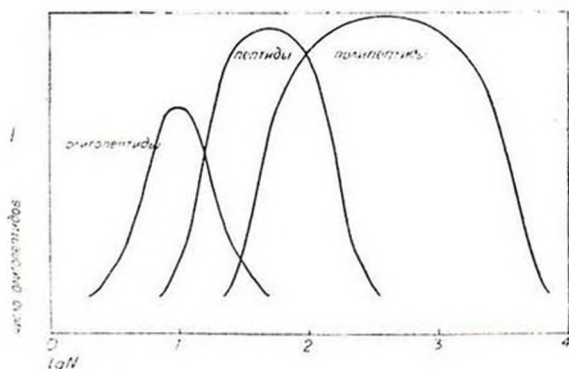


Рис. 2. Классификация общепринятых определений пептидов. По оси ординат—число веществ пептидной природы в произвольных единицах

тиков у остатков цистеинов). На рис. 2 показана также и промежуточная область с не слишком большим N («средние пептиды»). Эту область в значительной мере занимают ферменты [14], одна из функций которых заключается в том, чтобы переводить полипептиды в олигопептиды. Очевидно, что выбор конкретных спектров функций может привести к другим типам распределений.

Число расшифрованных аминокислотных последовательностей регуляторных олигопептидов продолжает быстро расти. Из рис. 3 видно, что к настоящему времени в год расшифровывается уже более 60 таких последовательностей. Судя по оценке [15], общее число природных регуляторных олигопептидов для одного организма составляет, по-видимому, величину порядка 10000. Поэтому следует ожидать, что параллельное развитие компьютерной техники и увеличение возможности записывания большей информации на од-

ном носителе позволит и далее использовать персональные компьютеры для хранения данных и исследования природных олигопептидов без использования крупных вычислительных комплексов.

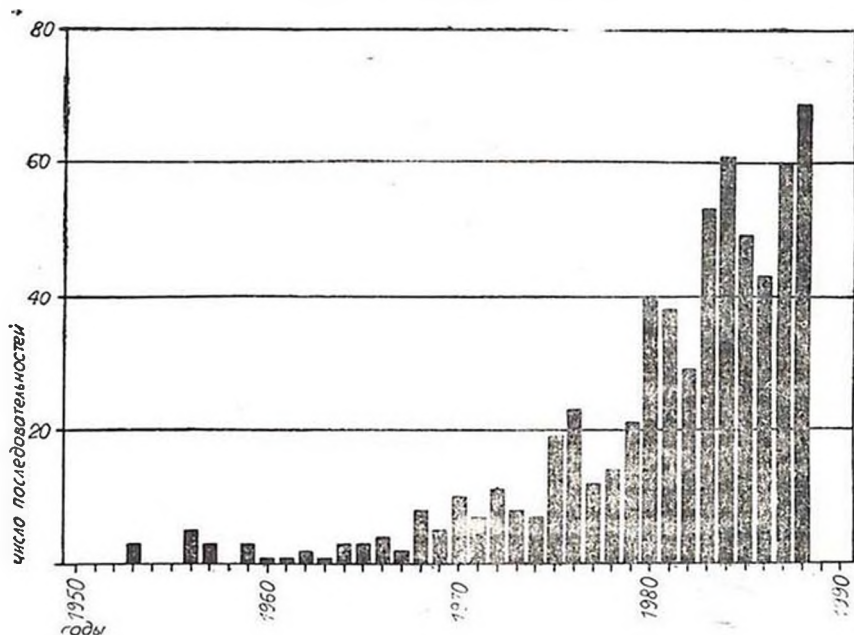


Рис. 3. Рост числа расшифрованных аминокислотных последовательностей природных регуляторных олигопептидов. Видно, что к настоящему времени расшифровывается более 60 первичных структур в год

Автор приносит благодарность К. В. Судакову и В. В. Шерстневу за постоянную поддержку этой работы, а также П. К. Климову, А. М. Молчанову и Ю. Л. Соколову за плодотворные дискуссии и советы.

EROP-MOSCOW SPECIALIZED DATA BANK FOR ENDOGENOUS REGULATORY OLIGOPEPTIDES

ZAMYATNIN A. A.

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

At present we know several hundred endogenous oligopeptides participating in the functioning of the nervous, immune and endocrine systems. The information on their structure and functions was collected in a specially created data bank. Data on 619 regulatory oligopeptides with the total number of amino acid residues of 11158 have been collected.

Most molecules are about 10 amino acid residues in length, the range being from 2 to 50. The result obtained permitted us to define some differences between oligo- and polypeptides.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ленинджер А. Основы биохимии, т. 1, М., Мир, 1985.
2. Morley J. E., Kay N. E., Solomon G. P., Plotnikoff N. P. *Life Sci.*, v. 41, № 5, p. 527-544, 1987.
3. Scharrer B. *Ann. Rev. Neurosci.*, v. 10, p. 1-17, 1987.
4. Orcutt B. C., George D. G., Dayhoff M. O. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, v. 12, p. 419-441, 1983.
5. Claverie J. -M., Sauvaget I. *Nature*, v. 318, № 6041, p. 19, 1985.
6. George D. G., Mewes H. W., Kihara H. *Protein Sequence and Data Analysis*, v. 1, № 1, p. 27-39, 1987.
7. Claverie J. -M., Bricault L. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, v. 1, № 1, p. 60-65, 1986.
8. von Heijne G. *Protein Sequence and Data Analysis*, v. 1, № 1, p. 41-42, 1987.
9. Keil B. *Protein Sequence and Data Analysis*, v. 1, № 1, p. 13-20, 1987.
10. Замятнин А. А. Докл. АН СССР, т. 292, № 5, с. 1261-1264, 1987.
11. Karle I. L. -In: *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology* (eds. Gross F., Melenhofer J.), p. 1-54, New York, Acad. Press, 1981.
12. Привалов П. Л. *Биофизика*, т. 30, № 4, с. 722-733, 1985.
13. Zamyatnin A. A. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, v. 13, p. 145-165, 1984.
14. Nashikawa K., Kubota Y., Ooi T. J. *Biochem.*, v. 94, № 3, p. 981-995, 1983.
15. Ашмарин Н. П. Чтения им. А. Д. Сперанского, с. 5-16, 1984.

Поступила 18.VIII.1989

СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫЙ БАНК ДАННЫХ EROP—MOSCOW

Специализированный банк данных EROP—Moscow Endogenous Regulatory OligoPeptides содержит сведения об олигопептидах, для которых полностью расшифрована первичная структура (аминокислотная последовательность), охарактеризован спектр функциональной активности, известно место образования в живом организме. Эти и ряд других характеристик относятся к природным одноцепочечным олигопептидам, содержащим от 2 до 50 аминокислотных остатков. На 1 января 1990 года банк EROP—Moscow содержал записи о 819 регуляторных олигопептидах, включающих 16 811 аминокислотных остатков или 18 351 боковой аминокислотный радикал вместе с концевыми группами. Пополнение банка осуществляется 3 раза в год.

Банк EROP—Moscow сформирован с помощью компьютера системы IBM—PC/AT на основе стандартных программ типа dBASE, а также снабжен рядом специализированных программ.

С помощью банка EROP—Moscow на договорной основе можно выполнять следующие заказы:

1. Выдавать информацию о первичной структуре пептидов с указанием литературных источников (25 руб. за 1 запись);

Most molecules are about 10 amino acid residues in length, the range being from 2 to 50. The result obtained permitted us to define some differences between oligo- and polypeptides.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ленинджер А. Основы биохимии, т. 1, М., Мир, 1985.
2. Morley J. E., Kay N. E., Solomon G. P., Plotnikoff N. P. *Life Sci.*, v. 41, № 5, p. 527-544, 1987.
3. Scharrer B. *Ann. Rev. Neurosci.*, v. 10, p. 1-17, 1987.
4. Orcutt B. C., George D. G., Dayhoff M. O. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, v. 12, p. 419-441, 1983.
5. Claverie J. -M., Sauvaget I. *Nature*, v. 318, № 6041, p. 19, 1985.
6. George D. G., Mewes H. W., Kihara H. *Protein Sequence and Data Analysis*, v. 1, № 1, p. 27-39, 1987.
7. Claverie J. -M., Bricault L. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, v. 1, № 1, p. 60-65, 1986.
8. von Heijne G. *Protein Sequence and Data Analysis*, v. 1, № 1, p. 41-42, 1987.
9. Keil B. *Protein Sequence and Data Analysis*, v. 1, № 1, p. 13-20, 1987.
10. Замятнин А. А. Докл. АН СССР, т. 292, № 5, с. 1261-1264, 1987.
11. Karle I. L. -In: *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology* (eds. Gross F., Melenhofer J.), p. 1-54, New York, Acad. Press, 1981.
12. Привалов П. Л. *Биофизика*, т. 30, № 4, с. 722-733, 1985.
13. Zamyatin A. A. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, v. 13, p. 145-165, 1984.
14. Nashikawa K., Kubota Y., Ooi T. J. *Biochem.*, v. 94, № 3, p. 981-995, 1983.
15. Ашмарин Н. П. Чтения им. А. Д. Сперанского, с. 5-16, 1984.

Поступила 18.VIII.1989

СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫЙ БАНК ДАННЫХ EROP—MOSCOW

Специализированный банк данных EROP—Moscow Endogenous Regulatory OligoPeptides содержит сведения об олигопептидах, для которых полностью расшифрована первичная структура (аминокислотная последовательность), охарактеризован спектр функциональной активности, известно место образования в живом организме. Эти и ряд других характеристик относятся к природным одноцепочечным олигопептидам, содержащим от 2 до 50 аминокислотных остатков. На 1 января 1990 года банк EROP—Moscow содержал записи о 819 регуляторных олигопептидах, включающих 16 811 аминокислотных остатков или 18 351 боковой аминокислотный радикал вместе с концевыми группами. Пополнение банка осуществляется 3 раза в год.

Банк EROP—Moscow сформирован с помощью компьютера системы IBM—PC/AT на основе стандартных программ типа dBASE, а также снабжен рядом специализированных программ.

С помощью банка EROP—Moscow на договорной основе можно выполнять следующие заказы:

1. Выдавать информацию о первичной структуре пептидов с указанием литературных источников (25 руб. за 1 запись);

2. Выдавать дополнительную информацию о функциях пептидов с литературными источниками (15 руб. за 1 источник);

3. Проводить анализ первичной структуры любого пептида с целью выявления сходства со структурами, содержащимися в банке (250 руб. за 1 анализ);

4. Формировать новые специализированные базы данных (500 руб. за разработку структуры 1 банка);

5. Решать прочие задачи (по договорной цене).

В ряде случаев по согласованию с заказчиком указанная ориентировочная цена может быть увеличена или уменьшена.

Результаты выдаются в виде распечатки или в виде записи на стандартный (3- или 5-дюймовый) диск, предоставляемый заказчиком.

Продаваемая информация не может быть передана третьим организациям или лицам.

С заказами обращаться по адресу:

103009, Москва, ул. Герцена, 6,
Институт нормальной физиологии
им. П. К. Анохина АМН СССР
Тел. 155-47-30

**МОДУЛИРОВАНИЕ ФЕНАМИНОМ И β -ФЕНИЛЭТИЛАМИНОМ
ВЫСВОБОЖДЕНИЯ $[^3\text{H}]$ -Д-АСПАРАГИНОВОЙ КИСЛОТЫ
ИЗ СИНАПТОСОМ КОРЫ МОЗГА КРЫС**

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

НИИ фармакологии АМН СССР, Москва

В последнее время появились исследования, посвященные выяснению возможного участия рецепторов возбуждающих аминокислот—глутаминовой и аспарагиновой—в механизме действия психотомиметических веществ. Так, показано, что диссоциативные анестетики (фенциклидин, кетамин), бензоморфиновые опиоиды и производные диоксолана способны взаимодействовать с N-метил-D-аспартатным подтипом глутамат/аспартатных рецепторов [1, 2] по некооперативному (по отношению к действию самого N-метил-D-аспартата) механизму. Меньше внимания уделяется выяснению возможного участия глутамат/аспартатных механизмов в действии таких психостимулирующих соединений, как эндогенный амин β -фенилэтиламин и его α -метильное производное фенамин, злоупотребление которым приводит к развитию клинической картины острого психоза с шизофреническими признаками [3]. Возможность участия иных подтипов глутамат/аспартатных рецепторов, а именно, квисквалатного и канниатного, в механизмах действия соединений с психостимулирующими свойствами до настоящего времени не исследовалась. Ранее нами было высказано предположение о наличии ауторецепторов квисквалатного и канниатного подтипов на корковых терминалях глутамат/аспартатергических нейронов [4] и обнаружено ингибирующее влияние фенамина в отношении K^+ -стимулируемого высвобождения $[^3\text{H}]$ -D-аспарагиновой кислоты из перфузируемых синапсом коры мозга крыс [5], совпадающее по своей направленности с эффектами квискваловой и канниовой кислот. Методики исследования детально описаны в наших предыдущих сообщениях [4, 5]. В настоящей работе изучалось влияние β -фенилэтиламина на стимулированное высвобождение $[^3\text{H}]$ -D-аспарагиновой кислоты с последующей оценкой эффекта совместного использования психостимулирующих веществ с антагонистом квисквалатного подтипа глутамат/аспартатных рецепторов диэтиловым эфиром глутаминовой кислоты (ДЭЭГ) и известным агонистом одного из подтипов этих рецепторов канниовой кислотой.

В таблице приведены результаты экспериментов по изучению влия-

ния фенамина и β -фенилэтиламина на стимулируемое высвобождение [^3H]Д-аспарагиновой кислоты. Можно видеть, что β -фенилэтиламин, так же как и фенамин, оказывает угнетающее влияние на высвобождение метки, в то время как ДЭЭГ отчетливо противодействует этим эффектам. Рисунок иллюстрирует результаты опытов, в которых од-



Рис. Влияние фенамина на ингибирующий эффект каннатовой кислоты по отношению к К⁺-стимулируемому высвобождению [^3H]Д-аспарагиновой кислоты. По оси ординат—высвобождение метки в % от контроля. Приведены значения $\bar{M} \pm S. E. M.$ 6—12 независимых экспериментов. 1—контроль (K^+ 30 мМ); 2—фенамин, 10^{-5} М; 3—каннотая кислота, 10^{-4} М; 4—каннотая кислота, 10^{-4} М+фенамин, 10^{-5} М; *—достоверность отличий от контроля при $p < 0,05$; **—достоверность отличий от эффекта каннотой кислоты, 10^{-4} М при $p < 0,05$; (двусторонний U-критерий Манна-Уитни)

Таблица

Влияние фенамина и фенилэтиламина на стимулируемое высвобождение [^3H]Д-аспарагиновой кислоты

Вещество	Концентрация (М)	Число опыта	Высвобождение [^3H]Д-аспарагиновой кислоты в % от контроля
Контроль	—	40	100,0 ± 2,5
Фенамин	10 ⁻⁵	7	95,1 ± 5,2
	10 ⁻⁴	7	87,1 ± 3,4*
Фенамин + диэтиловый эфир глутаминовой кислоты	10 ⁻⁴	7	102,2 ± 5,3**
β -Фенилэтиламин	10 ⁻⁵	6	106,1 ± 3,8
	10 ⁻⁴	5	89,7 ± 2,2*
β -Фенилэтиламин + диэтиловый эфир глутаминовой кислоты	10 ⁻⁴	6	116,9 ± 7,7***

Примечание. Приведены данные $\bar{M} \pm m$; достоверность определялась по U-критерию, *—достоверность отличий от контроля (в присутствии 30 мМ К⁺) при $p < 0,05$; **, ***—достоверность отличий при $p < 0,05$ от влияния фенамина и β -фенилэтиламина соответственно

повременно использовались каннотая кислота и фенамин, причем последний применялся в концентрации 10^{-5} М, при которой собственный ингибирующий эффект фенамина не наблюдается. Как видно из рисунка, фенамин в этих условиях практически полностью устранял ингибирующий эффект каннотой кислоты на высвобождение [^3H]Д-аспарагиновой кислоты.

Приведенные данные указывают на то, что на уровне окончаний глутамат/аспартатергических нейронов в коре мозга может иметь место функциональные взаимодействия исследуемых нехотистимуляторов с ауторецепторными механизмами. Возможно, что полученные результаты объясняют, в частности, факт изменения количества мест связывания каннотой кислоты в коре мозга людей и крыс, длительное время получавших фенамин или его производное метамфетамин [5].

6]. Вопрос о собственно лиганд-рецепторном взаимодействии психостимулирующих аминов с квинквалатными и канинатыми рецепторами требует иных методических подходов и в рамках данной работы не рассматривался.

MODULATION OF [³H]-D-ASPARTATE RELEASE FROM SYNAPTOSOMES OF RAT BRAIN CORTEX BY AMPHETAMINE AND BETA-PHENYLETHYLAMINE

FRIKHOZHAN A. V., K VALEV G. I., RAYEVSKY K. S.

Institute of Pharmacology, the USSR Academy of Medical Sciences, Moscow

B-Phenylethylamine and its beta-methyl derivative, amphetamine, decrease K⁺-stimulated (30 mM) release of [³H]D-aspartate from perfused synaptosomes of rat brain cortex. This effect is reduced by glutamic acid diethyl ester. Amphetamine levels too low to modify the release of [³H]D-aspartate, abolished the inhibitory action of kainic acid. A possible functional interaction between psychostimulants and excitatory aminoacid autoreceptors is discussed.

ЛИТЕРАТУРА

1. Coan E. J., Collingridge G. L. Br. J. Pharmacol. v. 91, p. 547—556, 1987.
2. Berry S. C., Lodge D. T. J. Physiol. v. 364, p. 34P, 1985.
3. Kashizabara K. Biol. Psychiatry, v. 19, p. 1173—1175, 1984.
4. Прихожан А. В., Ковалев Г. И., Раевский К. С. Нейрохимия, т. 5, № 4, с. 341—347, 1986.
5. Прихожан А. В., Ковалев Г. И., Раевский К. С. Фармакол. токсикол., т. 1, с. 10—14, 1987.
6. Nishikawa T., Takashima M., Toi M. Neurosci. Lett., v. 40, p. 245—250, 1983.

Поступила 10.1.1990

Neuroscience Year: Supplement 1 to the Encyclopedia of Neuroscience (ed. G. Adelman), Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, 184 p., 1989.

Год нейронаук: приложение 1 к «Энциклопедии нейронаук».

Сборник является первым томом будущего ежегодного или двухгодичного издания приложений к «Энциклопедии нейронаук». В рассматриваемом томе представлено 65 статей, написанных видными специалистами в области нейронаук. Они посвящены новейшим развивающимся областям нейронаук или новым перспективам, открывающимся в базовых представлениях этой области знания. Книга представляет интерес для специалистов по нейронаукам, бионаукам, практикующих врачей, студентов и преподавателей.



УДК 612.82+577.112.384.2+577.175.82

ЛАТЕРАЛИЗАЦИЯ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ И ЗАХВАТА
АМИНОКИСЛОТ В ГОЛОВНОМ МОЗГУ КРЫС

РАХИМОВ Р. Н., КАЛАУС Н. Э., РАХИМОВА Н. Н.

*ДОЛГО-САБУРОВ В. Б., КРЫЛОВ С. С.

НИИ профилактической медицины ЭстССР, Таллинн

*Институт токсикологии МЗ СССР, Ленинград

Функциональная асимметрия мозга в настоящее время рассматривается как одна из наиболее значимых проблем нейробиологии, однако, несмотря на обширную феноменологию физиологических проявлений асимметрии, ее нейрохимические основы продолжают оставаться во многом неясными. Учитывая многообразие функций свободных аминокислот в ЦНС, было предпринято изучение асимметрии распределения некоторых аминокислот в различных отделах мозга крыс и проведена оценка параметров захвата некоторых из них перживающими срезами коры больших полушарий.

В опытах использовали 269 беспородных белых крыс обоего пола массой 200—240 г, находившихся на стандартном пищевом рационе со свободным доступом к воде и пище. Кормление животных прекращали за сутки до опыта. Для количественного определения свободных аминокислот брали симметричные участки лобной коры, гипоталамуса, среднего мозга и мозжечка. Выделение структур вели по атласам [1, 2]. Количественное определение свободных аминокислот проводили на автоматическом аминокислотном анализаторе LC 7000 («Biotronic»). Коэффициент асимметрии (K_{ac}) по каждой аминокислоте рассчитывали как отношение содержания аминокислоты в левой половине к содержанию в правой половине изучаемого участка мозга. Латерализацию считали «левой» — при $K_{ac} > 1,07$, «правой» — при $K_{ac} < 0,93$, а значения $0,93 \leq K_{ac} \leq 1,07$ оценивали как свидетельство симметричного содержания данной аминокислоты. Изучение захвата ГАМК и аспарагиновой кислоты проводили на переживающих срезах симметричных участков лобных долей коры головного мозга. Срезы получали одновременно по методу, описанному ранее [3]. Срезы инкубировали при 37° в течение 3—5 мин при непрерывном встряхивании в приборе в инкубационной среде следующего состава (ммоль/л): KCl—5,0; CaCl₂—1,4; KH₂PO₄—1,24; MgSO₄—1,3; NaHCO₃—3,8; Na₂HPO₄—8,3; глюкоза—10,0, содержащей изучаемые [³H]аминокислоты. По окончании инкубации срезы дважды промывали средой инкубации, не содержащей метки, и гомогенизировали в физиологическом растворе. 0,05 мл полученного гомогената (что соответствовало 50 мг белка) вносили в 5,0 мл коктейля Брея. Счет

радиоактивности проб вели на анализаторе МАРК 11 («Nuclear Chicago», США). Эффективность счета контролировали методом отношения каналов. В работе использовали гамма-амино-[2,3-³H]масляную и DL-[2,3-³H] аспарагиновую кислоты с активностью 30 Ки/ммоль. Статистическую обработку проводили общепринятым методом Стьюдента.

Результаты исследований показали, что распределение свободных аминокислот во всех обследованных участках мозга у подавляющего большинства животных носит несимметричный характер, что дает право говорить о существовании индивидуальной биохимической асимметрии мозга крыс. Более того, сопоставление распределения свободных аминокислот в левой и правой половинах мозга в зависимости от пола показало, что среди самцов преобладают животные с левосторонней латерализацией, тогда как среди самок достоверно больше ($p < 0,05$) животных с правосторонней латерализацией или с симметричным распределением. Половые различия особенно ярко выражены в распределении аспартата, треонина, серина, глутамата, глицина и фенилаланина. Так, если среди самок левостороннюю асимметрию по перечисленным аминокислотам имели от 15 до 40% животных, то среди самцов эта же форма асимметрии была характерна для 50—78% всех обследованных животных ($p < 0,05$).

Таблица 1

Средние значения коэффициента асимметрии при левосторонней латерализации свободных аминокислот некоторых отделов мозга самцов и самок крыс

Аминокислоты	Участки мозга							
	Кора		Средний мозг		Гипотал мус		Мозжечок	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
Аспарагиновая	±1,16 0,01	±1,13* 0,01	±1,13 0,03	±2,48* 0,15	±1,67 0,03	±2,31* 0,03	±1,58 0,03	±1,12* 0,03
Треонин	±1,21 0,02	±1,25 0,02	±1,17 0,02	±1,17 0,03	±1,46 0,05	±3,25* 0,05	±1,53 0,04	±1,34 0,06
Серин	±1,27 0,01	±1,36* 0,02	±1,57 0,05	±2,14* 0,21	±1,45 0,04	±2,19 0,10	±1,74 0,08	±1,32 0,20
Глутаминовая	±1,14 0,02	±1,39* 0,03	±2,19 0,06	±1,29 0,12	±1,32 0,05	±2,40* 0,12	±1,42 0,07	±3,41* 0,12
Глицин	±1,19 0,02	±1,52** 0,04	±1,14 0,05	±8,23 0,42	±1,37 0,09	±2,36* 0,11	±1,19 0,03	±1,17 0,08
Аланин	±1,45 0,05	±1,35 0,03	±1,14 0,04	±1,22 0,03	±1,40 0,05	±2,27* 0,04	±1,31 0,05	±1,89* 0,11
Фенилаланин	±2,72 0,01	±2,51* 0,01	±2,52 0,12	±9,50* 0,65	±3,05 0,03	±17,06* 0,92	±2,94 0,08	±3,71* 0,05
Гистидин	±2,94 0,03	±2,04* 0,04	±1,94 0,15	±1,35 0,17	±3,65 0,02	±8,78* 0,51	±2,85 0,06	±3,88* 0,08
Лизин	±2,59 0,10	±2,07* 0,05	±1,48 0,09	±1,25 0,08	±2,19 0,05	±1,07* 0,03	±1,78 0,04	±2,15* 0,03
Аргинин	±1,44 0,02	±1,64* 0,03	±1,15 0,12	±1,31 0,11	±1,78 0,02	±2,57* 0,05	±1,30 0,02	—

Примечание. *—достоверно различающиеся данные ($p < 0,05$); **—достоверно различающиеся данные ($p < 0,02$). В опытах по изучению распределения свободных аминокислот использовано 95 самцов и 90 самок крыс.

Анализ выраженности асимметрии проводился путем сравнения величин К. Обращает на себя внимание, что у животных с правосторонним преобладанием свободных аминокислот независимо от пола значения К равны или различаются весьма незначительно, составляя 0,7—0,8. В связи с этим в табл. 1 приведены средние значе-

Таблица 2

Кинетические параметры захвата ГАМК и аспарагиновой кислоты
срезами симметричных участков лобных долей коры головного мозга
самцов и самок крыс

Аминокис- лоты	Параметры захвата	С а м к и		С а м ц ы	
		П о л у ш а р и е			
		левое	правое	левое	правое
Аспарагино- вая	K_m (мкМ)	91. 0 $\pm$ 12.0	32.0 $\pm$ 5. 0	142. 0 $\pm$ 15.0	62. 0 $\pm$ 12.0
	V (нмоль мг белка мин)	0.24 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.01	0.41 $\pm$ 0.03	2.24 $\pm$ 0.02
ГАМК	K_m (мкМ)	35. 0 $\pm$ 7.0	15. 0 $\pm$ 3. 0	56. 0 $\pm$ 5.0	20. 8 $\pm$ 3.6
	V (нмоль мг белка мин)	0.13 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.01	0.25 $\pm$ 0.02	0.09 $\pm$ 0.02

Примечание. Число животных в опытах с аспарагиновой кислотой—36, в опы-
тах с ГАМК—48.

ния К только для крыс с левосторонней латерализацией. Из пред-
ставленных данных видно, что у самцов степень левосторонней асим-
метрии мозга выше, чем у самок.

Одной из причин межполушарной асимметрии в содержании
свободных аминокислот могли быть различия в их захвате. Это пред-
положение поддерживалось данными Ross и соавт. [4], показавшими,
что захват 2-дезоксид-Д-глюкозы значительно активнее идет в правой
половине мозга самок. В табл. 2 представлены результаты определе-
ния K_m и V для процесса захвата срезами коры мозга ГАМК и ас-
парагиновой кислоты. Вне зависимости от пола животных значения
 K_m для срезов правого полушария оказались ниже, чем для срезов
левого. При этом сродство к субстрату у переносчика обменных амино-
кислот у самок оказалось выше. Эффективность переносчика, опре-
деляемая величиной V , у самцов вне зависимости от полушария бы-
ла большей, чем у самок.

Проведенные исследования свидетельствуют о том, что опреде-
ленный вклад в функциональную асимметрию мозга вносят особен-
ности транспорта медиаторных аминокислот. По-видимому, эти про-
цессы имеют значение и для реализации полового диморфизма в их
латерализации.

Следует отметить, что результаты наших наблюдений хорошо
согласуются с уже известными сведениями по функциональной асим-
метрии. Так, мозг мужчины и самцов животных более асимметричен,
а мозг женщины и самок животных более симметричен в отношении
целого ряда показателей [5—7]. Полученные экспериментальные
данные представляют, по-видимому, определенный интерес в плане
подтверждения и развития теории половых различий когнитивной
функции и латерализации мозга [7, 8].

LATERALIZATION OF DISTRIBUTION AND UPTAKE OF AMINOACIDS IN RAT BRAIN

RAKHIMOV R. N., KALAIUS N. E., RAKHIMOVA N. N., *DOLGO-SABUROV V. P.,

*KRYLOV S. S.

Research Institute of Prophylactic Medicine, Ministry of Health of the Estonian SSR,

Tallinn

*Institute of Toxicology, USSR Ministry of Public Health, Leningrad

We have shown by ion-exchange chromatography that there exists asymmetry in the level of several aminoacids, including those belonging to neurotransmitter aminoacids in various regions of rat brain (male and female). The maximum asymmetry was observed in males. Experiments with surviving slices of the frontal lobe were carried out to estimate the uptake parameters for aspartic and gamma-aminobutyric acids (K_m and V_{max}). These aminoacids showed specificity as concerns sex and inter-hemisphere differences.

ЛИТЕРАТУРА

1. Курепина М. М. Мозг животных, М., 1981.
2. König J. F. R., Klippel R. A. The Rat Brain. A stereotaxic Atlas of the Fore-brain and Lower Parts of the Brain Stem. The Williams and Wilkins comp., Baltimore, 1963.
3. Митяинов М. М., Емельянов Н. А., Мокрушин А. А., Войнер Н. А., Багаев Т. А. — В кн.: Переживающий срез мозга, с. 5—37, Л., Наука, 1986.
4. Ross D. A., Glick S. D., Melbach W. C. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol., Sci. v. 78, p. 1958—1961, 1981.
5. Rogers L. J., Anson J. M. Pharmacol. Biochem. and behav., v. 10, p. 679—686, 1979.
6. Nottebohm F. -In: Handbook of behavioral neurobiology (ed. M. S. Gazzaniga), p. 295—344. New York, 1979.
7. Бианки В. Л. Асимметрия мозга животных, Л., Наука, 1985.
8. Witelson S. F. Science, v. 193, p. 425—427, 1976.

Поступила 23.VI.1989

УРИДИНОВЫЕ РЕЦЕПТОРЫ МОЗГА:
ЛИГАНДНЫЙ И УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЙ АСПЕКТЫ

МАКЛЯКОВ Ю. С., СТРАДОМСКИЙ Б. В., БАРДАХЧЬЯН Э. А.

Ростовский государственный медицинский институт,
Научно-исследовательский противочумный институт, Ростов-на-Дону

В настоящее время показано, что эндогенные производные пиримидина принимают непосредственное участие в формировании эмоционального статуса человека и животных. Так, при генетически детерминированном заболевании—оротатацидурии, заключающемся в блокировании биосинтеза эндогенных пиримидинов, у больных ярко выражен депрессивный симптомокомплекс [1, 2]. Аналогичные нарушения эмоциональной сферы выявляются и при использовании селективного блокатора биосинтеза пиримидинов—6-азаурацила, вызывающего пиримидиндефицитные состояния [3, 4]. В то же время, пиримидиновый нуклеозид уридин проявляет характерные свойства антидепрессанта, а также анксиолитика в экспериментальных условиях [5].

Одним из ведущих механизмов, обеспечивающих прямое воздействие на состояние ЦНС, является способность уридина взаимодействовать с рецепторами нервных клеток. Однако конкретные ультраструктурные изменения на уровне отдельных нейронов при действии уридина остаются до сих пор не изученными. С нашей точки зрения, особенно перспективным представляется исследование проблем, связанных со специфическим поглощением молекул уридина эндотелием и нейронами за счет опосредованного рецепторами эндоцитоза.

Чтобы исключить возможное участие в реализации биологического действия уридина гуморальных и клеточных медиаторных систем, в специальной серии опытов осуществлено внутрицистернальное введение его в обход ГЭБ, то есть созданы условия для прямого контакта молекул уридина со структурами мозга.

Другой целью настоящей работы явилось изучение уридина в качестве возможного эндогенного лиганда некоторых типов рецепторов, локализованных на синаптических мембранах.

Исследования лигандных свойств уридина выполнены на 48 белых беспородных крысах-самцах массой 250—300 г. В синаптической фракции головного мозга определяли наличие мест специфического связывания [^3H]уридина. С помощью анализа Скэтчарда определяли величины K_d уридина, а также влияние на эти параметры трициклического антидепрессанта имидамина. Кроме того, изучали влияние диазепамов, медазепамов, коразола и ГАМК на уровень спе-

цифического связывания уридина. Полученные данные подвергали статистической обработке.

Для электронномикроскопического исследования (31 крыса) сенсомоторной коры, гиппокампа, таламуса и центрального серого вещества использована глутаросмевая фиксация. Материал от 9 белых крыс-самцов массой 200 г изучали через 30 мин, 3 и 24 ч после внутрибрюшинного введения уридина (50 мг/кг), а от 12 животных — через 10 и 30 мин, 1,5 и 3 ч после внутрикостерального введения вещества в дозе 100 мг/кг в объеме 10 мкл исследовали только центральное серое вещество. В 10 контрольных опытах осуществляли соответствующее введение (внутрибрюшинное или внутрикостеральное) эквивалентного количества стерильного физиологического раствора. После общепринятых процедур кусочки ткани заключали в эпон 812. Ультратонкие срезы, полученные на ультрамикротоме LKB 8800, контрастировали ураниацетатом и цитратом свинца и просматривали в электронном микроскопе JEM-100 S.

Наиболее существенным результатом электронномикроскопического исследования является свойство уридина при внутрибрюшинном введении проникать через ГЭБ и вступать в специфическое взаимодействие с нервными клетками и эндотелиоцитами. При этом идентифицируются два типа нейронов, отличающиеся по способности образовывать окаймленные везикулы.

В случае присутствия уридиновых рецепторов на плазмалемме нервных клеток после введения лиганда (уридина) в цитоплазму выявляется отчетливая реакция, связанная с массивным образованием окаймленных везикул, которые у интактных животных единичны или вообще отсутствуют (рис. 1, а). Обе популяции нейронов регистрируются во всех изученных отделах ЦНС, однако представительство клеток без специфических рецепторов является наибольшим в таламической области.

В цитоплазме эндотелиальных клеток окаймленные везикулы особенно многочисленны в центральном сером веществе (рис. 1, б). Интересно, что иногда удается проследить все этапы эндоцитоза — от формирования окаймленного углубления, интернализации и вплоть до образования окаймленных везикул (рис. 1, б).

Как известно, появление последних ассоциируется с процессом специфического захвата и транспорта молекул в результате опосредованного рецепторами эндоцитоза [6—8]. Поскольку пузырьки с дополнительной оболочкой нехарактерны для цитоплазмы нейронов и эндотелиоцитов [9], следует допустить их образование в ответ на введение уридина.

При введении уридина в ликвор довольно выраженная реакция формирования окаймленных везикул происходит в три раза быстрее, чем при внутрибрюшинном введении. Действительно, уже спустя 10 мин после внутрикостеральной инъекции препарата в нейронах центрального серого вещества наблюдаются многочисленные окаймленные везикулы, локализующиеся в зоне пластинчатого комплекса и заполненные электронноплотным веществом (рис. 2, а). Интернализация уридина в составе окаймленных везикул весьма интенсивна на протяжении всех 3 ч наблюдения.

Благодаря внутрикостеральному способу введения препарата нам удалось положительно ответить на принципиальный вопрос о наличии специализированных участков связывания уридина на нейрональной плазмалемме. Введение уридина, минуя ГЭБ, обеспечивает ускоренную интернализацию его молекул и более быструю реакцию энергетического, белоксинтезирующего и протеолитического ап-



рис. 1. Ультраструктурные изменения в мозгу при интритибрюжном введении уридина: а — увеличение количества окаймленных везикул в цитоплазме нервной клетки гиппокампа (увел. 14000); б — появление многочисленных окаймленных везикул в эндотелии капилляра центрального серого вещества (увел. 18000)

парата нервных клеток. Реакция глочно-сосудистого комплекса находится в зависимости от выраженности адаптивных изменений нейронов. Кроме того установлено, что уридин стимулирует синаптическую передачу и активизирует межнейрональные связи (рис. 2, б).

Результаты радионуклидных исследований также свидетельству-

ют о наличии специфических мест связывания уридина на синапсомембранных клетках нервной ткани. Специфическое связывание [^3H]уридина полностью блокировалось при добавлении к суспензии синапсом немеченого уридина в концентрации 10^{-4} М и выше.

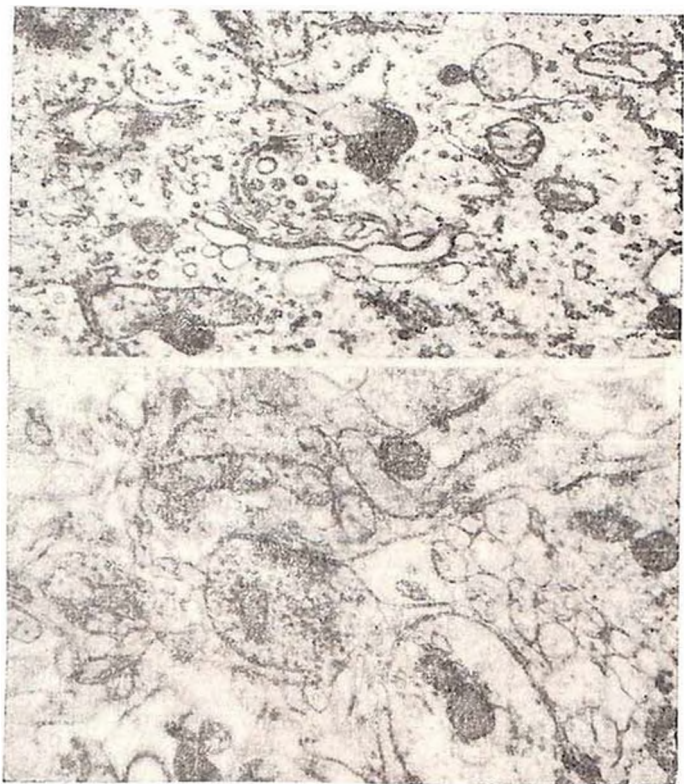


Рис. 2. Ультраструктурные изменения в мозгу при интратекаральном введении уридина: а—образование окаймленных везикул в цитоплазме центрального серого вещества (увел. 18000); б—группа активных аксо-дендритических синапсов в центральном сером веществе (увел. 14000)

При изучении влияния лигандов бензодиазепиновых рецепторов на взаимодействие уридина с синапсомембранной фракцией головного мозга было обнаружено, что диазепам, мелазепам и коразол снижают специфическое связывание [^3H]уридина. ГАМК, напротив, повышала аффинитет уридина к рецепторам. Анализ этих данных позволяет сделать вывод о способности уридина связываться с бензодиазепиновыми рецепторами, что, по-видимому, объясняет его анксиолитические свойства.

С помощью анализа Скэтчарда были определены K уридина ($1,30 \pm 0,16$ нМ/мг синапсомембранного белка) и B_{max} ($7,08 \pm 0,69$ пМ/мг

белка). Имипрамин, взятый в конечной концентрации 10^{-4} М, ингибировал связывание [3 H]уридина с рецепторами, повышая константу диссоциации более чем вдвое и практически не изменяя количества мест связывания уридина. Воздействие такого типа свидетельствует о том, что между уридином и имипраминном существует конкуренция за общие для этих соединений места специфического связывания, то есть уридин является, по-видимому, эндогенным лигандом имипраминовых рецепторов, что и позволяет объяснить его антидепрессивные свойства.

BRAIN URIDINE RECEPTORS: LIGANDS AND ULTRASTRUCTURAL ASPECTS

MAKLYAKOV U. S., STARODOMSKY B. V., BARDAKHCHIAN E. A.

Department of Clinical Pharmacology, Rostov-on-Don Medical Institute, Rostov-on-Don
Research Antiplague Institute

Intraperitoneal (50 mg/kg) or intracisternal (100 mg/kg) administration of uridine to rats lead to abundant appearance of numerous vesicles in neurons of different brain structures as shown by EM. The experimental data suggest that this effect is associated with specific receptors for uridine and this was confirmed by radioligand studies. The sites of specific uridine binding were identified as benzodiazepine and imipramine receptors.

ЛИТЕРАТУРА

1. Huguley C. M., Bain J. A., Rivers L. S., Scoggins R. S. *Blood*, v. 14, p. 615—634, 1959.
2. Becroft D. M. O., Phillips L. I. *Britt. Med. J.*, № 1, p. 547—552, 1965.
3. Shnlder B. I., Fret E., Tuohy J. H., Gorman J., Freireich E. J., Brindley C. O., Clements J. *Cancer Res.*, v. 20, p. 28—33, 1960.
4. Krsiak M., Janku I. *Int. J. Neuropharmacol.*, v. 8, p. 199—207, 1968.
5. Karkischenko N. N., Stradomsky B. V., Choronko V. V. -In: *Molecular basis of neural function*, p. 429, Prague, 1986.
6. Каркищенко Н. Н., Солодилов В. В., Бардахчян Э. А. *Известия СКНЦ ВШ*, № 2, с. 122—127, 1987.
7. Brown M. S., Goldstein J. L. *Nat. Cancer Inst. Monogr.*, v. 60, p. 3—6, 1982.
8. Snyder S. H. *Science*, v. 224, p. 22—31, 1984.
9. Морозов Г. В., Боголепов Н. Н. — В кн.: *Морфинизм*, с. 176, М., 1984.

Поступила 9.XI.1989

МОДИФИКАЦИЯ ЭТАНОЛОМ СБОРКИ
МИКРОТРУБОЧЕК МОЗГА

ПРОХНЕВСКИЙ А. Н., СОРОЧИНСКИЙ Б. В.

Институт ботаники им. Н. Г. Холодного АН УССР, Киев

Физиологическая активность этанола хорошо известна. Среди многих патологий, вызываемых хроническим употреблением алкоголя, распространены различные расстройства НС, однако механизмы этих явлений плохо изучены. Высказывается предположение, что большинство нарушений в функциях нервных клеток обусловлены активностью ацетальдегида [1], первичного метаболита этилового спирта. Одной из мишеней действия ацетальдегида на нервные клетки может быть система цитоскелета, так как обработка препаратов микротрубочек растворами ацетальдегида в концентрациях от 1 до 10 мМ ингибировала сборку этих структур [1]. Система микротрубочек участвует во многих процессах, протекающих в клетке—в клеточном морфогенезе, внутриклеточном транспорте и кининге рецепторов, регуляции некоторых биохимических процессов [2]. В нервных клетках микротрубочки отвечают за рост клеток, аксоплазматический транспорт и транспорт секреторных везикул. Поэтому понятно, что нарушение структуры клеточного скелета под влиянием продуктов распада этанола может вызвать серьезные нарушения в клеточных функциях.

Однако нельзя полностью исключить и возможность прямого влияния этилового спирта на систему микротрубочек. Проверка этого предположения была целью данного исследования.

Микротрубочки выделяли из мозга крупного рогатого скота двумя циклами полимеризации-деполимеризации в присутствии глицерина [3]. В качестве буфера, стабилизирующего микротрубочки (БСМ), использовали буфер Бершадского [4]: 50 мМ имидазол, 1 мМ ЭГТА, с мМ меркаптоэтанол, 0,1 мМ ЭДТА, 1 мМ $MgCl_2$, 50 мМ KCl, 4 М глицерин, pH 6,7. Микротрубочки, выделенные двумя циклами, хранили в 8 М глицерине на БСМ при -20° не более 2 суток.

При проведении экспериментов по сборке микротрубочек препараты сначала осаждали при 150000 g в течение 1 ч, затем деполимеризовали 1 ч при 0° в буфере БСМ без глицерина и повторно центрифугировали при тех же условиях. Супернатант, содержащий деполимеризованные микротрубочки, использовали для дальнейших экспериментов. Сборку микротрубочек индуцировали повышенным температурой растворов до 37° и добавкой GTP до 1 мМ. Регистрировали процесс сборки по изменению оптической плотности растворов на

спектрофотометре DU-8 («Beckman», США), длина волны 360 нм, интервалы между измерениями 1 мин.

Белок определяли по методу Greensberg, Graddock [5].

В экспериментах по изучению влияния растворов этанола на процесс сборки микротрубочек раствор GTP заменяли растворами этанола.

Электронномикроскопические препараты микротрубочек изучали на электронном микроскопе JEM-100 В (Япония). Образцы для микроскопии готовили следующим образом: на подложки, покрытые формваром, наносили 1 каплю суспензии микротрубочек, через 5—10 с избыток раствора отбирали фильтровальной бумагой и оттеняли препараты 1%-ным уранил-ацетатом в течение 5—10 с.

Процесс сборки микротрубочек можно регистрировать по изменению оптической плотности их растворов (рис. 1). Критическая

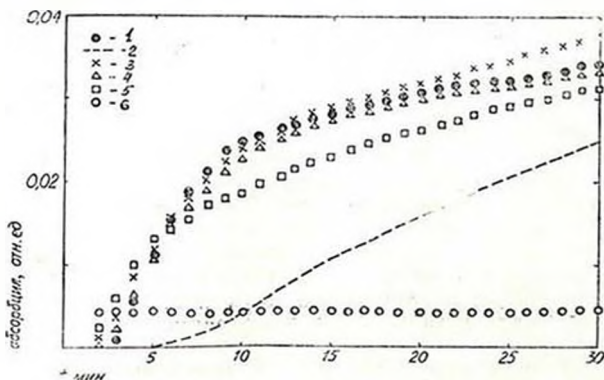


Рис. 1. Изменение оптической плотности растворов микротрубочек: 1—контроль 1 мМ GTP, 2—микротрубочки без GTP, 3—75 мМ этанол, 4—150 мМ этанол, 5—1,5 мМ этанол, 6—раствор альбумина. Концентрация белка 0,8 мг/мл, температура 37°

концентрация белка для инициации процессов полимеризации может отличаться в разных экспериментах и зависит от качества выделяемого материала. В наших экспериментах критическая концентрация равнялась 0,2 мг/мл. Контрольная кривая (1) описывает изменение оптической плотности раствора микротрубочек с концентрацией белка 0,8 мг/мл. Процесс полимеризации *in vitro* завершается примерно через 12—15 мин и хорошо описывается законами экспоненциальной кинетики [6]. По-видимому, отдельные части кривой могут соответствовать разным этапам сборки микротрубочек [7]. Лаг-фаза (1—3 мин) может характеризовать образование центров нуклеации, а фаза увеличения оптической плотности (4—10 мин) может соответствовать процессам латерального роста и элонгации микротрубочек. Кривая 2 описывает поведение раствора белков микротрубочек при 37° без GTP. Возрастание оптической плотности раствора начиная с 6—10 мин свидетельствует, по-видимому, о способности белков микротрубочек агрегировать при этих условиях, что подтверждается линейным характером кривой. Кривые 3, 4, 5 описывают пове-

дение препаратов микротрубочек в присутствии этанола (75 мМ—1,5 М). Сравнение этих кривых с контрольной позволяет предположить, что этанол способен индуцировать полимеризацию микротрубочек, поскольку увеличение оптической плотности препаратов носит экспоненциальный характер. Пока нельзя дать объяснение механизмам, лежащим в основе этого процесса. Однако нет оснований полностью исключать предположение о том, что такое взаимодействие является вполне специфичным, поскольку оптическая плотность раствора человеческого сывороточного альбумина в присутствии 150 мМ этанола не изменяется, то есть при такой концентрации спирта не происходит агрегации или полимеризации белков, что привело бы к изменению абсорбции растворов.

По-видимому, этиловый спирт обладает синергичным действием в отношении к глицерину, который способствует сборке микротрубочек [3]. Реализовать свое действие этанол может либо взаимодействуя с белками, ассоциированными с микротрубочками (МАР—белками), либо влияя непосредственно на конформацию тубулина, основного белка микротрубочек.

В работе McKinnon и соавт. [1] прямого влияния этилового спирта на процесс сборки микротрубочек не было зарегистрировано. В этой связи следует сделать несколько уточнений. Во-первых, концентрации этанола и белков микротрубочек в нашей работе и в упомянутом исследовании значительно отличаются. Поэтому можно предположить, что соотношение спирт/белок играет существенную роль для реализации самого явления индукции сборки микротрубочек под воздействием этанола. Во-вторых, в наших экспериментах мы полностью исключили из реакционной смеси GTP, то есть исключили возможность суперпозиции двух процессов—индукции сборки под воздействием этанола и полимеризации микротрубочек в присутствии GTP.

На рис. 2 показаны электронномикроскопические фотографии препаратов микротрубочек, собранных в присутствии GTP и под воздействием этанола. Анализ изображения на фотографиях подтверждает возможность образования трубчатых структур в присутствии этанола, хотя контрольные и собранные в присутствии спирта микротрубочки несколько отличаются. В этой связи можно предположить, что этанол способен индуцировать аномальную сборку микротрубочек (аномальную с точки зрения получения конечного продукта реакции).

Описанное нами явление индукции этанолом сборки микротрубочек *in vitro* может служить для объяснения явлений, зарегистрированных *in vitro*, поскольку описано как увеличение, так и уменьшение количества микротрубочек в различных клетках одного и того же организма после длительного употребления алкоголя [8]. Вероятно, наличие у тубулина многих изоформ может служить одной из причин того, что этанол и его продукты в разных клетках по-разному взаимодействуют с белками цитоскелета. Однако любое нарушение баланса цитоскелетных структур в клетке может существенно модифицировать клеточный метаболизм. Поэтому не только продукты деградации этилового спирта, но и сам этанол, оказывая прямое влияние на систему микротрубочек, может непосредственно служить причиной нарушения многих функций нервной клетки.

Цитоскелет нервных клеток может, вероятно, быть мишенью в действии некоторых психотропных веществ. В частности, было обна-



Рис. 2. Электронномикроскопические фотографии микротрубочек, собранных в присутствии 1 мМ (а) и 150 мМ этанола (б)

ружено, что аминазин в концентрациях от 100 до 500 мкМ ингибирует полимеризацию тубулина [9]. В цитированной ранее работе [1] показано ингибирование сборки микротрубочек в присутствии этилацетата. Обнаруженное нами явление прямого влияния этанола на полимеризацию цитоскелетных структур также может служить косвенным подтверждением в пользу представлений о клеточном скелете как о мишени в действии некоторых психотропных соединений.

ETHYLALCOHOL MODIFIES THE ASSEMBLY OF NERVE CELLS MICROTUBULES

PROKHNEVSKY A. I., SOROCHINSKY B. V.

Institute of Botany, Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

The effect of ethyl alcohol on the polymerization of microtubules was investigated. Using electron microscopy and turbidimetry we showed that ethyl alcohol can induce microtubules assembly without GTP.

It is proposed, that nerve cells cytoskeleton may be the target of some psychotropic compounds.

ЛИТЕРАТУРА

1. *McKinnon C., Davidson M., De Jersey J.* Brain Res., v. 416, № 1, p. 90—99, 1987.
2. *Фультон А.* Цитоскелет. Архитектура и хореография клетки, М., Мир, 1987.
3. *Shelanski M., Gaskin F., Cantor Ch. F.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci. v. 70, № 3, p. 765—768, 1973.
4. *Bershadsky A. D., Gelfand V. I., Svitkina T. M., Tint I. S.* Cell Biol. Int. Rep. v. 2, p. 426—432, 1978.
5. *Greensberg Ch. S., Graddock Ph. B.* Clin. Chem., v. 28, № 7, p. 1725—1726, 1982.
6. *Gal V., Traicovic D., Ristanovic D.* Int. J. Biochem., v. 18, № 1, p. 85—88, 1986.
7. *Hesketh J.* Int. J. Biochem., v. 17, № 7, p. 761—766, 1985.
8. *Манвел'ян Р. В., Третьяков М. А.* Brain Res., v. 339, № 2, 195—199, 1985.
9. *Андропова Л. В., Бурбаева Г. Ш.* Биохимия, т. 52, № 7, с. 1162—1168, 1987.

Поступила 9.XI.1989



УДК 612.82+571.1123+577.175.343

ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ФОСФОЛИПИДОВ В НЕКОТОРЫХ СТРУКТУРАХ МОЗГА КРЫС С ВРОЖДЕННЫМ ДЕФИЦИТОМ ВАЗОПРЕССИНА

ДИШКЕЛОВ А., МИТЕВ Ю., ПАЧЕВ В.

Институт по изучению мозга, Болгарская Академия Наук, София

Вязкость и латеральная подвижность клеточной мембраны являются важными факторами процесса взаимодействия клетки с химическими агентами. Вид углеродной цепи жирных кислот в составе мембранных фосфолипидов считают элементом, определяющим в значительной мере вязкость биологических мембран [1].

Вазопрессину отводится значительная роль в осуществлении ряда адаптивных реакций организма. Особый интерес вызывают результаты, подчеркивающие значение нейропептида в регуляции системы гипоталамус-гипофиз-надпочечники и в мнестических процессах [2, 3]. Вазопрессин замедляет угасание условных рефлексов [4], а также оказывает положительное воздействие на мнестические функции у человека [5, 6]. Нейрохимические механизмы действия вазопрессина на процессы памяти изучены недостаточно. Считают, что гормон воздействует преимущественно на моноаминергическую трансмиссию в лимбических и мезенцефальных структурах мозга [7]. В предыдущих исследованиях нами установлено, что однократное введение вазопрессина оказывает длительное воздействие на липидный метаболизм в мозгу [8], а внутримышечная инъекция гормона в процессе формирования условного оборонительного рефлекса вызывает характерные изменения в содержании жирных кислот липидов в гиппокампе [9]. На основании этих результатов возникло предположение, что воздействие на состав и метаболизм липидов в мозгу является одним из нейрохимических механизмов влияния вазопрессина на процессы памяти.

Цель настоящей работы—проверка указанной гипотезы при использовании модели врожденного дефицита вазопрессина. Крысы линии *Brattleboro*—спонтанные мутанты линии *Long Evans*—страдают генетически обусловленным отсутствием вазопрессина. Гомозиготные представители линии характеризуются тяжелым несахарным диабетом, нарушением нейроэндокринной регуляции [10], ухудшением вырабатывания условных рефлексов и их угасанием [11].

Исследование проводили на 10 взрослых гомозиготных самцах линии *Brattleboro* (D1) и 10 самцах линии *Long Evans*. Исследуемые структуры—септальные ядра, область аркуатного ядра и сре-

динного возвышения в меднобазальном гипоталамусе и гиппокамп препарировали способом Palkovits [12] и гомогенизировали в 2 мл смеси хлороформа, метанола и воды (2:1:0,8); фосфолипиды изолировали хроматографией в флоризиле [13]. Фосфолипидную фракцию подвергали гидролизу, после которого жирные кислоты превращали в метиловые эфиры. Эстерифицированные жирные кислоты растворяли в 1 мл хлороформа и 0,005 мл раствора анализировали методом ГЖХ. Исследования проводили на газовом хроматографе GC 93 («Analytical Instruments», Великобритания) с колонкой типа BP 20 и пламенно-ионизационным детектором. Жирные кислоты выявляли в температурном диапазоне от 185 до 250° при линейном непрерывном повышении температуры на 7,5° в мин. В качестве внутренних стандартов использовали набор метиловых эфиров жирных кислот («Sigma», США). В каждой пробе, после идентификации и измерения площади отдельных пиков (микропроцессорный интегратор TRIO Trivector, США), вычисляли соотношение насыщенных и ненасыщенных жирных кислот в процентах. Статистическую обработку результатов проводили по Стьюденту.

В фосфолипидных фракциях, изолированных из трех структур мозга, обнаружены насыщенные жирные кислоты с цепями, состоящими из 12, 14, 16, 18, 20 и 22 углеродных атомов. Выявлены ненасыщенные жирные кислоты C 16:1, C 18:1, C 18:2, C 20:2, C 20:4 и C 22:6. Установлены следующие качественные различия: кислоты C 12:0 и C 22:6 отсутствуют в фосфолипидах септальных ядер у контрольных животных, а гиппокамп крыс линии *Brattleboro* не содержит кислоты C 20:0. Процентные соотношения насыщенных и ненасыщенных жирных кислот в каждой структуре даны в таблице.

Таблица

Соотношение содержания насыщенных и ненасыщенных жирных кислот в фосфолипидах, изолированных из отдельных структур мозга

Жирные кислоты		Септум	Гипоталамус	Гиппокамп
Насыщенные	LE	43,7±1,1	18,1±0,9	48,6±2,2
	D1	57,2±6,3*	35,7±1,5	47,5±1,9
Ненасыщенные	LE	56,3±1,1	81,9±0,9	51,4±2,2
	D1	43,8±6,3*	64,3±1,5	52,5±1,9

Примечание. Данные выражены в процентах. LE— нормальные крысы линии *Long Evans*, D1— крысы линии *Brattleboro* с врожденным дефицитом вазопрессина. * $p < 0.01$.

Содержание ненасыщенных жирных кислот в ядрах перегородки и в меднобазальном гипоталамусе крыс линии *Brattleboro* значительно ниже, чем у нормальных крыс линии *Long Evans*. Основным источником разницы является понижение содержания кислот C 18:1 и C 18:2, а также повышенные концентрации насыщенных кислот с 14- и 16-атомными цепями.

Жирикислотный состав фосфолипидов имеет определенное воздействие на вязкость и латеральную подвижность клеточной мембраны. Присутствие значительных количеств ненасыщенных жирных кислот обеспечивает пониженную вязкость мембраны [4], облегчая латеральную диффузию и конформационные изменения интеграль-

ных протенинов мембраны (рецепторные и каналы белки, ферменты). Установленное нами относительное понижение содержания ненасыщенных жирных кислот в фосфолипидах мозга крыс с врожденным дефицитом вазопрессина вызывает предположение о некоторой «жесткости» нейронных мембран у этих животных и о связанной с этим инертности интегральных белков, физиологическим итогом являлась бы нарушенная переработка химических сигналов.

Поскольку введение вазопрессина в гиппокамп интактных крыс вызывает улучшение консолидации условного рефлекса, сопровождаемое увеличением содержания ненасыщенных жирных кислот в тотальной липидной фракции мозга [9], есть основание считать, что изменения жирнокислотного спектра у крыс линии *Brattleboro* связано с отсутствием вазопрессина. Однако не исключается возможность сосуществования нескольких генетических дефектов у этих мутантов, затрагивающих кроме синтеза вазопрессина и некоторые элементы синтеза длинноцепочечных ненасыщенных жирных кислот.

Неожиданным результатом является отсутствие значительных изменений в гиппокампе, который выполняет важную роль в процессах обучения и запоминания. В отличие от септальных ядер и внешней зоны срединного возвышения, исследуемый нами дорзальный гиппокамп не принадлежит к главным проекциям вазопрессинсинтезирующих нейронов [14]. Относительно низкая плотность вазопрессинергических проекций в этой структуре—одно из возможных объяснений отсутствия значительных различий в жирнокислотных спектрах фосфолипидов в гиппокампе. Однако исследование биосинтеза фосфолипидов в тех же структурах мозга показало, что врожденный дефицит этого гормона сопровождается выраженным угнетением включения меченых предшественников ($[^{32}\text{P}]$ и $[^{14}\text{C}]$) в фосфолипиды гиппокампа [15]. Этот факт дает основание считать, что фосфолипиды в гиппокампе, несмотря на отсутствие изменений в жирнокислотных спектрах, также являются объектом действия вазопрессина.

FATTY ACID COMPOSITION OF PHOSPHOLIPIDS IN SOME BRAIN STRUCTURES OF RATS WITH INNATE VASOPRESSIN DEFICIENCY

DISHKELOV A., MITEV Y., PATCHEV V.

Brain Research Institute, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia

The fatty acid spectra of the phospholipids from the septum, the mediobasal hypothalamus and the hippocampus of rats with innate vasopressin deficiency (*Brattleboro* strain) and their intact „relatives“ from the Long Evans strain were analyzed using gas-liquid chromatography. The rats with inherited vasopressin deficiency showed a significant decrease of the content of non-saturated fatty acids in the septal and hypothalamic phospholipids, whereas no considerable differences were observed in the hippocampus. The finding suggests that hereditary vasopressin deficiency affects the structure of brain phospholipids and, probably, the functional properties of the neuronal membranes. The importance of phospholipid fatty acid changes in the pathogenesis of impaired adaptive capability in *Brattleboro* rats is discussed.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Hucko F.* Einführung in die Neurochemie, Weinheim, Verlag Chemie, 1982.
2. *Vale W., Rivier C.* Federat. Proc., v. 36, p. 2094—2099, 1977.
3. *De Wied D., Versteeg D. H. G.* Federat. Proc., v. 38, p. 2348—2354, 1979.
4. *De Wied D., van Wimersma Greidanus T. B., Bohus B., Urban J., Gispen W. H.* Progr. Brain Res., v. 45, p. 181—191, 1976.
5. *Van Praag H. M., Verhoeven W. M. A.* Progr. Brain Res., v. 53, p. 229—252, 1980.
6. *Бахаров В. Д., Тухомиров С. М., Пансевич О. С., Чипенс Г. И.* Журн. невропатол. и психиатрии, т. 84, вып. 1, с. 88—92, 1984.
7. *Kovacs S. L., Bohus B., versteeg D. H.*, Progr. Brain Res., v. 53, p. 123—140, 1980.
8. *Patchev V., Dishkelov A.* Acta physiol. pharmacol. bulg., v. 13, p. 51—55, 1987.
9. *Dishkelov A., Patchev V.* Structure and functions of the brain. v. 13. p. 53—56 1988.
10. *Baertschi A. J., Beny J. -L.* Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 394, p. 591—602. 1982.
11. *De Wied D., Bohus B., van Wimersma Greidanus T. B.* Brain Res., v. 85, 152—156, 1975.
12. *Palkovits M.* Brain Res., v. 59, p. 449—450, 1973.
13. *Кейте М.* Техника липидологии, Москва, Мир, 1975.
14. *Weindl A., Sofroniew M.* —In: Neurobiology of Vasopressin, p. 137—196, Berlin, Springer, 1985.
15. *Dishkelov A., Aliev Y., Patchev V.* Life Sci. (In press), 1989.

Поступила 11.XII.1989

ВЫДЕЛЕНИЕ ФОСФОЛИПАЗЫ A_2 ИЗ ГОЛОВНОГО МОЗГА БЫКА

АПАНЯН А. А.

Институт биохимии АН АрмССР им. Г. Х. Бунятына, Ереван

Значение внутриклеточных фосфолипаз A_2 , очевидно, не менее интересно, чем их роль в зменном яде, в яде насекомых и в пищеварительной железе как факторов, играющих важную гидролитическую и транспортную роль в метаболизме клеточных мембран.

Интерес к исследованиям внутриклеточных фосфолипаз A_2 для многих типов клеток к настоящему времени значительно возрос [1—7]. Установлено, что в клетках их местонахождение часто не ограничено одной органеллой или одной субклеточной фракцией [8, 9], однако малая специфическая активность и низкая концентрация в клетках затрудняют их интенсивное изучение. До сих пор известны лишь несколько внутриклеточных фосфолипаз A_2 , очищенных до гомогенного состояния [1—3, 6].

В данной работе описаны результаты выделения и очистки фосфолипазы A_2 из головного мозга быка с учетом имеющейся в литературе информации относительно фосфолипаз A_2 ядов и пищеварительных желез.

100 г свежего бычьего мозга гомогенизировали в 300 мл 0,05 М ацетатного буфера, pH 5,2, содержащего 0,15 М NaCl. После озвучивания смеси ультразвуком 22 кГц в течение 1—2 мин, гомогенат оставляли на 18 ч при температуре 4°. При этом наблюдалось повышение pH среды до 5,9. После подкисления концентрированной HCl до pH 4,0 раствор гомогената подвергали нагреванию при 70° в течение 5 мин, что сопровождалось изменением цвета гомогената от кремового до темно-серого. Затем гомогенат быстро охлаждали до 4°, нейтрализовали с помощью 5 н. NaOH и центрифугировали при 5000 g 20 мин. Отделяли супернатант желтого цвета, проводили его через бумажный фильтр и диализовали против дистиллированной воды (3 раза по 10 л, 28 ч). Образовавшийся осадок удаляли центрифугированием при 10000 g, 40 мин. Прозрачно-желтого цвета супернатант лиофилизовали и хранили в сухом виде.

Для дальнейшего фракционирования лиофилизованной белковой фракции применяли упрощенный двухстадийный подход разделения на основе молекулярных масс и зарядов—гель-фильтрацию на сефадексе G-50 и ИОХ на КМ-целлюлозе, обладающих липолитической активностью фракций.

С этой целью 1/2 часть лиофилизованного материала наносили на колонку с сефадексом G-50 сверхтонкий (1,2×120 см), уравновешенную 0,01 М ацетатным буфером, pH 7,2. Элюировали тем же буфером со скоростью 6 мл/ч. Вся фосфолипазная активность была обнаружена во втором из двух белковых пиков (рис. 1). Определение

величины M этой фракции на колонке с сефадексом G-75 сверхтонкий в трис-HCl буфере, pH 7,2, содержащем 0,1 М KCl приводит к значениям величины M полученной активной фракции 13—14 кД, что соответствует мономерной форме фосфолипазы A_2 .

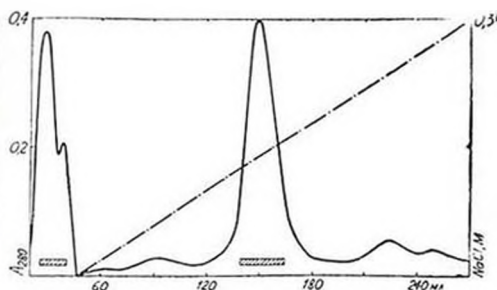
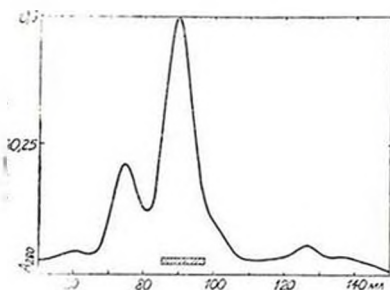


Рис. 1. Разделение белковой смеси гомогената мозга быка после лиофилизации на колонке с сефадексом G-50 сверхтонкий. Использован 0,01 М аммоний-ацетатный буфер, pH 7,2, скорость элюирования 6 мл/ч. Отмечен пик с фосфолипазной активностью

Рис. 2. Разделение фракции с фосфолипазной активностью после гель-фильтрации на G-50 на колонке с КМ-целлюлозой. Условия опыта: 0,01 М аммоний-ацетатный буфер, градиент NaCl от 0 до 0,3 М, скорость элюирования 30 мл/ч, объем градиента 2×200 мл

Фракции с фосфолипазной активностью были объединены и нанесены на колонку с КМ-целлюлозой ($1,2 \times 22$ см), уравновешенной 0,01 М аммоний-ацетатным буфером, pH 7,2. Элюировали белок в градиенте ионной силы, используя NaCl в градиенте концентраций 0—0,3 в исходном буфере, объем растворов 2×200 мл (рис. 2), скорость элюирования была равна 30 мл/ч.

Ферментативную активность на всех стадиях очистки и разделения определяли ацидометрическим методом, используя смешанные мицеллы субстрата с детергентом тритон X-100, как указано в работе [10], однако вносили 1—10 мкг фермента в водном растворе (5 мкл), что в 10—100 раз больше, чем при измерении фосфолипазной активности ядов змей. В качестве субстрата использовали яичный лецитин, или дилапальмитоиллецитин, гидролиз проводили при 37°, pH около 8,0 в присутствии 0,01—0,02 М Ca^{2+} без которого фосфолипазная активность не проявлялась. Гомогенность фракций на всех стадиях разделения и индивидуальность выделенного белка контролировали методом диск-электрофореза в 15%-ном растворе ПААГ в стандартных условиях [11]. Индивидуальность белка была определена электрофоретически в 10%-ном растворе ПААГ в присутствии 0,1%-ного ДДС-Na [12] и оценена ее величина M_r , равная $13,5 \pm 0,5$ кД.

Предварительные измерения позволили выявить оптимум фосфолипазной активности при pH $8,0 \pm 0,5$ ед. в присутствии Ca^{2+} . Замена последнего на другие двухвалентные ионы приводит к ингибированию ферментативной активности. pH-зависимость действия фермента выявляет сохранность ферментативных свойств в диапазоне pH 2—10. Фермент обладает высокой термостабильностью при 70°, устойчив к 5-минутному кипячению. Отсутствие свободных SH-групп

в белковой молекуле фосфолипазы A_2 доказано с помощью реагента Эллмана [13].

Таким образом, выделенная нами фосфолипаза A_2 из мозга быка является Ca^{2+} -зависимой, устойчивой к нагреванию и проявляющей оптимальную ферментативную активность при pH 8,0. Ферментный белок не содержит свободных SH-групп и имеет M_r около 13,5 кД, напоминая собой набор щелочных изоферментов из яда армянской гадюки.

Мы полагаем, что фосфолипаза A_2 из мозга быка будет также иметь нейтральную или щелочную рI, хотя по данным ацидометрического титрования она примерно на два порядка уступает ферменту секреторных фосфолипаз A_2 ядов змей по своей специфической активности.

Представляет интерес в дальнейшем изучить, какие имеются различия в механизме молекулярного действия и физиологической активности фосфолипазы A_2 из мозга быка по сравнению с другими внутриклеточными и секреторными фосфолипазами этого типа.

ISOLATION OF PHOSPHOLIPASE A_2 FROM BRAIN

AYANIAN A. Y.

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

Experimental procedure of isolation of phospholipase A_2 from animal brain has been developed. Phospholipase A_2 was purified by heat treatment of the homogenate, followed by chromatography on Sephadex G-50 and CM-cellulose. The isolated enzyme was homogeneous according to SDS-PAGE analysis, its molecular weight being $13\,500 \pm 500$ Da. The optimal activity of the enzyme was observed at pH $8 \pm 0,5$ in the presence of Ca^{2+} (up to 20 mM).

ЛИТЕРАТУРА

1. Ono T., Tojo H., Inoue K., Kagamiyama H., Yamano T., Okamoto M. J. Biochem., v. 96, № 3, p. 785—792, 1984.
2. Stefanski E., Pruzanski W., Sternby B., Vadas P. J. Biochem., v. 100, № 5, p. 1297—1303, 1986.
3. Hara S., Kudo I., Matsuta K., Miyamoto T., Inoue K. J. Biochem., v. 104, № 3, p. 326—328, 1988.
4. Lai Ch. Y., Wada K. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 157, № 2, p. 488—494, 1988.
5. De Geus P., Riegman N. H., Horrevorts A. J. G., Verheij H. M., De Haas G. H., Eur. J. Biochem., v. 161, № 1, p. 163—169, 1986.
6. Chang H. W., Kudo I., Tomita M., Inoue K. J. Biochem., v. 102, № 1, p. 147—154, 1987.
7. Hara S., Kudo I., Matsuta K., Miyamoto T., Inoue K. J. Biochem., v. 104, № 3, p. 326—328, 1988.
8. De Jong J. G. N., Ames J. H., Aarsman A. J., Lenting H. B. B. M., Van Den Bosch H. Eur. J. Biochem., v. 164, № 129—135, 1985.
9. Bar-Sagi D., Suhan J. P., Cormick F. M., Feramisco J. R. J. Cell Biol., v. 106, № 5, p. 1649—1659, 1988.
10. Salach J. I., Turini P., Seng R., Iqbal J., Singer T. P. J. Biol. Chem., v. 246, № 2, p. 331—339, 1971.
11. Relsfeld R. A., Lewis U. J., Williams D. Nature, v. 195, № 4838, p. 281—283, 1962.
12. Weber K., Osborn M. J. Biol. Chem., v. 244, № 16, p. 4406—4412, 1969.
13. Ellman G. L. Arch. Biochem. Biophys., v. 82, № 1, p. 70—77, 1969.

Поступила 13.XII.1989



УДК 612.82+616.001.31+577.112.115

ПРОЦЕССЫ ПЕРЕКРЕСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ
ПРИ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ

ДЕМЧУК М. Л., ЛЕВЧЕНКО Л. Н., ПРОМЫСЛОВ М. Ш.

Институт нейрохирургии им. Н. Н. Бурденко АМН СССР, Москва

Активация ПОЛ является универсальной реакцией на патологическое воздействие. Это, как правило, ведет к поражению мембран клеток и накоплению продуктов ПОЛ. Показано, что подобные изменения в тканях мозга экспериментальных животных происходят при развитии эпилептической активности [1], эмоционально-болевым стрессе [2, 3], паркинсоническом синдроме [4] и других патологических состояниях головного мозга.

В нашей лаборатории ранее исследовалось содержание малонового диальдегида (МДА) в полушариях и стволе мозга кроликов после черепно-мозговой травмы средней тяжести [5]. Однако для более полной характеристики окислительных процессов мы сочли необходимым исследовать накопление и других продуктов ПОЛ—диеновых конъюгатов (ДК) и оснований Шиффа (ОШ), равно как и суммарную антиоксидантную активность (АОА) ткани мозга кроликов в условиях опыта.

Определение МДА в ткани мозга мы сочли целесообразным проводить по методу Onhava и соавт. [6], который, как показано в работе Гаврилова и соавт. [7], является наиболее универсальным. Объектом исследования в работе были кролики-самцы породы шиншилла, массой 2,5—3 кг.

Черепно-мозговую травму средней степени тяжести наносили стандартным методом [8]—посредством свободного падения груза массой 500 г с высоты 2,2 м на голову фиксированного в станке животного. Крыс забивали воздушной эмболией через сутки после нанесения травмы, что связано с максимальным нарушением процессов дыхания и окислительного фосфорилирования мозга в этот период времени [9]. Извлечение мозга и все последующие операции с ним проводили на холоде. Ткань мозга гомогенизировали в фосфатно-солевом буфере (рН 7,4) при соотношении ткань мозга—буфер (1:9).

Экстракцию липидов проводили по методу Фолча [10]. Содержание ДК определяли на спектрофотометре «СФ-26» по поглощению растворов липидов в системе метанол-гексан 5:1 при $\lambda_{\text{max}} = 232$ нм [11]. Основания Шиффа регистрировали по интенсивности флуоресценции хлороформных растворов липидов на спектрофлуорометре

«Hitachi-MPF-2a» при длине волны возбуждающего света 360 нм и максимуме испускания 420—440 нм. Контролем служила флуоресценция сернокислого хинина в 0,1 н. серной кислоте (1 мг/мл), интенсивность которой принимается за 100% [12].

Суммарная АОА определялась по торможению накопления МДА при инкубации модельной системы при 37° в течение 60 мин.

В качестве субстрата окисления нами была выбрана линоленовая кислота, которая входит в состав фосфолипидов мозга и содержит 3 двойные связи, поэтому все образующиеся при окислении кислоты продукты ПО аналогичны соединениям, возникающим в мозговой ткани в процессе ПОЛ. В литературе же описано использование в этом качестве линолевой кислоты [13], содержащей 2 двойные связи, что делает ее, как нам кажется, менее подходящей для цели данного эксперимента.

Предложенная нами модельная система для определения АОА состоит в следующем: к 50 мл дистиллированной воды добавляли 50 мкл тритона X-100 и 10 мкл линоленовой кислоты. Смесь тщательно встряхивали до получения однородной эмульсии. Все описанные выше манипуляции проводили в атмосфере азота. Затем в каждую пробу (V=1 мл) приливали по 50 мкл 0,01 мМ раствора сульфата железа (II) и 100 мкл исследуемого гомогената мозга и ставили на инкубацию параллельно с модельной пробой. АОА вычисляли в процентах по формуле, где за 100% принимается активность такого антиоксиданта, который полностью подавляет образование МДА в модельной системе за один час инкубации.

$$AOA = 1 - \frac{[MDA_{\text{мн}}]_{60'} - [MDA_{\text{мн}}]_{0'}}{[MDA_{\text{ст}}]_{60'} - [MDA_{\text{ст}}]_{0'}} \cdot 100,$$

где $[MDA_{\text{мн}}]$ — содержание МДА в модельной системе с добавкой гомогената мозга, $[MDA_{\text{ст}}]$ — содержание МДА в растворе линоленовой кислоты соответственно в начальный момент времени (0') и после часовой инкубации (60').

В ходе эксперимента было выявлено достоверное повышение содержания начальных продуктов ПОЛ-гидроперексидов полиеновых липидов у травмированных животных во всех исследованных отделах

Таблица

Перекисные соединения липидов и общая антиоксидантная активность в различных отделах мозга кроликов при черепно-мозговой травме

	полушарие		ствол		мозжечок	
	норма	травма	норма	травма	норма	травма
ДК нм/100мг сырой ткани	17,6±1,4 n=6	33,8±4,4 n=8 p<0,01	19,8±1,9 n=6	31,7±3,0 n=8 p<0,01	17,3±1,7 n=6	29,2±2,0 n=8 p<0,01
МДА нм/100 мг сырой ткани	5,6±0,8 n=7	8,3±0,6 n=13 p<0,05	8,4±0,8 n=7	8,7±0,7 n=7 p>0,05	4,1±0,7 n=7	6,1±0,5 n=13 p<0,05
ОШ в %	95,3±19,2 n=5	177,2±24,2 n=5 p<0,05	164,7±54,8 n=5	192,7±39,0 n=5 p>0,05	75,7±23,2 n=5	168,2±30,0 n=5 p<0,05
АОА в %	50,2±14,5 n=4	0 n=6 p<0,05	60,3±13,5 n=4	20,3±16,9 n=6 p>0,05	58,4±14,5 n=4	0 n=6 p<0,05

мозга (таблица), что позволяет сделать заключение об активации процессов ПОЛ при черепно-мозговой травме. Однако следует отметить, что увеличение концентрации МДА и ОШ наблюдается лишь в полушариях и мозжечке, а в стволе остается в пределах нормы. Следовательно, в ткани ствола мозга процесс ПОЛ как бы останавливается на образовании сопряженных диенов и не доходит до образования наиболее токсичных продуктов—карбонильных соединений, что, вероятно, связано с достаточно высокой остаточной АОА ткани ствола мозга травмированных животных. Это, в известной мере, подтверждается и тем, что количество ОШ при травме в ткани ствола мозга остается на уровне нормы. В то же время АОА в полушариях мозга и в мозжечке падает до нулевых значений.

Из анализа полученных данных следует, что при черепно-мозговой травме в мозгу резко подавляется одна из важнейших защитных реакций этого органа—АОА и нарастает количество перекисных соединений липидов. Это, как было показано нами ранее, сопровождается разрушением целостности митохондрий клеток мозга и соответственно нарушением его энергетического обмена [14].

LIPID PEROXIDATION AFTER BRAIN TRAUMA

DEMCHUK M. L., LEVCHENKO L. L., FROMYSLOV M. Sh.

Burdenko Institute of Neurosurgery, USSR Academy of Medical Sciences, Moscow

We have examined (1) changes in the activity of reactions leading to the formation of lipid peroxides and (2) total antioxidative activity of rabbit brain 24 hours after brain trauma. The content of diene conjugates, malonic acid dialdehyde and Schiff bases increased in the hemispheres and cerebellum, whereas the total antioxidant activity decreased in the studied parts of the brain.

ЛИТЕРАТУРА

1. Никиткин Е. В., Крыжановский Г. Н. Патол. физиол. и эксперим. терапия, № 6, с. 19—24, 1987.
2. Меерсон Ф. З., Каган В. Е., Прилико Л. Л. Бюл. эксперим. биол. и мед., № 10, с. 404—406, 1979.
3. Меерсон Ф. З., Каган В. Е., Прилико Л. Л. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 100, № 12, с. 661—663, 1980.
4. Кучеряну В. Г., Атаджанов М. А., Никиткин Е. В. Бюл. эксперим. биол. и мед., № 1, с. 39—41, 1989.
5. Воробьев Ю. В., Промыслов М. Ш. Нейрохимия, т. 4, № 1, с. 65—67, 1985.
6. Ohtsuka H., Ohtsuka N., Jagi K. Anal. Biochem., v. 95, p. 351—358, 1979.
7. Гаврилов В. Г., Гаврилова Л. Р., Мажуль Л. М. Вопр. мед. химии, т. 1, с. 118—122, 1987.
8. Промыслов М. Ш., Тигранян Р. А. Вестн. АМН СССР, т. 17, № 11, с. 28—31, 1971.
9. Промыслов М. Ш. Вестн. АМН СССР, № 9, с. 81—86, 1982.
10. Dillard C., Tappel A. L. Canadian J. Biochem. Physiol., v. 37, № 8, p. 911, 1959.
11. Cardus D., Vallbona C., Vogt F. B. Aerospace Medicine, v. 36, p. 524, 1965.
12. Csallany A. S., Agas K. L. Lipids, v. 11, p. 412, 1976.
13. Al-Timimi D. J., Dormandy T. L. Biochem. J., v. 198, № 2, p. 283—288, 1977.
14. Промыслов М. Ш. Обмен веществ в мозге и его регуляция при черепно-мозговой травме, М., Медицина, 1984.

Поступила 27.VIII.1989



УДК 612.822.1:577.15.156:615.9

ПРОТЕОЛИЗ И ЕГО ИНГИБИРОВАНИЕ В НЕРВНОЙ ТКАНИ И КРОВИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ДЕМЬЕЛИНИЗАЦИИ ХИМИЧЕСКОЙ ЭТИОЛОГИИ

КУЗЬМИНСКАЯ У. А., БАДАЕВА Л. Н., ДРОБИНСКАЯ О. В., ЗАСЕНКО Н. И.

ВНИИ гигиены и токсикологии пестицидов, полимеров и пластических масс
МЗ СССР, Киев

Значительное место в патологии НС занимают демьелинизирующие заболевания, к числу которых относятся токсические экзо- и эндогенные полиневропатии, а также синдром отдаленной нейротоксичности (ОНТ), возникающий при действии некоторых фосфорорганических соединений (ФОС).

ОНТ клинически проявляется через 7—8 суток после перенесенного острого отравления в форме атаксии, парезов, переходящих к 18—21 суткам в стойкий паралич; морфологически ОНТ характеризуется очаговой демьелинизацией.

Биохимические основы развития синдрома ОНТ изучены недостаточно. Выявлены изменения активности нейротоксической эстеразы [1]. K^+ , Na^+ -АТФазы, β -галактозидазы, кислой фосфатазы, холинэстеразы, уровни гликолипидов, эфиров холестерина, серотонина, 5-ОИУК [2—5]. Вместе с тем, можно полагать, что в развитии процесса демьелинизации химической этиологии важная роль принадлежит активности тканевых протенназ и их ингибиторов, тем более, что при рассеянном склерозе, распространенном демьелинизирующем заболевании, в нервной ткани выявлена повышенная протеолитическая активность [6].

Исходя из вышесказанного предположения, целью настоящей работы явилось изучение активности катепсина Д (КФ 3.4.23.5) и ингибиторов протеолиза при экспериментальной демьелинизации химической этиологии.

Экспериментальную модель демьелинизации вызывали у кур массой 1,0—1,5 кг путем однократного перорального введения 200 мг/кг афоса (0,0-дифенил-1-ацетокси-2,2,2-трихлорэтилфосфонат).

Через 7 суток (стадия предпаралича) и 21 сутки (стадия паралича) кур декапитировали. Для определения активности катепсина Д навески тканей спинного мозга и периферического нерва гомогенизировали в 0,25 М растворе сахарозы, приготовленном на 0,01 М трис-НСl буфере, рН 7,4, содержащем 0,001 М ЭДТА, соотношение ткань—буфер 1:10. Активность катепсина Д определяли по методу Anson [7] в модификации Поляковой и соавт. [8] и выражали в мкмоль тирозина, отщепленного от гемоглобина за 1 ч инкубации при 37°, рН 3,5 на 1 г сырой ткани или 1 л сыворотки.

Для определения активности ингибиторов протенназ ткань спинного мозга гомогенизировали в фосфатном буфере рН 7,6 (соотношение ткань—буфер 1:10); сыворотку крови разводили фосфатным буфером для определения α_2 -макроглобулина (α_2 -МГ) в 20 раз, а

общей антитриптической активности (ОАТА) и α_1 -антихимотрипсина (α_1 -АХТ)—в 100 раз. В гомогенате и разведенной сыворотке крови α_2 -МГ, ОАТА и α_1 -АХТ определяли методом Веремсенко [9] и выражали в мкг инактивированного трипсина на 1 г ткани или 1 мл сыворотки.

Морфологические изменения нервных структур поясничного отдела спинного мозга изучали с помощью метода электронной микроскопии.

Было установлено, что развитие экспериментальной демиелинизации химической этиологии проявлялось у кур возникновением парезов (7 суток после введения препарата) и параличей (21 сутки).

При электронномикроскопическом исследовании обнаружены различной степени выраженности ультраструктурные изменения нейроцитов и миелиновых волокон. На фоне внутри- и межклеточного отека в нейроцитах наблюдаются очаговые перинуклеарные расширения, маргинальная конденсация хроматина, деструкция крист митохондрий и очаговая фрагментация канальцев эндоплазматического ретикулума. Отчетливые нарушения ультраструктуры обнаружены в миелиновых волокнах крупного и среднего калибров. Имеет место очаговая дегенерация, извитость и гомогенизация миелиновых мембран. Обнаружены участки расслоения миелиновых пластин, очаги зернистого распада миелина и изменения его ламеллярной организации. В крупных волокнах расслоение миелина сопровождается снижением его контрастности, вплоть до частичного оптического «лизиса», наличием очаговой демиелинизации.

Активность катепсина Д (табл. 1) в спинном мозгу практически не изменяется. В периферическом нерве наблюдается резкое возрастание активности фермента на 52% в стадии предпаралича и на 96% в стадии паралича. Существенно, на 53%, увеличивается активность катепсина Д в сыворотке крови.

Таблица 1

Активность катепсина Д в нервной ткани (мкмоль/г/ч) и крови (мкмоль/ч/л) кур при экспериментальной демиелинизации (n=10—12)

Объект исследования	Контроль	Предпаралич	Паралич
Спинной мозг	16.53±2.16	15.93±2.36	14.62±2.72
Периферический нерв	5.44±0.90	8.10±0.92 p<0.05	10.64±0.47 p<0.05
Сыворотка крови	12.75±1.87	15.0±2.47	19.5±2.25 p<0.05

Изменения активности ингибиторов протеолиза (табл. 2) носят противоположный характер. В спинном мозгу, в стадии предпаралича, снижается активность α_2 -МГ на 60% и α_1 -АХТ на 20%; в сыворотке крови уменьшается активность всех исследованных ингибиторов: ОАТА, α_2 -МГ и α_1 -АХТ на 16%, 400% и 12% соответственно.

В стадии паралича изменения ингибиторов аналогичны выявленным. В спинном мозгу уменьшена активность α_2 -МГ и α_1 -АХТ на 43% и 25% соответственно; в плазме крови ОАТА—на 20%; α_2 -МГ—на 50% и α_1 -АХТ—на 18%. Обращает на себя внимание значительное (на 40—60%) снижение активности как в спинном мозгу, так и в плазме крови одного из основных ингибиторов протениаз— α_2 -МГ.

Таким образом, проведенные исследования показали, что при развитии экспериментальной демиелинизации химической этиологии в периферическом нерве увеличивается активность катепсина Д, что можно рассматривать как результат нарушения под влиянием фос-

Активность ингибиторов протеолиза в нервной ткани (мкг/г) и крови (мкг/л) кур при экспериментальной демиелинизации (n=7-13)

Показ. тел.	Спинной мозг			Сыворотка крови		
	Контроль	Предпара- лич	Паралич	Контроль	Предпа- рлич	Паралич
ОАТА	331.4±31.8	289.4±18.4	306.4±31.8	3878±189	3275±145 p<0.05	31.08±263 p<0.05
α_2 -МГ	240.0±50.0	94.0±10.0 p<0.05	38.0±10.0 p<0.05	335.0±51.0	181.0±27 p<0.05	160±18.0 p<0.05
α_1 -АХТ	82.4±5.1	67.2±3.6 p<0.05	63.0±5.0 p<0.05	1058±43	933±45 p<0.05	869±42 p<0.05

форорганического соединения афоса нормального процессинга лизо-сомных ферментов.

Существенное увеличение активности ферментов сыворотки крови, скорее всего, является результатом нарушения клеточных мембран.

Обнаруженное снижение активности ингибиторов, в основном, сериновых протеиназ, создает дополнительные условия для усиления процессов протеолиза. Все это может явиться одной из причин очаговой демиелинизации, что подтверждается патоморфологическими исследованиями.

PROTEOLYSIS AND ITS INHIBITION IN NERVOUS TISSUE AND BLOOD IN RESPONSE TO EXPERIMENTAL CHEMICAL DEMYELINIZATION

KUZMINSKAYA U. A., BADAIEVA L. N., DROBINSKAYA O. V., ZASENKO I. I.
National Research Institute of Hygiene and Toxicology of Pesticides, Polymers and Plastics, USSR Ministry of Health, Kiev

An increase in proteolytic activity and decreased activity of proteinase inhibitors, specifically of α_2 -macroglobulin were recorded in the chicken spinal cord, peripheral nerve and blood in response to chemical demyelination with AFOS, a fluororganic compound (O,O-diphenyl-1-acetoxy-2,2,2-trichloroethylphosphonate) having delayed toxicity. Demyelination was confirmed by electron microscopy.

ЛИТЕРАТУРА

1. Johnson M. K. Nature, v. 287, № 2778, p. 105-106, 1980.
2. Таранова Н. П. Вopr. мед. химии, т. 24, № 2, с. 188-192, 1978.
3. Кузьминская У. А., Берсан Л. В., Веремченко Л. М. Гигиена и санитария, № 2, с. 80-81, 1986.
4. Кузьминская У. А., Берсан Л. В., Веремченко Л. М., Шилина В. Ф. Гигиена и санитария, № 10, с. 73-75, 1987.
5. Кузьминская У. А., Дробинская О. В. Гигиена и санитария, № 11, с. 86-88, 1988.
6. Энштейн Э. Белки мозга и спинномозговой жидкости в норме и патологии, М., Мир, 1988.
7. Anson M. L. J. Gen. Physiol., v. 22, p. 79-89, 1938.
8. Полякова Н. М., Белик Я. В., Царюк Л. А. Укр. биохим. журн., т. 32, № 5, с. 623-635, 1960.
9. Веремченко К. И. Кишечная система, Киев, Здоров'я, 1977.

Поступила 14.XII.1989



МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ МЕЖДУ НЕРВНОЙ И ИММУННОЙ СИСТЕМАМИ

БЕРЕЗИН В. А.

Днепропетровский государственный университет

В обзоре кратко охарактеризованы пептидные и полипептидные лиганды, а также антигены и рецепторы, общие для иммунной и нейроэндокринной систем. Анализируются общие принципы молекулярной организации и функциональной активности рецепторов и антигенов на клетках нервной и иммунной систем, относящихся к иммуноглобулиновому суперсемейству. Предполагается, что понимание ряда сторон взаимодействия между нервной и иммунной системами будет лежать на пути изучения функций молекул—представителей иммуноглобулинового суперсемейства, которые экспрессируются клетками обеих систем.

В течение последних четырех десятилетий неоднократно отмечалось феноменологическое сходство нервной и иммунной систем как систем, обеспечивающих адекватное реагирование целостного организма на изменения окружающей внешней и внутренней среды. Как сформулированная на рубеже 60-ых годов Ф. Бернстом клонально-селекционная теория иммунитета была отождествлена с дарвиновским подходом к иммунологии [1], так и феноменологическое сходство усвоения информации привело в 70-ых годах к появлению схем, объясняющих облегчение синаптической проводимости на основе иммунохимических механизмов. Такая аналогия часто прослеживалась почти буквально, путем «переноса» некоторых понятий и участников иммунных взаимодействий в НС [2, 3]. В 70-ых годах на основе обобщения целого ряда экспериментальных результатов взаимного влияния иммунной и нервной систем (нейроанатомические основы наблюдаемых иммунологических эффектов разрушений участков ЦНС, дефектов развития нервной и иммунной систем в эмбриональном развитии; поведенческие реакции—в связи с ответными реакциями иммунной системы на инфекцию) сформировалась отдельная область знаний—нейроиммунология, был основан специальный научный журнал—*Journal of Neuroimmunology* [4]. В последнее время стало очевидным, что объяснение взаимодействий между нервной и иммунной системами будет зависеть от понимания молекулярных событий и конкретных молекул, вовлеченных в эти взаимодействия. Молекулярные механизмы таких взаимодействий в значительной степени связаны с тремя основными моментами, которые и станут ниже пред-

метом более детального обсуждения: существованием общих для обеих систем лигандов (чаще всего пептидной природы); наличием сходных рецепторов и антигенов, включая рецепторы регуляторных пептидов; общими принципами кодирования, молекулярной организации и функциональной активности целого ряда рецепторов и антигенов на поверхности клеток нервной и иммунной систем.

*Пептидные и полипептидные лиганды, общие для
нейроэндокринной и иммунной систем*

Перечень известных в настоящее время пептидных и полипептидных лигандов, общих для нервной и иммунной систем, приведен в табл. 1. Иммунологические эффекты таких нейроэндокринных медиаторов, как аргинин-вазопрессин, окситоцин, гормон роста, соматостатин, вазоактивный интестинальный пептид, вещество Р в настоящее время доказаны [4]. Предполагается также (на основе экспериментов, проведенных в основном *in vitro*) участие нейропептидов непосредственно в модуляции функций лимфоцитов. Так, соматоста-

Таблица 1

Пептидные и полипептидные лиганды, общие для
иммунной и нейроэндокринной систем

Лиганд	Синтез и высвобождение клетками иммунной системы	Синтез и высвобождение клетками НС
1. Соматостатин	Тучные клетки, макрофаги	Гипоталамус, нервные окончания в ПНС
2. Вещество Р	Тучные клетки, макрофаги	Substantia nigra, нейроны коры головного мозга, спинного мозга; гипоталамус, нервные окончания в ПНС
3. Вазоактивный интестинальный пептид	Тучные клетки	Нервные окончания в ПНС в стенках церебральных артерий
4. АКТИ	Лимфоциты	Передняя доля гипофиза
5. Эндорфины	Лимфоциты	Наибольшее содержание в передней и промежуточной долях гипофиза
6. Энкефалины	Лимфоциты, макрофаги	В различных областях головного и спинного мозга. Наибольшее количество в стриатуме и гипоталамусе
7. Пептид Т (октапептид, богатый Thr; аналог вазоактивного интестинального пептида)	Связывание с рецепторами 14 Т-лимфоцитов	Связывание с рецепторами клеток мозга (астроциты)
8. Интерлейкин I 9. Нейролейкин	Макрофаги Продуцируется лектинстимулируемыми Т-клетками. Модулятор функций В-клеток	Астроциты Головной мозг, слюнные железы (фактор роста нейронов)
10. Компонент С3 комплекса	Макрофаги	Синтезируется трансформированными клеточными линиями астроцитов

тип в пикомолярных концентрациях, ингибируя пролиферацию Т-лимфоцитов, тормозит синтез IgA, но не IgM или IgG. Вещество Р в наномолярных количествах, усиливая пролиферацию Т- и В-лимфоцитов, значительно стимулирует синтез IgA в селезенке и пейеровых бляшках. Leu- и Met-энкефалины, а также β -эндорфин усиливают пролиферацию Т-лимфоцитов под действием лектинов. γ -Эндорфин стимулирует лизис клетками—естественными киллерами (НК-клетками) клеток-мишеней (К-562) путем ускорения превращения НК-клеток-предшественников в эффекторные клетки. Met-энкефалин и α -эндорфин также стимулируют функции НК-клеток. γ -Эндорфин ингибирует синтез антител В-лимфоцитами [4—7].

С другой стороны, иммунологические «медиаторы», по-видимому, могут оказывать нейроэндокринные эффекты. Это прежде всего касается пептидов, которые, наряду с их генерированием и высвобождением из ЦНС и ПНС, синтезируются также клетками иммунной сети. Методом радиоиммунного анализа показано, что тучные клетки способны генерировать набор препросоматостатина и пептид, подобный вазоактивному кишечинальному пептиду. Макрофаги способны генерировать соматостатин, пептид, родственный веществу Р, энкефалину и эндорфину, а лимфоциты—АКТГ, эндорфины и энкефалины [4, 8].

Можно также отметить, что некоторые регуляторные молекулы иммунной системы недавно были обнаружены и в НС. К таковым относится интерлейкин 1. Было также показано, что интерлейкин-подобный фактор способен высвобождаться астроцитами [9]. По-видимому, в определенной мере в головном мозгу астроциты могут выполнять функции А-клеток, экспрессируя Ia антигены на своей поверхности и представляя антиген (например, основной белок миелина) Т-лимфоцитам, находящимся около сосудов. Эта функция астроцитов, основанная на их взаимодействии с клетками иммунной системы и связанная с иммунной стимуляцией, вероятно, лежит в основе ряда заболеваний ЦНС, сопровождающихся иммунологической реакцией по отношению к специфическим антигенам мозга и демиелинизацией (множественный склероз, вирусный энцефалит) [9, 10].

Другой лимфокин—нейролейкин (M = 59 кД) в иммунной системе, действуя в раннем ответе (*in vitro*), приводит к образованию антителсинтезирующих клеток (модулирует функции В-клеток) и продуцируется Т-клетками, стимулируемыми лектинами. В то же время нейролейкин высвобождается и в головном мозгу, а также слюнными железами и является фактором роста нейронов, усиливая выживание нейронов спинного и головного мозга в культуре [11].

Антигены и рецепторы, общие для иммунной и нейроэндокринной систем

Наличие общих для иммунной и нервной систем лигандов предполагается и присутствие на поверхности соответствующих клеток сходных рецепторных молекул. Действительно, на поверхности клеток нервной и иммунной систем были обнаружены общие рецепторы, а также целый ряд антигенов, функции которых, по-видимому, отличны от рецепторных (табл. 2).

Для некоторых общих лигандов показана идентичность рецепторов на клетках иммунной и нервной систем (вазоактивный кишечинальный пептид), тогда как в других случаях свойства рецепторов

различны [4]. Так, например, связывание лиганда рецептором Леу-энкефалина на Т-лимфоцитах не ингибируется морфином и налоксоном (в отличие от клеток ЦНС). Связывание β -эндорфина также не ингибируется налоксоном в иммунной системе, в отличие от клеток мозга. Различны, по-видимому, и рецепторы, связывающие вещество Р. Прямое действие на ткани (и на тучные клетки слизистых) вещества Р обусловлено участком, находящимся на карбоксильном конце молекулы, тогда как связывание с Т-клетками и базофилами происходит за счет N-конца [4].

Рецепторные функции ряда поверхностных клеточных гликопро-

Таблица 2

Рецепторы и антигены, общие для иммунной и нейроэндокринной систем

Рецептор (антиген)	Локализация в иммунной системе	Локализация в НС
1. Гликопротеин Leu 7	Естественные киллеры и другие цитотоксичные клетки	Нейроэпителиальные клетки в ЦНС и PNS
2. H-2 и Ia-антигены у мышей. HLA и β_2 микроглобулин у человека	На поверхности макрофагов и лимфоцитов	На поверхности нервных клеток (астроциты)
3. Хромогранины	Селезенка, лимфатические узлы и тимус у грызунов	Секреторные белки — маркеры нейроэндокринных клеток
4. Thy-1 гликопротеин	На поверхности лимфоцитов	На поверхности нейронов у грызунов
5. Рецепторы регуляторных олигопептидов — АКТИ, эндорфинов, энкефалинов, вещества Р, вазоактивного кишечинального пептида	Т- и В-лимфоциты, естественные киллеры	Нейроэндокринные клетки, нейроны и астроциты
6. S-100	Тимоциты грызунов. Т-лимфоциты человека	Глия, нейроны, периферические нервы
7. AX рецептор	Г-лимфоциты	Нейроны
8. Основной белок миелина	Естественные киллеры	Миелин ЦНС и PNS
9. ОКТ-6 и ОКТ-9	Т-лимфоциты	Нейроэпителиальные клетки
10. UCHL-1 антиген	Т-лимфоциты	Нейроны мозжечка (клетки Пуркинье)
11. VLA-гликопротеины	Т-лимфоциты человека	Мембраны клеток головного мозга человека
12. OX-2 гликопротеин	Т-лимфоциты крысы	Нейроны головного мозга крысы
13. T4- гликопротеин (L3T4 у мышей)	Поверхность Т-лимфоцитов (в основном хелперы)	Клетки головного мозга (астроциты)

теинов (OX-2, Thy-1), локализованных как на лимфоцитах, так и клетках мозга, не изучены [12]. Также не ясны функции на поверхности лимфоцитов и нейронов человека группы VLA-гликопротеинов (очень поздно активируемых антигенов лимфоцитов) [13].

Не является неожиданным обнаружение в лимфоцитах специфического для мозга Са²⁺-связывающего белка S-100 [14], который в последние несколько лет был найден в целом ряде органов и тканей неинтродуцированного генеза [15]. Обнаружение антигенов гистосовместимости (Ia-антигенов) на поверхности астроцитов согласуется с возможной их ролью в качестве представляющих антиген А-клеток [10].

Большой интерес представляют результаты по нахождению дифференцировочного антигена T4 (L 3T4—у мышей), присутствующего обычно на поверхности субпопуляции Т-лимфоцитов—хелперов (а также на некоторых Т-супрессорах и цитотоксических клетках), в головном мозгу [16]. Анализ с использованием ДНК-зондов показал, что у мышей м-РНК, специфическая для L 3T4, экспрессируется как Т-лимфоцитами, так и в головном мозгу [17]. Предполагают, что T4+ Т-лимфоциты могут специфически взаимодействовать с ограниченным набором антигеннесущих клеток мишеней посредством взаимодействия Т-4 белка с продуктами генов главного комплекса гистосовместимости класса II. Аналогично и на клетках мозга T4 может функционировать как молекула, обеспечивающая межклеточные взаимодействия в ЦНС [16]. Антиген T4 специфически связывается с наружным гликопротеином gp 110 оболочки вируса, вызывающего синдром приобретенного иммунодефицита у человека (HIV). Наличие аналогичного T4 рецептора на поверхности клеток мозга объясняет, наряду с лимфотропным, и нейротропный характер действия этого вируса [16, 18].

*Общие принципы кодирования, молекулярной организации
и функциональной активности некоторых рецепторов
и антигенов на клетках нервной и иммунной систем*

Совершенствование технологий молекулярного клонирования и секвенирования нуклеотидных последовательностей позволило резко ускорить расшифровку и анализ полипептидных последовательностей различных белковых молекул, а вместе с этим и выявить принципиально новые закономерности в их молекулярной организации и возможных функциях в организме. Так, к середине 80-ых годов сложилось представление о существовании иммуноглобулинового суперсемейства генов (табл. 3), число представителей которого расширяется с каждым годом [19]. Гены этого суперсемейства кодируют в основном семейство мембранных белков, N-концевая (и большая) часть полипептидной последовательности которых удерживается на внешней поверхности плазматической мембраны за счет трансмембранного участка цепи. Карбоксильный конец цепи обращен внутрь клетки и часто содержит участки фосфорилирования. Возможно, с этим связана передача сигнала с рецептора внутрь клетки. Структура N-концевой части таких молекул обладает удивительной гомологией со структурой V- и С-доменов молекул иммуноглобулинов. Помимо мембранных представителей этого суперсемейства, имеются и растворимые молекулы, синтез которых направляется м-РНК, синтезирующимися в результате альтернативного сплайсинга первичного продукта транскрипции.

В контексте тематики настоящего обзора наибольший интерес представляет то, что, помимо представителей иммуноглобулинового суперсемейства, характерных для иммунной сети (семейство имму-

Представитель	Характеристика гомологичных V- и С- подобных доменов	Локализация
1. Ig-рецепторы В-клеток	2 H-цепи; 2 L-цепи; II-цепь; 1 V-домен, 3—4 C-домена. L-цепь: 1 V-домен, 1 C-домен	В-лимфоциты
2. Рецепторы Т-клеток	α , β и γ -цепи: по 1 V и по 1 C-домену	Т-лимфоциты
3. Антигены главного комплекса гистосовместимости: класс I класс II	1 C-домен; β_2 -микроглобулин—12 C-домен. α и β -цепи: по 1 C-домену	Лимфоциты, клетки других органов и тканей; астроциты
4. α -1 В-гликопротеин	5 Ig-подобных доменов	Плазма крови человека
5. Поли-Ig-рецептор	5 Ig-подобных доменов	Рецептор, ответственный за транспорт Ig через мембрану клеток слизистых оболочек
6. T3 ϵ и T3 α	1 Ig-подобный домен	Компоненты T3-рецептора Т-клеток
7. CD8 (Lyt 2,3)	2 субъединицы: по 1 V-подобному домену	Т-клетки
8. CD4 (L3 T4)	1 V-подобный домен	Т-лимфоциты (в основном хелперы); клетки головного мозга (предположительно астроциты)
9. Thy-1 (θ)-гликопротеин	1 Ig-подобный домен	Т-лимфоциты; клетки головного мозга (нейроны)
10. OX-2 -гликопротеин	1 V- и 1 C-подобный домены	Лимфоциты; нейроны
11. NCP-3	4 Ig-подобных домена	Цитопlasma нейронов
12. N-CAM- молекула клеточной адгезии	5 C2-подобных доменов	Поверхность плазматической мембраны нейронов. В небольших количествах в глиальных клетках
13. LI- молекула клеточной адгезии	6 C2-подобных доменов	Поверхность плазматической мембраны нейронов
14. MAG-миелин ассоциированный гликопротеин	5 C2-подобных доменов	Олигодендроны. Миелин ЦНС и PNS

иммуноглобулинов-рецепторов В-лимфоцитов, α , β и γ -цепей рецепторов Т-клеток; антигены главного комплекса гистосовместимости классов I и II; вспомогательные молекулы на Т-клетках—CD8, вовлеченные во взаимодействие с антигенами гистосовместимости класса I; рецептор поли-Ig, ответственный за транспорт некоторых классов иммуноглобулинов через мембраны слизистых; δ и ϵ -цепи, связанные с молекулой T3 Т-клеточного рецептора и, возможно, образующие non-

ные каналы; белок плазмы крови человека— α 1В-гликопротеин с неизвестной функцией, целый ряд членов этого суперсемейства представляет собой молекулы, общие для клеток иммунной и нервной систем, а также молекулы, характерные в основном только для клеток нервной ткани [19].

К таким общим для клеток иммунной и нервной систем относятся рецептор T4, имеющий 1 V-подобный домен, Thy-1-гликопротеин (1 Ig-подобный домен) и ОХ-2-гликопротеин, имеющий 1 V- и 1 С-подобный домены (табл. 3). Оказалось также, что по крайней мере 3 представителя молекул клеточной адгезии нервной ткани относятся к белкам, имеющим гомологичные иммуноглобулиновым домены. Общим для этих 3-х адгезивных молекул—N-CAM, L 1 и MAG (помимо их участия в Ca^{2+} -независимой межклеточной адгезии) является то, что с N-конца у них расположено последовательно значительное число (5—6) С-подобных доменов. Представители другого типа межклеточной адгезии (Ca^{2+} -зависимой)—кадгерины E, P и N—не принадлежат к этому типу суперсемейства [20].

N-CAM представлена тремя основными формами—полипептидами A, B и C (соответственно Mg 190, 135 и 115 кД), которые кодируются различными РНК-мессенджерами, образующимися в результате альтернативного сплайсинга первичного РНК-транскрипта единственного гена [21, 22]. Из 19 экзонов этого гена первые 1—14 кодируют экстраклеточную часть белка, содержащую все 5 участков, гомологичных С-доменам иммуноглобулинов, и общую для всех трех полипептидов A, B и C. Места полиаденилирования РНК находятся в конце экзонов 15 и 19. Сплайсинг экзона 15 к экзону 14 продуцирует м-РНК для С-формы N-CAM, лишенной трансмембранной области и связанной с наружной поверхностью мембраны посредством ковалентной связи через фосфатидилинозитол. Полипептид В отличается от полипептида А тем, что не содержит участок, кодирующийся экзоном 18 [22] (рисунок). На самом деле гетерогенность N-CAM,

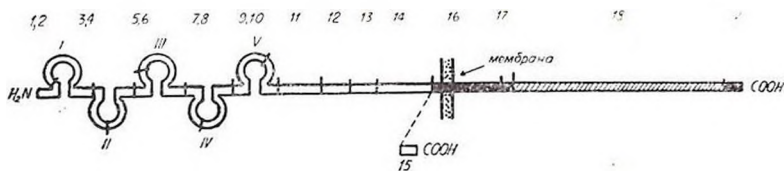


Рис. Схематическое изображение структуры молекулы клеточной адгезии N-CAM. I, II, III, IV и V—области полипептидной цепи, гомологичные С-доменам иммуноглобулинов. Отрезками указаны границы, кодируемые соответствующими экзонами. Светлые участки—экстраклеточный N-концевой фрагмент N-CAM, общий для всех трех видов—А, В и С. Темные участки—общие для А- и В-форм N-CAM. Заштрихованный участок (соответствует экзону 18)—характерен только для А-формы N-CAM. 1—19—номера экзонов гена N-CAM цыпленка [22]

по-видимому, значительно выше, поскольку недавно обнаружены дополнительные участки последовательности ДНК, по которым может наблюдаться сплайсинг. При этом общее число типов генерируемых молекул N-CAM (только за счет различий в аминокислотной последовательности) должно быть равным 8 [23]. Одной из интересных черт гликозилирования N-CAM является присутствие углеводного

эпитопа HNK-1, который впервые был охарактеризован в иммунной системе на НК-клетках человека. Затем оказалось, что целый ряд других гликоконъюгатов, включая несколько адгезивных молекул, содержат этот эпитоп [24]. В головном мозгу N-CAM обеспечивает Ca^{++} независимую адгезию типа: нейрон-нейрон; астроцит-нейрон; астроцит-астроцит [25].

Другая молекула клеточной адгезии, представитель иммуноглобулинового суперсемейства—L1, ранее была описана как фетальный мембранный гликопротеин [26] и Ng-CAM [27]. Эта молекула в экстрацеллюлярной части (N-концевой) содержит 6 С-гомологических доменов, а также, как и N-CAM и естественные киллеры, углеводный HNK-1 эпитоп [20]. L1 вовлечена в адгезию типа: нейрон-нейрон, а также нейрон-глия. Имеется указание на то, что эти два типа адгезии связаны с различными участками одной и той же молекулы [28].

MAG—миелинассоциированный гликопротеин—ответствен за взаимодействия типа нейрон-олигодендроцит и олигодендроцит-олигодендроцит и имеет в экстрацеллюлярной части 5 петлевых участков, гомологичных С-доменам молекул иммуноглобулинов, а также углеводный HNK-1-эпитоп. Две формы MAG продуцируются за счет альтернативного сплайсинга РНК [29, 30].

Если подытожить имеющиеся данные по функциональной роли мембранных белков—представителей иммуноглобулинового суперсемейства (кроме тех случаев, когда эти функции неизвестны), локализованных на поверхности клеток иммунной и нервной систем, то можно сказать, что это всегда функции специфического связывания (рецепции). В случае антигенных рецепторов (иммуноглобулинов на поверхности В-лимфоцитов и рецепторов Т-клеток)—это гетерофильческое связывание антигена (распознавание не своего), тогда как межклеточная адгезия (N-CAM, L1) осуществляется по типу гомофильческого связывания (распознавание своего). N-CAM, находящаяся на поверхности одной клетки нейрона, связывается с молекулой N-CAM, локализованной на поверхности другой клетки или ее отростка. При этом константа гомофильического связывания может достигать величины порядка 10^6 — 10^8 М [31]. Константа гетерофильического связывания в случае взаимодействия молекулы иммуноглобулина с гаптогеном достигает величин порядка 10^5 — 10^6 М [32]. Гетерофильическое взаимодействие происходит за счет взаимодействия V-доменов легкой и тяжелой цепей рецепторного (и секретируемого) иммуноглобулина теми участками, которые формируют триптофановую петлю, в результате чего образуется антигенсвязывающий карман. Основание этого кармана образовано слившейся парой триптофановых β -петель V-димера, а три гипервариабельных участка каждого V-домена формируют его стенки. Это и есть структурная основа гетерофильического связывания [33]. Диверсификация такого типа связывания в пределах иммунной сети достигается перестройками геномов В- и Т-клеток в эмбриональном развитии, в результате которых предшественники В- и Т-клеток получают уникальные комбинации исходных генетических участков, кодирующих V-области.

Как показывают расчеты Ohno [33], между С-подобными доменами возможно гомофильическое взаимодействие за счет остатков Thr, Ser и Leu двух участков β -слоев С-доменов, находящихся на противоположной инвариантному триптофану стороне домена. Именно такая структура характерна для ряда С-гомолических доменов молекулы клеточной адгезии нервной ткани N-CAM.

Если гетерофилический тип взаимодействий в иммунной сети лежит в основе формирования потенциально практически неограниченного набора специфических реакций в виде специфических антител при гуморальной, либо специфических эффекторных Т-лимфоцитов при клеточной формах иммунного ответа, то возникает вопрос, каким образом гомофилическое взаимодействие (за счет С-подобных доменов молекул клеточной адгезии) между клетками нервной ткани создает уникальный и чрезвычайно сложный набор связей в сети нервных элементов, позволяющий осуществлять громадное разнообразие адекватных поведенческих реакций. Оказалось, что число таких «сигнальных» адгезивных молекул в ЦНС, включая и представителей, не относящихся к иммуноглобулиновому суперсемейству (N-кадгерин), относительно невелико. Эффекты альтернативного сплайсинга, а также вариации и особенности углеводной части этих гликопротеинов несколько увеличивают их разнообразие. Кроме того, адгезивность клеток сильно (и не линейно) зависит от концентрации этих молекул на клеточной поверхности. При увеличении концентрации N-CAM на поверхности трансфицированных клеток в 2 раза адгезивность возрастает в несколько десятков раз [34]. Однако все равно разнообразие клеточных меток за счет молекул адгезии не может сравниться с разнообразием клонов лимфоцитов за счет специфических рецепторов антигенов.

Очевидно, что феноменологическое сходство нервной и иммунной систем, как систем приобретения индивидуального опыта, обеспечивающих адекватное реагирование организма на широкий спектр воздействий (даже если эти воздействия уникальны и никогда ранее в эволюции не встречались) достигается в нервной и иммунной сети различными путями. Эти различия связаны, по-видимому, с тем, что основными непосредственно действующими элементами в иммунной сети являются «маркированные» клетки и секретируемые ими «маркеры» (молекулы иммуноглобулинов), относительно свободно перемещающиеся и доступные практически в любой жидкостной части организма. Поэтому здесь в онтогенезе реализуется максимально преддетерминированный принцип маркирования: один клеточный клон — один строго специфический тип рецептора. В нервной сети (взрослого организма) клеточные элементы, образующие сеть (нейроны), остаются в основном неподвижными. Решающее значение приобретает характер связей между элементами за счет отростков нейронов, обеспечивающий регуляцию проведения возбуждения. Поскольку синаптогенез в эмбриональный и ранний постэмбриональный периоды, а также вероятная реорганизация синаптических связей во взрослом организме — процессы, протекающие локально, то здесь возможно использование многократно практически одного и того же относительно однообразного набора адгезивных молекул, локально генерирующих различные варианты клеточных взаимосвязей в пределах различных участков нервной сети [35].

Таким образом, несмотря на сходство молекулярных принципов организации (наличие гомологичных Ig-подобных доменов), представители иммуноглобулинового суперсемейства, присущие клеткам только иммунной и только нервной сети, функционально не аналогичны. Функции же других представителей этого суперсемейства (T_H-1 и OX-2-гликопротеинов), общих для нервной и иммунной систем, остаются на сегодняшний день не изученными. OX-2-гликопротеин (так же, как и CD4, относительно функции которого предполагается участие в распознавании Т-лимфоцитами молекул главного комплекса

гистосовместимости класса II) содержит I V-подобный домен. Однако, несмотря на такую гомологию, соответствующий генный участок (так же, как и в случае с CD4) никаких перестроек в онтогенезе не претерпевает [19]. Это означает, что за счет таких общих, экспрессирующихся клетками иммунной и нервной систем, молекул иммуноглобулинового суперсемейства на клетках нервной сети не может реализоваться принцип множественных предтерминированных взаимодействий, в той или иной форме аналогичный взаимодействию разнообразных антител со специфическими антигенами. Какая форма взаимодействий может реализоваться за счет этих молекул—не известно. При этом невольно напрашивается аналогия с лигандами и рецепторами общими для клеток обеих систем. Можно предположить, что понимание по крайней мере некоторых сторон взаимодействий между нервной и иммунной системами будет лежать на пути изучения функций молекул—представителей иммуноглобулинового суперсемейства, экспрессирующихся клетками обеих систем.

MOLECULAR BASIS FOR INTERACTION BETWEEN NERVOUS AND IMMUNE SYSTEMS

BEREZIN V. A.

Dnepropetrovsk State University

The properties of peptides, polypeptide ligands, antigens and receptors common to immune and neuroendocrine systems are reviewed. Similar molecular organization and functional activity of antigens presented to the cell and receptors belonging to the immunoglobulin superfamily is analysed. It is proposed that the understanding of certain interactions between the nervous and immune system will be through studies of the immunoglobulin superfamily members expressed on the cells both systems.

ЛИТЕРАТУРА

1. Burnet F. M. *Nature*, v. 203, p. 451—453, 1964.
2. Ашмарин Н. П. Загадки и откровения биохимии памяти. Л., ЛГУ, 1975.
3. Березин В. А. *Журн. общей биологии*, т. 42, с. 687—697, 1981.
4. Pavan D. G., McGillis J. P., Goetzl E. J. *Adv. in Immunol.*, v. 39, p. 299—323, 1986.
5. Johnson H. M., Smith E. M., Torres B. A., Blotok J. E. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci.*, v. 79, p. 4171, 1982.
6. Puppo F., Corsini C., Mangini P., Bottaro L., Barreca T. *Immunopharmacology*, v. 10, p. 119—124, 1985.
7. Hietinen C. J., Bevens C., Kavcilaars A., Ballient R. E. *J. Immunol.*, v. 136, p. 213—215, 1981.
8. Goetzl E. J., Chernov-Rogan T., Cooke M. F., Renold F., Pavan D. G. *J. Immunol.*, v. 135, p. 2707—2711, 1985.
9. Bodmer S., Tobler L., Borbely A. A., Fontana A. In: *Physiol. Metab. and Immunol. Actions of Interleukin 1*. Proc. Symp. Ann. Arbor Mich., June, 9—6, 1985*, p. 143—149, 1985.

10. Fontana A., Fierz W., Wekerle H. *Nature*, v. 307, № 5948, p. 273—276, 1984.
11. Gurney M. E., Apatoff B. R., Spear G. T., Baume C. M. J., Antel J. R., Bania M. B., Reber A. T. *Science*, v. 234, p. 574—581, 1986.
12. Barclay A. N., Clark M. J., McCaughan G. W. *Biochem. Soc. Symp.*, v. 51, p. 149—157, 1986.
13. Pischel K. D., Bluestein H. G., Woods V. L. *J. Exp. Med.*, v. 164, p. 393—406, 1986.
14. Kanamori M., Endo T., Shirakawa S., Sakurai M., Hidaka M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 108, p. 1447—1553, 1982.
15. Suzuki F., Nakajima T., Kato K. *J. Biochem.*, v. 92, p. 835—838, 1982.
16. Maddon P. J., Dalgleish A. G., McDougal J. S., Clapham P. R., Weiss R. A., Axel R. *Cell*, v. 47, p. 333—348, 1986.
17. Tourville R., Gorman D. S., Field E. H., Hunkapiller T., Parnes J. R. *Science*, v. 234, p. 610—614, 1985.
18. Pert C. B., Hill J. M., Ruff M. R., Berman R. M., Robey W. G., Arthur L. O., Ruscetti F. W., Farrar W. L. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 83, p. 9254—9258, 1986.
19. Hunkapiller T., Hood L. *Nature*, v. 323, p. 15—16, 1986.
20. Moos M., Tacke R., Scherer H., Teplow D., Früh K., Schachner M. *Nature*, v. 334, p. 701—703, 1988.
21. Owens G. C., Edelman G. M., Cunninham B. A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 84, p. 294—298, 1987.
22. Cunningham B. A., Hemperly J. J., Murray B. A., Prediger E. A., Brackenbury R., Edelman G. M. *Science*, v. 236, p. 799—806, 1987.
23. Santoni M. J., Barthels D., Vopper G., Boned M., Goridis C., Wille W. *Eur. Mol. Biol. Organization J.*, v. 8, p. 385—392, 1989.
24. Cole G. J., Schachner M. *Neurosci. Lett.*, v. 78, p. 227—232, 1987.
25. Kethauer G., Faissner A., Schachner M. *Nature*, v. 316, p. 728—730, 1985.
26. Berezin V., Rasmussen S., Bock E. -In: *Protides of the Biol. Fluids*, v. 30, p. 127—130, Oxford, Pergamon Press, 1983.
27. Grumet M., Edelman G. M. *J. Cell Biol.*, v. 98, p. 1746—1756, 1984.
28. Grumet M., Edelman G. M. *J. Cell Biol.*, v. 106, p. 487—503, 1988.
29. Salzer J. L., Holmes W. P., Colman D. R. *J. Cell. Biol.*, v. 104, p. 957—965, 1987.
30. Lai C., Watson J. B., Bloom F. E., Sutcliffe J. G., Milner R. J. *Immunol. Rev.*, № 100, p. 129—151, 1987.
31. Moran N., Rock F. *FEBS Lett.*, v. 242, p. 121—124, 1988.
32. Кульберг А. Я. *Молекулярная иммунология*, М., Высшая школа, 1985.
33. Ohno S. *Exp. clin Immunogenet.*, v. 4, p. 181—192, 1987.
34. Edelman G. M., Murray B. S., Mege R. M. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 84, p. 8502—8506, 1987.
35. Reeke G. N., Edelman G. M. -In: *Annals, New York Acad. Sci.*, p. 181—201, 1985.

Поступила 6. X. 1989.



УДК 612.822.1+612.815.1

РАДИОЛИГАНДНЫЙ АНАЛИЗ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ
ГЕТЕРОГЕННОСТЬ 5-HT₁-РЕЦЕПТОРОВ

КОРНЕЕВ А. Я.

НИИ фармакологии АМН СССР, Москва

В обзоре рассматривается проблема гетерогенности рецепторов серотонина. Приводятся данные, касающиеся радиолигандного анализа, физиологических эффектов, эффекторных механизмов и фармакологических свойств 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1C} и 5-HT_{1D}-рецепторов.

Материал, посвященный сравнительному изучению 5-HT₂ и 5-HT₃-рецепторов опубликован ранее («Нейрохимия», т. 8, № 4, 1989 г.).

Гиперполяризующие серотониновые рецепторы—5-HT₁-рецепторы включают как минимум 4 подтипа, которые различаются по фармакологическому профилю, эффекторному механизму, региональному распределению (по последним двум параметрам подтипы 1B и 1D дублируют друг друга, будучи представленными у различных видов животных) и, видимо, соответствуют различным мембранным белкам (табл. 1, 2). Общим признаком 5-HT₁-рецепторов является высокая (порядка нмоль) аффинность к серотонину (5-HT), что позволяет использовать его как радиолиганд.

5-HT_{1A}-рецепторы

5-HT_{1A}-рецепторы филогенетически относительно стабильны, они обнаружены у всех исследованных видов млекопитающих [1]. Рецепторы со сходными свойствами присутствуют у *Aplysia* [2]. Вместе с тем, выявлены значительные межвидовые различия в региональном распределении 5-HT_{1A}-рецепторов по отделам мозга [3]. Так, в гиппокампе крысы наибольшая их плотность наблюдается в зубчатой извилине, тогда как в гиппокампе человека—в *Regio Superior* и в *Subiculum* [1]. В коре мозга крысы концентрация 5-HT₁-рецепторов выше в глубоких слоях, а в коре мозга человека—в наружных.

Данные по региональному распределению 5-HT_{1A}-рецепторов в мозгу крысы представлены в табл. 1. Наибольшая концентрация отмечена в гиппокампе, латеральных ядрах перегородки, ядрах шва, энторинальной коре. В мозжечке 5-HT_{1A}-рецепторы не обнаружены [4].

Используя фотоаффинный лиганд 5-HT_{1A}-рецепторов—п-азидо-RAPP, Shih и соавт. показали, что величина M полипептида, на котором находятся места связывания, соответствует 55 кД [4].

Радиолигандный анализ. К числу соединений, обладающих высокой аффинностью и селективностью к 5-HT_{1A}-рецепторам, принадлежит 8-гидроксн-2-(ди-п-пропиламино)тетралин (DPAT), 1-[2-(4-аминофе-

нил)этил]-4-(3-трифторметилфенил)пиперазин (РАР), ипсантрон (TVXQ 7821), буспирон, гепирон, фленидоксид, спирокаптин, Wу-47846, NDO-008, MLD-73005EF, MLD-72832, BAY R1531, CGS-18660A [4-10].

Таблица 1

Региональное представительство серотонинергической системы в мозгу крысы

Отдел мозга	Ядро*	Содержание**		Рецепторное связывание***		
		5-HT	5-ОИУК	5-HT	1A	1B
Обонятельный бугорок	м	48	80	53	27	31
Перегорodka	д	85		57	51	43
Базальные ганглии:						
прилежащее ядро	д	100	100	38	< 2	37
бледный шар	д			109	0	100
хвостатое ядро	д, м, в	32		32	< 2	31
Миндалины	д	75		55	8	48
Гиппокамп:	м, д	45	65			
зубчатая извилина				100	100	16
поле СА-1				65	54	19
Гипоталамус	м, д	100	100			
вентромедиальные ядра				79	29	55
медиальные маммиллярные ядра				53	7	47
Таламус	м, д	66	100			
центромедиальные ядра				50	9	42
Скорлупа	м, д			44	13	33
Кора						
фронтальная	м, д	68	34	40	10	32
фронтотемпоральная	м, д	55		46	12	35
затылочная	м, д					
Мозжечок	в, н	8	8	10	< 4	< 4
Средний мозг:	м, д	76	100			
дорзальное ядро шва				69	47	30
медиальное ядро шва				34	20	17
Черное вещество:	д					
ретикулярная часть				81	22	62
компактная часть				24	0	24
Мост: ядро лицевого нерва		40	47	23	13	12
Продолговатый мозг						
ядро спинномозгового				32	20	16
пучка тройничного нерва						

Примечание. * Ядро, посылающее серотонинергические аксоны в данный отдел мозга. М—медиальное ядро шва, Д—дорзальное ядро шва. ** Концентрации серотонина (5-HT) и 5-оксиндолюксусной кислоты (5-ОИУК) выражены в % от их содержания в гипоталамусе крысы, равного соответственно 15 пмоль на мг ткани (5-HT) и 3,4 пмоль/мг ткани. *** Величина специфического связывания [³H]5-HT и концентрации различных популяций 5-HT-рецепторов выражены в % от максимальной величины для каждого рецептора.

Наиболее широко для изучения 5-HT_{1A}-рецепторов используют [³H]DPAT. При помощи этого лиганда в гиппокамне и коре мозга человека выявлен один класс мест связывания с $B_{max} = 136$ и 107 фмоль/мг белка и $K_d = 0,87$ и 0,70 нМ соответственно [3]. В коре мозга крысы B_{max} для [³H]DPAT составляет 132 фмоль/мг белка и $K_d = 1,2$ нМ [11], а в гиппокамне $B_{max} = 405$ фмоль/мг белка и $K_d = 0,98$ нМ [5]. Фармакологический профиль данных мест связывания соответствует 5-HT_{1A}-рецепторам. Вместе с тем, в полосатом теле мозга крысы выявлено два класса мест связывания [³H]DPAT, один

из которых, как заключают авторы на основании ингибиторного анализа, принадлежит нейрональному транспортеру 5-HT [12]. Однако данные для полосатого тела мозга были получены при использовании инкубационной среды, не содержащей аскорбиновой кислоты, что мо-

Таблица 2

Подтипы 5-HT₁-рецепторов

Подтип	5-HT _{1A}	5-HT _{1B}	5-HT _{1C}	5-HT _{1D}
Селективный лиганд	DPAT PAPP BMU-7378 MDL 72832 ипсапирон буспирон	CGS-12066B		
Радиолиганд	[³ H]5-HT [³ H]DPAT [³ H]PAPP [³ H]WB-4101 [³ H]ипсапирон	[³ H]5-HT [¹²⁵ I]йодоциано- пиндолол	[³ H]5-HT [³ H]мезулергин [¹²⁵ I]йодоЛСД	[³ H]5-HT [³ H]рауволь- син
Агонист	5-карбоксаминотриптамин			5-карбоксаминотриптамин
	MDL 72832 R _n -24. 969 DPAT, PAPP буспирон	CGS-12066B R _d -24. 969 TFMRP		R _n -24. 969
Антагонист	BMU-7378 пропранолол пиндолол метерголин спироперидол	метипетин пропранолол пиндолол метерголин (-) 21-009	мезулергин миансерин	
Отдел мозга с высоким со- держанием	гиппокамп ядра шва латеральные ядра перегородки	бледный шар хвостатое ядро черное вещество скорлупа	сосудистые сплетения желудочков	бледный шар хвостатое ядро черное вещество скорлупа
Эффект внутри клетки	cAMP	cAMP	фосфатидил- инозитол	cAMP

жет привести к выявлению артефактных мест связывания. Кроме 5-HT_{1A}-рецепторов, DPAT с аффинностью порядка сотен нМ взаимодействует с α -2-адренорецепторами, по отношению к которым является антагонистом [13] (табл. 3). Лигандами 5-HT_{1A} рецепторов являются некоторые 3-метилпроизводные DPAT, а также его структурный аналог, соединение NDO-008. Структурно близкий к DPAT 5-метил-3-(ди-п-пропиламино)хроман (MDPAC) и ряд других производных дипропиламинохромана обладают высокой аффинностью и селективностью к 5-HT_{1A}-рецепторам [5]. [³H]MDPAC выявляет в гиппокампе крысы один класс мест связывания с B_{max}=409 фмоль/мг белка и K_d=1,04 нМ, идентичный по фармакологическим критериям 5-HT_{1A}-рецепторам. Можно отметить, что величина B_{max} в данном случае идентична полученной при помощи [³H]DPAT.

Представитель группы производных пиримидинил-пиперазина, высокоаффинных к 5-HT_{1A}-рецепторам, [³H]ипсапирон выявляет в гип-

покампе телянка два класса мест связывания с $B_{max} = 200$ и 540 фмоль/мг белка и $K_d = 1,1$ и $52,0$ нМ соответственно [14, 15]. Высокоаффинные места соответствуют 5-HT_1 -рецепторам, в то время как низкоаффинные, вероятно, α -1-адренорецепторам, также имеющим относительно высокое сродство к этому лиганду [9] (табл. 3). В микромолевых концентрациях [^3H]ипсапирон способен связываться также с α -2-адренорецепторами [9, 16].

Таблица 3

Аффинность 5-HT_1 селективных лигандов к различным типам моноаминовых рецепторов (IC_{50} , нМ)

Лиганды	Р е с е п т о р ы								
	Серотониновые			Адрениновые			Дофаминовые Гис*		
	1A	1B	2	α -1	α -2	β -1	D1	D2	H1
ВМУ—7378	0.002	9.6	0.26	0.19	>10	>10	>2	0.1	1.95
DPAT	0.010	2.0	5.20	>6	0.4	>10	>2	>2	>1
mDPAC	0.003	0.29	>70				>5		
Ипсапирон	0.010	>8	>3	0.50	2.2	>10		>3	>1
Буспирон	0.020	>10	2.1	1.4	>7		>5	0.38	>4
TFMPR	0.03	0.1	0.15	>5	0.2	2	>5	>1	
CGS—12066B	0.88	0.05	>6	>6	>1	>1		>5	
Йохимбинидолол	0.08	0.002							
WB—1101	0.001			0.001					

Примечание. *—Гистаминовые рецепторы. Данные взяты из работ [5, 9, 16, 22, 29, 92].

Сходный по структуре с ипсапироном [^3H]PAPP (LY 165—163) выявляет в гиппокампе, коре и полосатом теле мозга крысы один класс мест связывания с B_{max} соответственно 400, 160, 52 фмоль/мг белка [4]. Величина K_d во всех отделах соответствовала 1,6 нМ. В мозжке мест связывания [^3H]PAPP не выявлено, PAPP и такие его аналоги, как п-азидо-PAPP (PAPP с замещением нитрофенила на азидофенил, являющийся фотоаффинной меткой 5-HT_{1A} -рецепторов), и 1-(2-метоксифенил)пиперазин (2-MPP) проявляют 100-кратную селективность к 5-HT_{1A} -рецепторам по сравнению с другим подтипом— 5-HT_{1B} -рецепторами [17]. В микромолевых концентрациях PAPP и 2-MPP взаимодействуют с 5-HT_2 и дофаминовыми D_2 -рецепторами.

Другой представитель этого класса соединений—буспирон также обладает достаточно высокой аффинностью и селективностью к 5-HT_{1A} -рецепторам. Вместе с тем, как видно из табл. 3, он способен взаимодействовать также с дофаминовыми D_2 -рецепторами, 5-HT_2 -рецепторами и α -1-адренорецепторами в концентрации порядка $100\text{—}1000$ нМ [9, 16, 18—20]. Сходный с буспироном по фармакологической активности структурный аналог гепирон (Mj 138—05) не проявляет сродства к дофаминовым D_2 -рецепторам и обладает значительно меньшим сродством к 5-HT_2 -рецепторам.

Высокую аффинность к 5-HT_{1A} -рецепторам проявляют такие антагонисты α -адренорецепторов, как WB-4101 (табл. 3), йохимбин, коринантин, урапидил [21—23]. Аффинность йохимбина и коринантина к 5-HT_{1A} -рецепторам (IC_{50} для специфического связывания [^3H]DPAT) составляет 120 и 280 нМ, тогда как к α -1-адренорецепторам соответственно 410 и 330 нМ [22]. В условиях полной блокады α -1-адренорецепторов (900 нМ празозина) [^3H] WB-4101 выявляет в ко-

ре мозга крысы [21] и человека [22] места неспецифического связывания с K_d соответственно 3,8 и 3,1 нМ, по фармакологическим критериям идентичные 5-HT_{1A}-рецепторам. Таким образом, многие эффекты йохимбина, коринантина и WB-4101 могут быть опосредованы через 5-HT_{1A}-рецепторы, а не α -1-адренорецепторы. Высокую аффинность к 5-HT_{1A}-рецепторам (IC_{50} =3,9 нМ) проявляет спирохсатрин—соединение, близкое по структуре к WB-4101.

Таблица 4

Аффинность серотонинергических лигандов к 5-HT₁-рецепторам (IC_{50} , нМ)

Лиганд	К о р а				Г и п п о к а м п		
	радиолиганд						
	DPAT [53]	DPAT [53]	DPAT [93]	DPAT [3]	DPAT [8]	Ипса- пирон [8]	[³ H]PAPP [14]
5-карбоксаминотриптамин		0,2	1,2	1,1			6
DPAT	1,7	1,9	2,5	2,0	1,7	0,4	5
5-HT	2,9	3,1	5,2	5,1	2,7	4,3	5
5-метокси-диметил-триптамин					4,9		
Rh 24 969	5,1	7,2	10,7	8,1	5,1		
Ипсапирон					10,0	2,2	8
Бусипирон					24,0	14,0	23
(-)-21-009	7,4	11,2	11,2	12,3			
Йодоциано-пинидолол	4,1	7,4					
Метергин		5,5	6,2	4,4			
Метерголин	7,7	7,9	13,5	6,8		70,0	20
(-)-Пинидолол	19,0	23,4					
Индоренат		15,8				6,9	
Метителлин	72,4	79,4	151	85			
(-)-Пропаиолол	115	215					
Спироперидол	66	83	407	295	210	23	38
TFMPP	33				200		
Мнасерин				190			
Мезулергин	275	588	400	323			
Пирепирион	1900	1200	1500	1800			
Кетансерин	1900	1400	3300	3800		1200	1600
Квинлазин	3300	3100			4500		

В табл. 4 приведены данные об аффинности ряда соединений к 5-HT_{1A}-рецепторам. Сродство к этим рецепторам психотропных агентов подробно рассмотрено в ряде работ [24—26]. Обращает на себя внимание высокое сродство к 5-HT_{1A}-рецепторам ряда α -1-адренергических (см. выше) и β -адренергических агентов (пинидолол, пропранолол, йодоцианопинидолол). Высокую аффинность проявляет также спироперидол, считавшийся селективным по отношению к D₂-дофаминовым и 5-HT₂-рецепторам. Характерно, что во всех случаях спироперидол является антагонистом [27]. В наномолевых концентрациях взаимодействует с 5-HT_{1A}-рецепторами лизурин, считавшийся антагонистом для дофаминовых и адренорецепторов [28]. Высокоселективным антагонистом 5-HT_{1A}-рецепторов является, вероятно, соединение ВМУ 7378, близкое по структуре к бусипирону [29]. Как можно видеть из данных, представленных в табл. 4, IC_{50} спироперидола для специфического связывания [³H]PAPP, [³H]ипсапирона в гип-

покампе значительно ниже, чем для $[^3H]DPAT$. Одним из возможных объяснений этих результатов является предположение о гетерогенности $5-HT_{1A}$ -рецепторов. При этом в гиппокампе быка $DPAT$ является все $5-HT_{1A}$ -рецепторы, а ипсапирон только субпопуляцию, высокоаффинную к спироперидолу.

Физиологические эффекты. Ионофоретическая аппликация $5-HT$ способна ингибировать импульсную активность нейронов гиппокампа [30] и ядер шва [11, 31]. Хотя при исследованиях на срезах гиппокампа показано, что $5-HT$ способен как увеличивать, так и уменьшать амплитуду популяционного спайка, только ингибирующий эффект опосредован через $5-HT_{1A}$ -рецепторы [24]. Методом внутриклеточных отведений установлено, что $5-HT$ и его агонисты — ЛСД, 5-метокси-N,N-диметилтриптамин и лизурgid вызывают гиперполяризацию $5-HT$ нейронов ядер шва [31, 32], и латеральных ядер перегородки [33], связанную с увеличением K_d проводимости.

Селективные к $5-HT_{1A}$ -рецепторам лиганды, $DPAT$ [35], ипсапирон [11, 36, 37], буспирон [31, 38, 39] и гепирон [31] дозозависимым образом ингибируют активность $5-HT$ нейронов ядер шва крысы. Таким образом, рассматриваемые соединения ведут себя как агонисты $5-HT$. Тот факт, что пропранолол способен блокировать влияние $DPAT$ и ипсапирона на активность $5-HT$ нейронов ядер шва [37] подтверждает это заключение. Вместе с тем, основные метаболиты буспирона 1,2-пиримидинил-пиперазин и 5-гидрокси-буспирон не оказывают ингибирующего действия [39]. Предполагают, что в ядрах шва $5-HT_{1A}$ -рецепторы, опосредующие ингибиторный эффект локализованы на $5-HT$ нейронах, то есть являются ауторецепторами [40].

На срезах гиппокампа крысы $DPAT$, ипсапирон и буспирон дозозависимым образом вызывают снижение амплитуды популяционного спайка [36, 41], то есть ведут себя как агонисты $5-HT$. Ипсапирон способен также снижать частоту разрядов нейронов гиппокампа [42]. Вместе с тем, ряд данных указывает на то, что в гиппокампе $DPAT$, ипсапирон и буспирон не являются полными (или чистыми) агонистами $5-HT_{1A}$ -рецепторов. Так, при регистрации на срезах гиппокампа методом внутриклеточных отведений $DPAT$ вызывает значительно меньшее увеличение мембранной проводимости, чем $5-HT$ [43]. $DPAT$ (0.1 мкМ) ингибирует увеличение мембранной проводимости и гиперполяризацию нейронов под действием $5-HT$ (30 мкМ). Учитывая, что данный эффект наблюдается при достаточно низкой концентрации $DPAT$, авторы предполагают, что он является скорее антагонистом, чем агонистом $5-HT_{1A}$ -рецепторов [43]. Сходные результаты получены при внутриклеточном отведении на срезах гиппокампа в случае буспирона и гепирона [40]. Буспирон вызывает значительно более слабый гиперполяризующий эффект, чем $5-HT$, и при совместном введении ингибирует гиперполяризующий эффект $5-HT$.

По-видимому, наиболее сильно отличается от $5-HT$ по величине собственной активности в гиппокампе крысы ипсапирон, который способен ингибировать даже гиперполяризующее действие $DPAT$ [44, 45]. Так, при аппликации с низкой скоростью ипсапирон блокирует подавление нейрональной активности, вызванной $DPAT$. При аппликации с более высокой скоростью он способен сам вызывать подавление нейрональной активности, однако в значительно меньшей степени, чем $DPAT$. Таким образом, в отличие от ядер шва, в гиппокампе крысы $DPAT$, буспирон и ипсапирон являются, по-видимому, не полными, а частичными агонистами $5-HT_{1A}$ -рецепторов, причем наименее активным является ипсапирон [31].

При изучении влияния 5-HT_{1A}-селективных агентов на обмен 5-HT показано, что системное введение DPAT снижает скорость обмена 5-HT [46] и содержание 5-гидроксииндолуксусной кислоты [18] в мозгу. DPAT уменьшает скорость освобождения 5-HT в коре [47, 48], в ядрах шва [47, 49], перегородке, среднем мозгу, гипоталамусе [47], супрахиазмальном ядре [44], но не влияет на скорость освобождения 5-HT в гиппокамне [47]—отделе с наибольшей концентрацией 5-HT_{1A}-рецепторов. Интересно отметить, что инсанпирон подавляет указанный эффект DPAT в супрахиазмальном ядре, что подтверждает рассмотренные выше данные о его минимальной собственной активности [44]. α -2-Антагонист—идазоксан ингибирует влияние DPAT на обмен 5-HT в супрахиазмальном ядре, в то время как 5-HT₂-антагонист—ритансерин не активен. 5-HT_{1A}-селективный агент, буспирон, в отличие от DPAT, дозозависимым образом снижает скорость обмена 5-HT в гиппокамне [50]. Предполагают, что влияние DPAT и буспирона на обмен 5-HT может быть связано с ингибированием активности 5-HT-нейронов ядер шва. Эффективным блокаторм обмена 5-HT в мозгу является также индолол, антагонист 5-HT₁-рецепторов и β -адренорецепторов [51—53]. По данным ингибиторного анализа, его эффект опосредован через 5-HT_{1A}-рецепторы.

Эффекторный механизм. Специфическое связывание селективных, к 5-HT_{1A}-рецепторам [³H]DPAT и [³H]RAPP с мембранами гиппокампа крысы снижается в присутствии GTP. GTP также понижает аффинность буспирона, инсанпирона, RU 24 969, 5-метокситриптамина и N,N-диметилтриптамина к местам специфического связывания [³H]DPAT в коре мозга крысы [54]. На основании этих наблюдений можно заключить, что 5-HT_{1A}-рецепторы сопряжены с GTP-связывающим белком (G-белком). Наиболее вероятным эффекторным механизмом, которым 5-HT_{1A}-рецепторы управляют при участии G-белка является система аденилатциклазы.

5-HT способен влиять на синтез cAMP в мозгу, действуя через различные типы 5-HT рецепторов, как предполагают, на различные классы аденилатциклазы [7, 55—58]. Так, по данным Shenker и соавт. [58], 5-HT способен активировать аденилатциклазу гиппокампа морской свинки через два типа рецепторов: высокоаффинный (EC₅₀=43 нМ) и низкоаффинный (EC₅₀=410 нМ). При этом агонистами для высокоаффинного типа рецепторов являются 5-карбоксамидотриптамин (EC₅₀=6 нМ), DPAT (EC₅₀=29 нМ), 5-HT, буфотенин, буспирон (EC₅₀=130 нМ) и генирон. По данным других авторов, два последних агента ведут себя как частичные агонисты [59]. Спироперидол является антагонистом высокоаффинных 5-HT-рецепторов, кетансерин и соединение MLD7222 не активны. Рассмотренные данные позволяют заключить, что высокоаффинные 5-HT-рецепторы, стимулирующие аденилатциклазу в гиппокамне морской свинки, являются 5-HT_{1A}-рецепторами [58].

В то же время на аденилатциклазу, сопряженную с низкоаффинными 5-HT-рецепторами DPAT и буспирон не влияют. В гиппокампе крысы DPAT и RAPP также стимулируют активность аденилатциклазы с EC₅₀ порядка 30 нМ, при этом EC₅₀ для 5-HT составляет 100 нМ [58, 60]. Вместе с тем, величина максимальной стимуляции для DPAT и RAPP была в два раза меньше, чем для 5-HT, то есть оба агента вли на себя как частичные агонисты. Тот факт, что DPAT, RAPP, буспирон и генирон являются частичными агонистами 5-HT по влиянию на активность аденилатциклазы, может быть связан с тем, что они влияют только на одну из нескольких 5-HT-чувствительных аденилатциклаз в гиппокамне, а именно, на сопряженную с 5-

НТ_{1A}-рецепторами. Вместе с тем, приведенные результаты согласуются с предположением о том, что перечисленные агенты являются частичными агонистами 5-НТ_{1A} рецепторов, что следует также из рассмотренных выше данных по их электрофизиологической активности.

Наряду со стимулирующим действием на активность аденилатциклазы, для 5-НТ_{1A}-рецепторов продемонстрирован также ингибирующий эффект на индуцированную активность этого фермента. Так, 5-НТ, Ru-24.969 (селективный к 5-НТ₁-рецепторам), DPAT (селективный к 5-НТ_{1A}-рецепторам) ингибируют накопление сАМР, индуцированное вазоактивным кишечным пептидом (VIP) в нейрональных культурах полосатого тела и коры мозга мыши [61]. Аналогичным образом, 5-НТ, 5-карбоксамиidotринтамин, DPAT, буспиرون и нисапиرون в наномолевых концентрациях ингибируют форсколиномодулирующую аденилатциклазу в гиппокампе морской свинки [29, 62, 63]. При этом эффект 5-НТ, 5-карбоксамиidotринтамина и DPAT дозозависимым образом блокировали селективный антагонист 5-НТ_{1A}-рецепторов, ВМУ-7378, а также спироперидол. Для восьми исследованных соединений IC₅₀ стимулированной форсколином аденилатциклазы хорошо коррелирует с их сродством к 5-НТ_{1A}-рецепторам [29]. В гиппокампе крысы 5-НТ, DPAT и буспиرون ингибируют активность стимулированной форсколином аденилатциклазы, причем максимальный эффект DPAT и буспирона равен 70% и 50% от максимального эффекта 5-НТ. Таким образом, и в данном случае DPAT и буспирон ведут себя как частичные агонисты.

Необходимо отметить, что такие агенты, как 5-метоксиксиптамин, Ru-24 969 и метерголин оказывают выраженный ингибирующий эффект на активность индуцированной аденилатциклазы в гиппокампе морской свинки, но лишены активности в гиппокампе крысы [63]. Эти наблюдения еще раз подчеркивают межвидовые различия в свойствах 5-НТ₁-рецепторов.

Гетерогенность. Рассмотренные в предыдущих разделах данные позволяют предположить, что 5-НТ_{1A}-рецепторы не являются гомогенной популяцией рецепторов, а включают два или более подкласса. В пользу существования функциональной, а возможно и структурной гетерогенности, свидетельствуют следующие данные. Влияние на активность аденилатциклазы: одна группа рецепторов опосредует стимулирующий, другая—ингибирующий эффект. Фармакологические критерии: а) DPAT, буспирон, нисапирон являются частичными агонистами для одной группы рецепторов и полными—для другой (на 5-НТ нейронах в ядрах шва); б) метерголин, 5-метоксиксиптамин, Ru-24 969 являются для 5-НТ_{1A}-рецепторов гиппокампа морской свинки агонистами, а для 5-НТ₁-рецепторов гиппокампа крысы не проявляют активности; в) одна группа рецепторов обладает высокой аффинностью к спироперидолу (IC₅₀=20 нМ), другая—низкой (IC₅₀=200 нМ).

По-видимому, не все рассмотренные данные отражают реальные признаки подклассов 5-НТ_{1A}-рецепторов, однако в целом они достаточно убедительно свидетельствуют в пользу существования таковых. Отметим, что перечисленные различия могут быть связаны с присутствием модулирующего агента, посттрансляционной модификацией молекулы рецептора, с сопряжением рецептора с различными типами G-белков и т. д.

5-НТ_{1B}-рецепторы

5-НТ_{1B}-рецепторы выявлены в мозгу грызунов и не обнаружены в коре мозга человека, обезьяны, свиньи, а также в гиппокампе

132

свиньи [11]. Предполагают, что в мозгу человека, обезьяны, свиньи данный подтип рецепторов отсутствует. В табл. 1 представлены данные по региональному распределению 5-HT_{1B}-рецепторов в мозгу крысы [64]. Наибольшие концентрации отмечены в бледном шаре, хвостатом ядре, миндалине, гипоталамусе, черном веществе, ядрах мозжечка, то есть в районах с высокой концентрацией 5-HT и 5-оксиналиндуксусной кислоты.

Фармакологические свойства. Предположение о существовании подтипов 5-HT₁-рецепторов возникло в связи с обнаружением среди 5-HT_{1B}-рецепторов субпопуляций, обладающих как высокой (5-HT_{1A}-рецепторы), так и низкой (5-HT_{1B}-рецепторы) чувствительностью к спироперидолу [65]. Как можно видеть, сравнивая данные, представленные в табл. 4 и 5, аффинность 5-HT_{1A} и 5-HT_{1B}-рецепторов к этому агенту, а также к индоренату различается более чем в 100 раз. Агонист 5-HT-рецепторов квиназин проявляет обратный профиль активности, в 10 раз большее сродство к подтипу 1B. Важной особенностью фармакологического профиля 5-HT_{1B}-рецепторов является высокое сродство и стереоспецифичность к некоторым антагонистам β-адренорецепторов; (—) пропранололу, (—) пиндололу, соединению (—) 21.009, йодинанопиндололу (ICYP). Вместе с тем, 5-HT_{1A}-рецепторы также обладают аффинностью к перечисленным агентам, хотя и несколько меньшей (табл. 4). Например, ICYP дискриминирует «1A» и «1B» подтипы с селективностью в 10—20 раз, что позволяет использовать его для радиолигандного анализа 5-HT_{1B}-рецепторов. При этом для предотвращения связывания ICYP с β-адренорецепторами, к которым он имеет очень высокое сродство ($K_d = 0,01$ нМ), используют изапрепалин (30 мкМ). В этих условиях [¹²⁵I] ICYP выявляет в полосатом теле, коре и гиппокампе крысы один класс мест связывания с $K_d = 0,2$ нМ и $B_{max} = 270, 180$ и 140 фмоль/мг белка соответственно [66, 67].

Избирательность к 5-HT_{1B}-рецепторам проявляют такие производные фенил-пиперазина, как 1-(м-трифторметилфенил) пиперазин (TFMPP) и 1-(м-хлорфенил) пиперазин (mCPP), для которых аффинность к «1A» и «1B» подтипам различается в 4—5 раз, а также соединение 7-трифторметил-4-(4-метил-1-пиперазинил)-пирроло(1,2-а)квиноксалин малеат (CGS 12066B), для которого различия в аффинности достигают 10—20 раз [16, 68, 69]. Необходимо отметить, что TFMPP и mCPP обладают также достаточно высокой аффинностью к 5-HT₂-рецепторам и α-2-адренорецепторам. Оба соединения являются метаболитами ряда психотропных агентов, в частности, mCPP — один из основных метаболитов антидепрессанта trazodona.

Агонист 5-HT-рецепторов Ru-24.969 обладает равным сродством к 5-HT_{1A} и 5-HT_{1B}-рецепторам. Для фармакологической идентификации 5-HT_{1B}-рецепторов многие авторы используют такой критерий, как чувствительность к Ru-24.969. при отсутствии влияния DPAT, селективного к 5-HT_{1A}-рецепторам [64, 69—74]. При радиолигандном анализе места связывания, соответствующие 5-HT_{1B}-рецепторам, идентифицируют при помощи [³H]5-HT в присутствии 10—100 нМ DPAT [64].

Физиологические эффекты. Тот факт, что региональное распределение 5-HT_{1B}-рецепторов в мозгу крысы хорошо коррелирует с распределением 5-оксиналиндуксусной кислоты и 5-HT, свидетельствует об их возможной связи с 5-HT-синапсами. Действительно, ауторецепторы, локализованные на 5-HT-синапсах и регулирующие выброс серотонина, проявляют ряд признаков, характерных для 5-HT_{1B}-рецепторов. Среди таких признаков можно отметить хорошую

корреляцию между аффинностью ряда соединений к 5-HT_{1B}-рецепторам и их действием на выброс синаптическими серотонином [16, 72].

В ряде отделов мозга крысы природа 5-HT-рецепторов, регулирующих выброс синаптическими 5-HT, была исследована методами ингибиторного анализа. Так, на срезах фронтальной коры мозга показано, что Ru-24.969 ингибирует индуцированный K⁺ выброс [³H] 5-HT с эффективностью, сходной с 5-HT [71, 73]. Максимальный эффект достигается при концентрациях порядка 1 мкМ. Блокаторами действия 5-HT и Ru-24.969 являются метипетенин, метерголин, пропранолол и кветипин. Отметим, что последнее соединение считают агонистом 5-HT. Ритансерин, селективный антагонист 5-HT₂-рецепторов, не влиял на данный эффект. На синапсах, выделенных из мозжечка, где 5-HT_{1A} и 5-HT₂-рецепторы, по-видимому, отсутствуют [4], Ru-24.969 был эквивалентен с 5-HT по ингибированию индуцированного K⁺ выброса [³H] 5-HT [70, 74]. Метипетенин и пропранолол подавляли этот эффект. В то же время DPAT, спироперидол, цитансерин и кетансерин были не активны. На синапсах гиппокампа 5-HT, TFMPP, Ru-24.969 и CGS-12066B являются ингибиторами индуцированного K⁺ выброса [³H] 5-HT [16, 75]. Метипетенин и пропранолол блокируют данный эффект. Вместе с тем, DPAT в концентрациях до 3 мкМ не влияет на индуцированный выброс и не блокирует эффект агониста. Спироперидол, метисергид и кетансерин также были неактивны. На срезах гиппокампа кролика 5-HT также является ингибитором индуцированного K⁺ выброса [³H] 5-HT [76]. Метипетенин блокирует этот эффект. Рассмотренные данные свидетельствуют о том, что 5-HT_{1B}-рецепторы являются пресинаптическими ауторецепторами в мозгу крысы и, возможно, кролика. В то же время 5-HT_{1B}-рецепторы могут быть и пресинаптическими гетерорецепторами. Так, на препаратах синапсом гиппокампа крысы 5-HT и Ru-24.969 ингибируют индуцированный выброс AX, в то время как DPAT не оказывает такого действия [77]. Метипетенин и пропранолол подавляют указанный эффект, тогда как спироперидол, метисергид и кетансерин не активны.

Таким образом, по отношению к эффектам 5-HT, опосредованным 5-HT_{1B}-рецепторами и приводящим в рассмотренных выше случаях к подавлению выброса медиатора, такие соединения как Ru-24.969, TFMPP и CGS-12066B являются агонистами, а метипетенин, метерголин, пропранолол и цитанопиндол—антагонистами.

Полученные в настоящее время данные свидетельствуют о том, что 5-HT_{1B}-рецепторы негативно сопряжены с аденилатциклазой [65].

5-HT_{1C}-рецепторы

Изучение параметров связывания 5-HT лигандов в сосудистом сплетении желудочков мозга показало, что в этой ткани присутствует только один особый подтип 5-HT-рецепторов, проявляющий высокую аффинность к 5-HT и названный 5-HT_{1C}-рецепторами [76, 78, 79]. У всех исследованных видов животных, а также у человека максимальное содержание 5-HT_{1C}-рецепторов в мозгу обнаружено именно в сосудистых сплетениях желудочков. В других отделах их содержание в 10—100 раз меньше [64, 80]. Можно отметить значительное сходство в региональном распределении в мозгу 5-HT_{1C}-рецепторов с одной стороны, и бензодиазепиновых рецепторов периферического типа с другой [80, 81]. В обоих случаях наибольшие концентрации выявлены в сосудистых сплетениях и следовые—в других отделах

Таблица 5

Аффинность серотонинергических лигандов к 5-HT_{1B}-рецепторам (IC₅₀, нМ)

Лиганд	Радиолиганд		
	1-1111* [53]	5-HT [16] IC ₅₀ (нМ)	5-HT [8]
Йодоцанопинидол	0.39		
(-)-21-009	0.41		
Rh 24.969	3.80		
5-карбоксамидотриптамин	5.1		160
TFMPP		9.0	960
5-HT	25.0	5.7	7.5
(-)-21-009	46.0		
(-) Пропранолол	47.0		
Метитенин	50.0		
CGS 12066B		51.0	
(-) Пиндол	78.0		
Метергин	250		
Квинэлин	316		7100
Кетансерин	1900	10000	
Индоренат	3600		
Спароперидол	4800		18000
Пиренипрол	6600		
Нисалирон		8000	17000
DRAT	63000	3000	31000
Мезулергин	13000		

Примечание. *—йодоцанопинидол.

Таблица 6

Аффинность серотонинергических лигандов к 5-HT₁-рецепторам (IC₅₀, нМ)

Лиганд	Сосудистое сплетение		желудочков мозга		кора	
	свинья		человек		крыса	
	радиолиганд					
	МЭЗ [53]	1-111C1** [57] [94]	5-НТ [78]	МЭЗ [80]	1-111C1 [78]	МЭЗ [53]
Метерголин	0,5	0,01		0,7		1,0
Мезулергин	1,6	9,5	4,0	4,2		2,1
Мизансерин	10,0	9,1	12,6	6,5	1,9	7,9
Метитенин	27,5	5,5	3,1	1,3		1,7
Метергин	46,8		43,7			
5-НТ	33,1	81,0	19,6	166	30,0	15,8
Пиринипрол	60	59	12,6	52		15,1
Кетансерин	98	98	158	186	25,0	76,0
Квинэлин	186	575				23,0
Rh 24.969	400	407	158	540		910
Спароперидол	1150	705	20000	8300		1700
(—) Пропранолол	324	1580			741	1400
Фентоламин	895	1230			1240	1120
5-Карбоксамин-дегидро- тамин	616	3600		4200		17800
(—)21—009	5200	2000	20000	52000		11000
DRAT	7200	7600	5100	40000	7700	13000
Йодоцанопинидол	20000					45000
(—) Пиндол	54000	8300				

Примечание. *—мезулергин, **—йодо1111СД.

мозга. Учитывая, что на нейронах периферические бензодиазепиновые рецепторы не выявлены [81, 82], представляется вероятным, что 5-HT_{1C}-рецепторы также локализованы исключительно на ненейрональных элементах мозга. Этот вывод подтверждается данными о том, что в сосудистых сплетениях 5-HT_{1C}-рецепторы присутствуют только на мембранах эпителиальных клеток [78].

Радиолигандный анализ. Высокоаффинный лиганд 5-HT_{1C}-рецепторов [³H]мезулергин выявляет в сосудистом сплетении желудочков мозга человека и свиньи один класс мест связывания с K_d 1,7 нМ и B_{max} = 870 и 530 фмоль/мг белка соответственно [88]. При этом в коре мозга человека K_d для [³H]мезулергина также равнялась 1,7 нМ, тогда как B_{max} не превышала 9 фмоль/мг белка, то есть была почти в 100 раз меньше, чем в сосудистом сплетении. При помощи другого лиганда [¹²⁵I] ЛСД в сосудистом сплетении желудочков мозга свиньи также выявлен один класс мест связывания с B_{max} = 360 фмоль/мг ткани и K_d = 0,55 нМ [83]. Места связывания [³H]мезулергина, [¹²⁵I] ЛСД, а также [³H]5-НТ в сосудистых сплетениях мозга человека, свиньи, крысы характеризуются сходным фармакологическим профилем (табл. 6). При этом по фармакологической специфичности 5-HT_{1C}-рецепторы значительно отличаются от других подтипов 5-HT₁-рецепторов (табл. 4, 5, 6). Они обладают значительно более низким сродством к таким агентам как 5-карбоксамидотриптамин, Ru-24.969, (—) 21—009, пиндололу, йодошпанопиндололу. Вместе с тем, 5-HT_{1C}-рецепторы проявляют высокую аффинность к ряду антагонистов 5-HT-рецепторов: мезулергину, мнансерину, метерголину. В целом, по фармакологическому профилю 5-HT_{1C}-рецепторы довольно близки к 5-HT₂-рецепторам (что хорошо согласуется со сходством в их эффекторных механизмах), однако отличаются от последних по аффинности к 5-НТ, спироперидолу, кетансерину и некоторым другим лигандам.

Эффекторный механизм. Действие агониста на 5-HT_{1C}-рецепторы эпителиальных клеток сосудистых сплетений приводит к подавлению секреции спинномозговой жидкости [84].

Для изучения внутриклеточного ответа на активацию 5-HT_{1C}-рецепторов их экспрессию вызывали в ооцитах *Xenopus laevis* путем инъекции плазмА мРНК (5—6 кБ), кодирующей полипептид рецептора, которая была выделена из полиомы сосудистых сплетений желудочков мозга мыши [85]. На мембранах таких ооцитов появляются функционально активные 5-HT_{1C}-рецепторы, способные вызывать изменения мембранного потенциала при действии 5-НТ. Вместе с тем, другие типы 5-НТ-рецепторов на ооцитах отсутствуют. С использованием данной модели показано, что внутриклеточные эффекты 5-HT_{1C}-рецепторов опосредованы взаимодействием с G-белком и выражаются в стимуляции фосфолипазы C, активации обмена фосфатидилинозитолов и Ca²⁺-зависимого Cl-канала [85]. На переживающей ткани сосудистых сплетений 5-НТ также вызывает активацию обмена фосфатидилинозитолов, при этом концентрация полумаксимальной стимуляции составляет 50 нМ [86, 87]. Мнансерин, кетансерин и спироперидол ингибируют этот эффект с IC₅₀ = 12, 130 и 6200 нМ, что хорошо совпадает с аффинностью к 5-HT_{1C}-рецепторам. Необходимо отметить, что в коре мозга, где активацию обмена фосфатидилинозитолов вызывают 5-HT₂-рецепторы, концентрация полу-

максимальной стимуляции для 5-HT в 100 раз больше, чем в сосудистом сплетении.

Интересно отметить, что внутрижелудочковое введение крысе 5, 7-дигидрокситриптамина, вызывающее дегенерацию 5-HT-нейронов ядер шва, приводит к значительному увеличению эффекта 5-HT в сосудистом сплетении желудочков [88]. Предполагают, что это связано с индукцией или возрастанием чувствительности 5-HT_{1C}-рецепторов энтеринальных клеток сплетений в ответ на хронический дефицит медиатора. Данные наблюдения свидетельствуют о том, что 5-HT₁-рецепторы находятся под непрерывным (тоническим) контролем серотонинергической системы мозга. Другими словами, постоянная активность 5-HT-нейронов подавляет избыточную продукцию спинномозговой жидкости [84].

5-HT_{1D}-рецепторы

В ряде работ показано, что в мозгу приматов [³H]5-HT способен связываться не только с 5-HT_{1A} и 5-HT_{1C}, но как минимум еще с одним подтипом 5-HT₁-рецепторов [89, 90]. Так как 5-HT_{1B}-рецепторы в мозгу приматов не выявлены, этот подтип назван 5-HT_{1D}-рецептором. Распределение 5-HT_{1D}-рецепторов в мозгу человека, быка, свиньи аналогично распределению 5-HT_{1B}-рецепторов в мозгу крысы [91]. Учитывая данные о сходном эффекторном механизме обоих подтипов рецепторов, считают, что 5-HT_{1D}-рецепторы в мозгу приматов являются аналогом 5-HT_{1B}-рецепторов мозга грызунов [65, 91].

Места связывания, соответствующие 5-HT-рецепторам, могут быть выявлены в мозгу человека и быка при помощи [³H]5-HT в присутствии 100 нМ DPAT (подавляющего связывание с 5-HT_{1A}-рецепторами) и 100 нМ мезулергина (подавляющего связывание с 5-HT_{1A}-рецепторами). В данных условиях E_{max} для [³H]5-HT в коре и хвостатом ядре мозга человека составляет 110 и 240 фмоль/мг белка и $K_D = 3-5$ нМ [91]. 5-HT_{1D}-рецепторы проявляют высокое сродство к таким агонистам, как 5-карбоксамидотриптамин, 5-метокситриптамин, 5-HT, триптамин (расположены в порядке убывания сродства). Вместе с тем, они обладают крайне низкой аффинностью к DPAT, буспиرونу, пропранололу, пиндололу.

При изучении эффекторного механизма 5-HT_{1D}-рецепторов получены данные об их ингибирующем влиянии на активность аденилатциклазы [65]. Действительно, в черном веществе мозга теленка 5-HT ингибирует форсколиноактивированную аденилатциклазу, тогда как DPAT лишен такого действия. Данный эффект резистентен к шаниопиндололу, спиронололу, мiansерину. Вместе с тем, метитепин является антагонистом, на основании чего авторы заключают, что действие 5-HT опосредовано 5-HT_{1D}-рецепторами.

BRAIN SEROTONIN RECEPTORS: RADIOLIGAND ANALYSIS AND FUNCTIONAL HETEROGENEITY

KORNEYEV A. YA.

Institute of Pharmacology, USSR Academy of Medical Sciences, Moscow

This is a short review on localization and peculiarities of brain serotonergic neurons. Properties of brain serotonin receptors are considered from the following viewpoints: methodology of radioligand analysis of serotonin receptors and their classification; radioligand analysis, pharmacology and effector mechanism of 5-HT₂ receptors; radioligand analysis, pharmacology and effector mechanism of 5-HT₃ receptors.

1. Kohler C., Ritscher A. G., Lang W., Chan-Palay V. *Neurosci. Lett.*, v. 72, p. 43-48, 1985.
2. Ram J. L., Kreiman M. A., Gole D. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 139, p. 247-250, 1987.
3. Chyzer D., Pizops A., Probst A., Palacios J. M. *Brain Res.*, v. 376, p. 85-96, 1986.
4. Shih J. C., Asarch K. B., Rauson R. *Psychopharmacol. Bull.*, v. 22, p. 818-824, 1986.
5. Cossery J. M., Cozlan H., Spampinato U., Perdicakis C., Guillaumont G., Pichat L., Hamon M. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 140, p. 143-155, 1987.
6. Mir A. K., Hilbert M., Tricklebank M. D., Middlemiss D. N., Kidd E. J., Fozard J. R., *Eur. J. Pharmacol.*, v. 149, p. 107-121, 1988.
7. Peroutka S. J. *Neuropharmacol.*, v. 23, p. 1487-1492, 1984.
8. Peroutka S. J. *Brain Res.*, v. 344, p. 167-171, 1985.
9. Peroutka S. J. *Biol. Psychiatr.*, v. 20, p. 971-979, 1985.
10. Peroutka S. J., Heurting R. E., Mank M. D., Kocsis J. D. *Psychopharmacol. Bull.*, v. 22, p. 813-817, 1986.
11. Sprouse J. S., Aghajanian G. K. *Soc. Neurosci. Abstr.*, v. 11, p. 47, 1985.
12. Schoemaker H., Langer S. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 124, p. 371-373, 1986.
13. Crist J., Surprenant A. *Brit. J. Pharmacol.*, v. 92, p. 341-348, 1987.
14. Dompert W. C., Glaser T., Traher J., Naunyn-Schmiedeberg's *Arch. Pharm.*, v. 328, p. 467-470, 1985.
15. Glazer T., Traher J. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharm.*, v. 329, p. 211-215, 1985.
16. Neale R. F., Fallon S. L., Bayar W. C., Wastley W. F., Martin L. L., Stone G. A., Glaser B. S., Sinton C. M., Williams M. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 136, p. 1-9, 1987.
17. Glennon R. A. *Neurotransmission*, v. 2, № 1, 1986.
18. Hjorth R. S., Lindberg P., Sanchez D., Wikstrom H., Arvidsen L. E., Hackel G., Nilsson J. L. G. *J. Neural Trans.*, v. 55, p. 169-188, 1982.
19. Корнеев А. Я., Фактор М. И. *Ан Ч. Т. Б. Бюл. эксперим. биол. и мед.*, № 1, с. 41-43, 1988.
20. Riblett L. A., Taylor D. P., Eison M. S., Stauton H. C. *J. Clin. Psychiatry*, v. 43, p. 11-16, 1982.
21. Norman A. B. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 106, p. 461-462, 1985.
22. Peroutka S. J., Gonzales D. A., Shapito M. *Experimental Neurology*, v. 96, p. 344-351, 1987.
23. Wander T. J., Nelson A., Okazaki H., Richelson E. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 132, p. 115-121, 1986.
24. Brittain R. T., Butler A., Coates I. M., Fortune D. H. *Brit. J. Pharmacol.*, v. 90, p. 87P, 1987.
25. Hadjiconstantinou M., Neff N. H. *Neuropharmacol.*, v. 22, p. 939-943, 1983.
26. Wander T. J., Nelson A., Okazaki H., Richelson E. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 143, p. 279-282, 1987.
27. Lum J. T., Piercey M. F. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 149, p. 9-17, 1988.
28. Hoyer D. *Brit. J. Pharmacol.*, v. 90, p. 92P, 1987.
29. Yocca F. D., Hystop D. K., Smith D. W., Maayan S. *Europ. J. Pharmacol.*, v. 137, p. 293-294, 1987.
30. Szgal M. *Brain Res.*, v. 94, p. 115-131, 1975.
31. Wahder Maelen C. P., Taylor D. P., Gehlbach G., Eison M. S. *Psychopharmacol.*, v. 22, p. 807-812, 1986.
32. Aghajanian, G. K., Vander Maelen C. P. *Brain Res.*, v. 238, p. 463-469, 1982.
33. Joels M., Twery M. J., Shinnick-Gallager P., Gallager J. P. *Europ. J. Pharmacol.*, v. 129, p. 293-294, 1986.
34. Aghajanian G. K., Lakoski J. M. *Brain Res.*, v. 305, p. 181-185, 1984.
35. De Montigny C., Blier P., Chaput Y. *Neuropharmacol.*, v. 23, p. 1511-1519, 1984.
36. Roman M. J., Anwyl R. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 132, p. 93-96, 1987.

37. *Sprouse J. S., Aghajanian G. K.* *Europ. J. Pharmacol.*, v. 128, p. 295-298, 1986.
38. *Trulsen M. E., Trulsen T. J.* *Neurochirurgia*, v. 32, p. 1047, 1979.
39. *Vander Maelen C. P., Matheson G. K., Wildermau R. C., Paterson L. A.* *Eur. J. Pharmacol.*, v. 129, p. 123-130, 1986.
40. *Andrade R., Nicoll R. A.* *Soc. Neurosci. Abstr.*, v. 11, 181-185, 1984.
41. *Peroutka S. J., Muuk M. D., Koets J. D.* *Neuropharmacol.*, v. 26, p. 139-146, 1987.
42. *Busse-Tomusk A., Rohrer G. V.* *Eur. J. Pharmacol.*, v. 130, p. 141-143, 1986.
43. *Collno A., Hulliswell J. V.* *Eur. J. Pharmacol.*, v. 130, p. 151-152, 1986.
44. *Marsden R., Hoyer D.* *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharm.*, v. 333, p. 277-286, 1986.
45. *Morlin K. F., Mason R.* *Eur. J. Pharmacol.*, v. 141, p. 479-485, 1987.
46. *Hamon M., Bourcolin S., Gozlan H., Hull M. D., Goetz C., Artand F., Horn A. S.* *Eur. J. Pharmacol.*, v. 160, p. 263-276, 1984.
47. *Hutson P. H., Dourish C. T., Curson G.* *Eur. J. Pharmacol.*, v. 129, p. 347-352, 1986.
48. *Routledge C., Mardsen C. A.* *Soc. Trans.*, v. 13, p. 1058-1061, 1985.
49. *Kennel G. A., Markon M., Dourison C. T., Curson G.* *Eur. J. Pharmacol.*, v. 138, p. 53-60, 1987.
50. *Mennini T., Gobbi M., Ponzio F., Garattini S.* *Arch. Int. Pharmacodyn.*, v. 279, p. 40-49, 1986.
51. *Hjorth S., Carlsson A.* *Neuropharmacol.*, v. 24, p. 1143-1146, 1985.
52. *Hjorth S., Carlsson A.* *Eur. J. Pharmacol.*, v. 118, p. 1-12, 1985.
53. *Hoyer D., Engel G., Katkman H. O.* *Eur. J. Pharmacol.*, v. 118, p. 13-23, 1985.
54. *Schlegel J. R., Peroutka S. J.* *Biochem. Pharmacol.*, v. 35, p. 1943-1949, 1986.
55. *Barbaccia M. L., Brunello N., Chuang D., Costa E. J.* *Neurochem.*, v. 40, p. 1671-1679, 1983.
56. *Shannon M., Battaglia G., Glennon R. A., Titeler M.* *Eur. J. Pharmacol.*, v. 109, p. 427-429, 1985.
57. *Sienker A., Maayani S., Weinstein H., Green J. P.* *Mol. Pharmacol.*, v. 109, 427-429, 1985.
58. *Sienker A., Maayani S., Weinstein H., Green J. P.* *Mol. Pharmacol.*, v. 31, p. 357-367, 1987.
59. *Yocca F. D., Maayani S.* *The Pharmacologist*, v. 27, p. 195-199, 1985.
60. *Markstein R., Hoyer D.* *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharm.*, v. 333, p. 335-341, 1986.
61. *Weiss S., Sebben M., Kemp D. E., Bockaert J.* *Eur. J. Pharmacol.*, v. 143, p. 279-282, 1987.
62. *Bockaert J., Dumms A., Bonhelat R., Sebben M., Cory R. N.* *Naunyn-Schmiedeberg's Arch.*, v. 335, p. 588-592, 1987.
63. *De Voo M., Maayani S.* *The J. of Pharmacol. and Exper. Ther.*, v. 238, p. 248-253, 1986.
64. *Pazos A., Palacios J. M.* *Brain Res.*, v. 346, p. 205-230, 1985.
65. *Hoyer D., Schoeffer I.* *Eur. J. Pharmacol.*, v. 147, p. 145-149, 1988.
66. *Edwards E., Whitaker-Azmitia P. M.* *Neuropharmacol.*, v. 26, p. 93-96, 1987.
67. *Hoyer D., Ehgel G., Katkman H. O.* *Eur. J. Pharmacol.*, v. 118, p. 1-12, 1985.
68. *Fuller R. W.* *Psychopharmacol. Bull.*, v. 22, p. 825-828, 1986.
69. *Sills M. A., Wolf B. B., Frazer A. J.* *Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 321, p. 480-487, 1984.
70. *Bonanno C., Maura G., Raitary M.* *Eur. J. Pharmacol.*, v. 126, p. 317-321, 1986.
71. *Brazell M. P., Mardsen C. A., Nisbet A. P., Routledge C.* *Brit. J. Pharmacol.*, v. 86, p. 209-216, 1985.
72. *Engel G., Gothert M., Hoyer D. et al.* *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharm.*, v. 322, p. 1-7, 1986.
73. *Middlemiss D. N. J.* *Pharm. Pharmacol.*, v. 37, p. 434-437, 1985.

74. Raiteri M., Maura G., Bonanno G., Pittaluda A. J. *Pharmacol., Exper. Therap.* v. 237, p. 644—648, 1988.
75. Maura G., Roccatagliata E., Raiteri M. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharm.* v. 334, p. 323—326, 1986.
76. Verbeuren J. J., Coen E. P., Shoups A., Vander Velde R., Baeyens R., De Potter W. P. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, v. 327, p. 102—106, 1984.
77. Maura G., Raiteri M. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 129, p. 333—337, 1986.
78. Yagaloff K. A., Hartig P. R. *J. Neurosci.*, v. 5, p. 3178—3183, 1985.
79. Yagaloff K. A., Hartig P. R. *Mol. Pharmacol.*, v. 29, p. 120—125, 1986.
80. Hoyer D., Pazos A., Probst A., Palacios J. M. *Brain Res.*, v. 376, p. 97—107, 1986.
81. Richards J. G., Mohler G., Huefely W. *Trends Pharmacol. Sci.*, v. 3, p. 233—235, 1982.
82. Syapin P. J., Skolnik P. J. *Neurochem.*, v. 32, p. 1047, 1979.
83. Hoyer D., Srvats A. S., Pazos A., Probst A., Palacios J. M. *Neurosci. Lett.*, v. 69, p. 269—274, 1986.
84. Moeda K., Nihon Univ. *J. Med.*, v. 25, p. 155—174, 1983.
85. Lubbert H., Hoffman B. J., Snutch T. P., Van Dyke T., Levine A. J., Hartig P. R., Lester H. A., Davidson N. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci.*, v. 84, p. 4332—4336, 1987.
86. Conn P. J., Sanders-Bush E., Hoffman B. J., Hartig P. J. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci.*, v. 83, p. 4086—4088, 1986.
87. Sanders-Bush E., Conn P. J. *Psychopharm. Bull.*, v. 22, p. 829—836, 1986.
88. Conn P. J., Jankowsky A., Sanders-Bush E. *Brain Res.*, v. 400, p. 396—398, 1987.
89. Heruith R. E., Peroutka S. J. *J. Neurosci.*, v. 7, p. 894—903, 1987.
90. Waerber C., Dietl M. M., Hoyer D., Probst A., Palacios J. M. *Neurosci. Lett.*, v. 88, p. 11—17, 1988.
91. Hoyer D., Waerber C., Pazos A., Probst A., Palacios J. M. *Neurosci. Lett.*, v. 85, p. 357—363, 1988.
92. Leysen J. E. - In: *Neuropharmacology of Serotonin* (ed. A. R. Green), p. 79—116, Oxford University Press, Oxford, New York, 1985.
93. Gilbert M. J., Newberry N. P. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 144, p. 385—389, 1987.

Поступила 16.X.1989



Advances in Protein Phosphatases, Leuven University Press, v. 1—5 (eds. W Merlevede, J. Di Salvo).

Успехи в области фосфопротеинфосфатаз, т. 1—5.

В 1985 г. по инициативе и под редакцией проф. W. Merlevede (Католический Университет Лувена, Бельгия) и проф. J. Di Salvo (Университет Цинциннати, США) были опубликованы материалы I Международного симпозиума по фосфопротеинфосфатазе (ФПФазе). Однако нарастающее количество исследований по ферментам обмена фосфопротеинов (ФП) подсказало идею превращения этих сборников в продолжающееся издание. За 1985—1989 гг. было выпущено пять томов «Успехов в области фосфопротеинфосфатаз» (*Advances in Protein Phosphatases, Leuven University Press, v. 1—5*). В этом издании собран богатейший материал по структуре, функции и регуляции разнообразных ФПФаз и протеникиназ (ПКаз), вовлеченных в управление многими ключевыми процессами метаболизма, представленный практически всеми крупными исследователями в этой области.

В томе I собраны тексты пленарных докладов вышеуказанного симпозиума. Книга открывается историческим обзором W. Merlevede, в котором дается широкая панорама исследования ФП, начиная с работ 1906 г. Levene и Alsberg, обнаруживших высокое содержание фосфата в вителлине куриного яйца, и Cogli и Green (1943), описавших мышечный фермент, переводящий фосфорилазу α в фосфорилазу β (PR-энзим). После того, как обнаружилось, что фосфорилаза α является ФП, Wosilait и Sutherland (1956) переименовали PR-энзим в фосфатазу фосфорилазы. Далее анализируется значение открытия в 70-х годах белковых ингибиторов и естественных форм ФПФаз, свидетельствовавшего о возможностях внутриклеточной модификации активности ФПФаз и участии их в регуляции ряда ключевых реакций метаболизма. Накопленный фактический материал позволил Cohen (1981) и другим авторам предложить в первой половине 80-х годов свои системы классификации ФПФаз. Несмотря на различия в обозначении мультифункциональных ФПФаз, Merlevede предложил объединить их в 4 основных класса: АТР, Mg^{2+} -зависимая ФПФаз, кальцийнейрин, Mg^{2+} -зависимая ФПФаз и поликатионстимулируемая ФПФаз. Автор пришел к выводу, что при использовании очищенных ФПФаз при исследовании регуляции метаболизма, передачи гормонального или нервного сигнала, мышечного сокращения и пролиферации клеток в ближайшем будущем следует ожидать получение новой и интересной информации. Предполагается обнаружение новых фосфатаз и регуляторных механизмов.

В работе, представленной Е. Н. Fisher и соавт. (Университет шт. Вашингтон, США), приведены новые данные о структуре, свойствах и регуляции фосфатазы фосфоорилазы. Иммунохимические тесты для изучения свойств этого фермента описаны в статье D. L. Brautigan и соавт. Субъединичное строение и пути регуляции АТР, Mg^{2+} -зависимой ФПФазы рассматриваются в статьях американских исследователей Н.—С. Li и соавт., А. А. DePaoli-Roach, J. R. Vandenhede и W. Merlevede (Дувенский университет, Бельгия). Хотя большинство зисмологических исследований проведено на низкомолекулярной ФПФазе с M_r 31—35 кД, выделенной из тканей с помощью денатурирующих агентов, В. S. Khattri считал более перспективным изучение нативных высокомолекулярных ФПФаз для точной характеристики их свойств, субъединичного состава и путей регуляции, для чего были использованы ФПФазы, связанные с гликогеновыми гранулами. Имеются, однако, опасения в точности идентификации таких ФПФаз, из которых часть может оказаться продуктами ограниченного протеолиза холофермента (Е. Y. C. Lee и соавт., Университет Майами, США). Сравнительное исследование кальцийнейрина (Ca^{2+} -кальмодулинзависимой ФПФазы) из различных источников проведено С. В. Klee и др. (Национальный институт здоровья, Бетесд, США). Отмечено, что частичный протеолиз фермента не снижает его активности, однако делает его нечувствительным к Ca^{2+} и кальмодулину. Во всех тканях кальцийнейрин представлен гетеродимером, состоящим из двух тканеспецифичных субъединиц.

В ряде представленных в т. I и II статей отмечена роль Ca^{2+} и Mg^{2+} и переходных металлов в регуляции активности кальцийнейрина (С. J. Pallen и соавт., Р. F. Simonelli).

Особый интерес для читателей «Нейрохимии» представляют работы, посвященные особенностям ФПФаз и ПКаз мозга, их участию в нейроспецифичных процессах метаболизма. А. Battistella и соавт. обнаружили, что допаминергический препарат анорморфин ингибирует фосфорилирование белков сАМР- и Ca^{2+} -фосфатидилсеринзависимыми ПКазами мозга крысы. F. Bellini и соавт. сообщают о снижении активности ПКазы с в цитозоле мозга крыс при старении. Активность фермента восстанавливалась при регулярном внутривенном введении 15 мг/кг фосфатидилсерина. Из мозга крыс S. D. Yang и Y.—L. Fong изолировали латентную ФПФазу, активируемую АТР, Mg^{2+} и киназой F_{A_1} .

В III том включены обзорные работы наиболее признанных специалистов, занимающихся ФПФазами. Особый интерес для нейрохимиков представляют две статьи: S.—D. Yang, «ФПФазы мозга» и Е. Miyamoto и соавт. «Эндогенные субстраты для кальцийнейрина и его распределение в мозгу крыс». В первой из этих работ содержится информация о наличии в мозгу помимо кальцийнейрина еще трех ФПФаз: F_{A_1} /АТР, Mg^{2+} -зависимой фосфатазы $F_{C_1}M$ и латентных высокомолекулярных ФПФаз LP-1 и LP-2. Установлено, что активирующим фактором F_{A_1} ФПФазы $F_{C_1}M$ служит ПКаз основного белка миелина (МВР). Приводятся также данные относительно величины M_r и субъединичного состава LP-1 и LP-2. Выявлению активности последних способствовала процедура замораживания-оттаивания. В числе субстратов этих ФПФаз оказались фосфоорилаза α , гистон 2А и МВР. Показано, что LP-2 является высокоспецифичной для нервной ткани, ингибируется DARP-32 и G-субстратом. Регуляция всех этих ФПФаз в мозгу представляет особый интерес, поскольку ряд физиологических эффектов нейротрансмиттеров реализуется путем модификации активности ФПФаз, участвующих в нейроспецифичных

реакциях метаболизма. Обсуждаются на основе собственных и литературных данных молекулярные подходы к объяснению патофизиологической основы ряда нервных и психических заболеваний.

В исследованиях японских ученых Е. Miyamoto и соавт. кальций-нейрин рассматривается в качестве нейронального маркера. Отмечается локализация кальцийнейрина и белка MAP-2 в микротрубочках дендритов и рассматривается роль этой фосфатазы в регуляции функции микротрубочек. Установлено, что лучшими субстратами кальцийнейрина являются белки нервной ткани MAP-2, тау-фактор и тубулин, фосфорилированные Ca^{2+} -кальмодулинзависимой ПКазой. Метод пептидных карт позволил установить участки этих белков, специфично дефосфорилируемые кальцийнейрином. По данным иммунореактивности, фермент обнаруживается в нейронах, но не в глии. В хвостатом ядре, гиппокампе и черной субстанции выявлялась максимальная иммунореактивность. Примечательно присутствие кальцийнейрина в нервных окончаниях и постсинаптических плотностях, хотя авторы и не приводят доказательств прямого участия этой фосфатазы в передаче нервного импульса.

Механизм каталитического действия кальцийнейрина с использованием низкомолекулярных модельных субстратов рассматривается в томе IV, в статье В. L. Martin и D. Graves «Химический механизм кальцийнейрина: модель для фосфотирозильных протеинфосфатаз».

В 1989 г. вышел в свет очередной, V том, в котором представлены материалы II Международной конференции по ФПФазам, состоявшейся в Цинциннати, США. Среди исследований нейрохимического профиля в этом томе привлекает внимание работа сотрудников лаборатории Р. Greengard, в которой идентифицирован ингибиторный участок белка DARPP-32 (допамин- и cAMP-регулируемый ФП мозга), способного подавлять активность ФПФазы-I. Белок этот фосфорилирован по остатку треонина —34, а его регуляторные свойства сохраняются во фрагменте 9—38. К. Palczewski и др. удалось выделить из наружных сегментов палочек глаза сходную по свойствам с ФПФазой-2A фосфатазу, дефосфорилирующую фосфоопсин, который образуется при быстром фосфорилировании на свету родопсина родопсинкиназой.

Регулярный выпуск томов «Advances in Protein Phosphatases» обеспечивает быстрый и эффективный обмен информацией и взглядом между биохимиками, изучающими структурные, регуляторные и функциональные свойства ФПФаз и стимулирует проведение дискуссий относительно физиологической роли этих ферментов, способствуя лучшему пониманию их возможного участия в патологических процессах. Именно поэтому это продолжающееся издание представляет несомненный интерес для специалистов в области биохимии, патохимии, нейрохимии и эизимологии.

ПАРСАДЯНИ Г. К.



МЕЖДУНАРОДНЫЙ СИМПОЗИУМ «МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ДЕЙСТВИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА ПОВЕДЕНИЕ»

(5—7 июля 1989 г., Таллинн)

Хотя по своему официальному статусу эта встреча 63 ученых из 9 стран мира считалась сателлитным симпозиумом XXXI Международного конгресса физиологических наук (Хельсинки, июль 1989), на самом деле, судя по разнообразию представленных на ней сообщений и широте представительства специалистов из разных государств, она имела значение вполне самостоятельного научного форума. И как любая действительно плодотворная встреча ученых, таллиннский симпозиум выветил важнейшие проблемы и пути развития той отрасли современной нейробиологии, которой он был посвящен.

Прежде всего это касается происходящего в последние годы переноса центра тяжести исследований нейрохимических основ поведения от медиаторов и пептидов—к молекулярной генетике. Еще недавно работы, где нейробиолог клонировал гены, проводил их скрининг, скринировал библиотеки генов, словом, внедрялся в область, казалось бы, далекую от нейрофизиологии, были единичным явлением. Сегодня же все изменилось. На симпозиуме в Таллинне уже 4 из 49 представленных работ были посвящены этой теме. Их выполнили в разных лабораториях Института нормальной физиологии им. П. К. Анохина АМН СССР, который вместе с Тартуским государственным университетом (ЭССР) был главным организатором симпозиума, в Медико-фармацевтическом университете г. Тойяма (Япония) и в Исследовательском институте при Scripps Clinic г. Ла-Йола (США).

Профессор *J. Gregor Sutcliffe* из США представил данные опытов, нацеленных на идентификацию генов, специфически экспрессирующихся в различных отделах НС. Из нейронов сетчатки мышей мутантов, страдающих генетически обусловленным заболеванием (дегенерация указанных клеток) были выделены клоны ДНК, ответственные за синтез белков, специфических для изучаемых нейронов. Один из выделенных генов, кодирующий белок с Mr 39 кД, у мышей-мутантов оказался поврежденным—обрыв на расстоянии 10 килобайт в пределах кодирующего экзона. Этот генетический дефект предполагается в качестве первопричины врожденного заболевания животных. В другом исследовании группа Сатклифа получила из разных областей мозга мышей клоны кДНК, кодирующие белки, являющиеся нейроспецифическими для данных отделов мозга. Особый интерес американских исследователей сейчас вызывает ген «1B1075», принадлежащий 9-й хромосоме мыши и кодирующий белки, специфические для передней доли гипофиза.

Японский ученый Y. Oomura представил исследование, являющееся примером многопрофильного, системного подхода к проблеме центральной регуляции пищевого поведения, и в частности участия в нем биологически активного вещества—фактора роста фибробластов (ФРФ). Применяв *in situ* гибридизацию, электрофорез, иммуногистохимический контроль с антителами к ФРФ, а также поведенческие модели, авторы показали, что антибулемическое действие ФРФ опосредуется через активацию глюкоресепторных нейронов латерального гипоталамуса, солитарного тракта. Зона incerta. Сходные эффекты были обнаружены при исследовании интерлейкина-1 β и фактора, вызывающего некроз опухолей. Таким образом, получены новые данные о нейрохимических механизмах пищевого поведения.

Два доклада, посвященные молекулярно-нейробиологическим исследованиям, представили сотрудники НИИ нормальной физиологии им. П. К. Анохина АМН СССР. В сообщении К. В. Анохина, А. Э. Рябинина, В. Zeiner (ГДР) приведены данные об особенностях экспрессии в мозгу мышей так называемых «ранних» генов *c-fos* и *c-jun*. Как известно, этот процесс рассматривается сейчас в качестве триггерного для функциональных перестроек генетического аппарата нервных клеток в ответ на различные стимулы. Методом Northern-blot гибридизации было установлено, что гены *c-fos* и *c-jun* начинают быстро экспрессироваться в мозгу мышей, подвергнутых судорогам в результате введения препарата метразола, а также обучению реакциям пассивного избегания. Выявлен двухфазный, сходный для обоих экспериментов характер экспрессии генов *c-fos* и *c-jun*. В сообщении подчеркивалось, что исследование «ранних» генов мозга открывает эффективные методы фармакомодуляции долговременных функциональных перестроек нервных клеток.

Неожиданный результат был представлен в сообщении А. К. Мурашова и его коллег. Также применив метод Northern blot гибридизации, они исследовали в мозгу и других органах крыс, подвергнутых острому эмоциональному стрессу, характер экспрессии генов теплового шока (HSP-70). Их изучение, начатое в опытах с дрозофилами, сейчас активно продолжается на млекопитающих. Предполагалось, что характер экспрессии HSP-70 сходен с «ранними генами» в том, что в обоих случаях таким образом проявляется малоспецифический ответ нейрона на разные стимулы—стресс, обучение, повреждение и т. д. Однако, как показали А. К. Мурашов и соавт., лишь в семенниках, но не в мозгу, тимусе или надпочечниках крыс экспрессия HSP-70 достоверно увеличивалась в ответ на стресс.

В приведенных 4 сообщениях, относящихся к молекулярной нейробиологии, которые были представлены на таллинском симпозиуме, отразились главные особенности этого молодого направления в науке о мозге. На наш взгляд, сегодня они состоят в следующем.

1. Методы молекулярной генетики быстро внедряются в самые разные области нейробиологии, хотя еще в середине 80-х годов казалось, что «направлением главного удара» для молекулярной генетики еще долго останутся механизмы памяти и обучения.

2. Нейробиологи, взявшие на вооружение методы молекулярной генетики, в большинстве своем пытаются решить проблемы, уже сегодня имеющие практическое значение (для представленных в Таллине работ—это врожденные болезни ЦНС, стресс, модуляция состояния голода и длительного хранения информации в нейронах).

3. На этом направлении еще не открыты принципиально новые механизмы работы мозга, хотя преимуществом данного пути является более эффективный по сравнению с традиционными методами поиск, выделение и изучение биологически активных молекул ЦНС.

Подавляющее же большинство сообщений таллиннского симпозиума было посвящено наиболее изучаемой сейчас группе биологически активных веществ—пептидам. Приступая к описанию этих работ, необходимо отметить, что и в этой уже сложившейся области все чаще проявляется заинтересованность экспериментаторов в функциях генетического аппарата нервной клетки.

В частности, в докладе акад. АМН СССР К. В. Судакова было показано, что блокаторы процессов транскрипции и трансляции циклогексимид, пуромидин и актиномицин D тормозят пищевое поведение накармливаемых кроликов, вызванное электростимуляцией (ЭС) латерального гипоталамуса (ГПТ), реакции избегания, вызванные ЭС вентромедиального ГПТ, и самостимуляцию латерального ГПТ. I тип поведения восстанавливался инъектированием животным пентагастрина, II—брадикинина, III—АКТГ. Акад. К. В. Судаков высказал предположение, что процессы подкрепления ведут к синтезу в ЦНС особой группы мозгоспецифических белков (МСБ).

В сообщении проф. В. В. Шерстнева (Москва) приведены данные опытов на виноградной улитке. В качестве МСБ, связанного с характерным типом подкрепления, был выявлен негистоновый белок хроматина NP-33, локализованный на внутриклеточной поверхности ядерных мембран нейронов. Синтез указанного МСБ в нейронах улитки специфически связан с обучением отвергания определенных видов пищи.

Другие сообщения о нейропептидах относились к таким традиционным направлениям, как регуляция обучения и памяти, пищевого, оборонительного, агрессивного поведения, самостимуляции, грумминга, страха; возможностей компенсации функций организма, нарушенных в результате нейротравмы, за счет нейропептидов.

Интересный пример использования иммунологических методов для изучения нейропептидов был представлен в сообщении проф. А. В. Котова (Москва) и его сотрудников. Было показано, что иммунизация крыс и обезьян пептидами β -эндорфином и ангиотензином-II совместно с БСА оказывала чрезвычайно длительное и выраженное влияние на разные виды поведения животных, в том числе агрессивность, страх и т. д. Авторы предполагают, что их метод является перспективным в плане разработки методов длительной модуляции различных видов поведения млекопитающих.

Наряду с общизвестными пептидами, группы проопиомеланокортина, DSIP, субстанции Р, холецистокинина и др., были также описаны поведенческие эффекты ранее неизвестного нейропептида седативного действия, выделенного из мозга быка (А. Л. Рылов и соавт., Москва).

Значительное внимание на симпозиуме было посвящено молекулярным основам действия на поведение таких биологически активных веществ, как нейромедиаторы катехол- и индоламинной группы и АХ. Вызвало интерес сообщение болгарских исследователей профессора Н. Николова, М. Цветковой, К. Тцахева относительно особенностей обмена металлов магния, меди, цинка, натрия, кальция в НС крыс генетической линии SHP—SP (врожденная гипертония), подвергнутых хроническому эмоциональному стрессу.

Участники семинара не прошли мимо такой важной проблемы,

как влияние на ЦНС и поведение этанола. Ю. В. Гринченко, В. Б. Швырков и соавт. (Москва) представили данные о нарушениях инструментальных условных рефлексов у кроликов после острых введений этанола. Указанные нарушения описывались в корреляции с эффектами данного вещества на активность отдельных нейронов у свободноподвижных животных.

Из теоретических и обзорных докладов наиболее значительным представляется сделанный проф. А. А. Виру (Тарту). Он дал глубокий анализ современных представлений об адаптивной регуляции функций различных классов нейрональных рецепторов к биологически активным веществам в различных условиях поведения и жизнедеятельности организма.

Итак, бесспорно, что этот симпозиум стал важным этапом на пути международного сотрудничества ученых, исследующих молекулярные основы действия биологически активных веществ на поведение.

РЫЛОВ А. Л.

Региональный информационно-сервисный центр при Институте биохимии им. А. В. Палладина АН УССР 252030, Киев-30, ул. Леонтовича, 9.

Тел.: 224-43-49, 224-59-74.

**ИНФОРМАЦИОННО-СЕРВИСНЫЙ ЦЕНТР ФИРМЫ
«Pharmacia LKB Priority» (ШВЕЦИЯ) ПРИ ИНСТИТУТЕ
БИОХИМИИ им. А. В. ПАЛЛАДИНА
АКАДЕМИИ НАУК УКРАИНЫ**

создан для того, чтобы удовлетворить все Ваши потребности в области научных исследований, клинической диагностики и производственных биотехнологических задач. Мы предлагаем самое современное оборудование (системы стандартной, быстро разрешающей—FPLC, высокоэффективной—HPLC, полупромышленной—BIO PILOT, промышленной—BIO PROCESS, хроматографий, любого типа электрофореза и лазерного сканирования гелей, системы синтеза пептидов—BIO-LYNX и гена—GENE ASSEMBLERS, секвенирования ДНК—MACR GENE WORKSTATION, разнообразные α -, β -, γ -счетчики радиоактивности, наборы клинической диагностики и системы диагностики—LEDFA и EIA, наборы для молекулярной биологии и биотехнологии, лабораторное оборудование, медицинские препараты), которое эффективно используется с реактивами фирмы в широких областях науки, медицины и технологии. Являясь одним из лидеров в мире по производству приборов и реагентов, фирма может позволить себе сравнительно низкие цены, что даст Вам большие преимущества при реализации заказов.

Вам выгодно приобрести оборудование у нас, так как «ЦЕНТР» бесплатно

- исходя из стоящих перед Вами задач, правильно определит тип аппаратуры и объем заявки, оформит Вам заказ-заявку и технико-экономическое обоснование;
- установит и введет в эксплуатацию приобретенное оборудование;
- обеспечит быстрый и качественный гарантийный ремонт;
- обеспечит Вас необходимыми рекламными материалами, каталогами и ценниками, консультациями для оформления будущих закупок;
- обеспечит Вас необходимыми реактивами или наборами в течение 30—60 дней;
- продаст оборудование прямо со своего стенда.

ЗА ОПЛАТУ В РУБЛЯХ:

- обучит Вас правильной эксплуатации приборов в демонстрационной лаборатории или на специальных семинарах;
- выполнит часть Вашей экспериментальной работы, если Вы еще не приобрели соответствующие приборы фирмы;
- обеспечит послегарантийный ремонт Вашего оборудования в кратчайший срок из фонда фирменных запчастей.

Наш «ЦЕНТР» ежеквартально проводит теоретические и практические семинары, где Вы можете встретиться со специалистами фирмы, обсудить и заключить контракт, экспериментировать со сво-

ими образцами. По Вашему желанию «ЦЕНТР» может организовать семинар в Вашей республике, городе или учреждении. Работать с Вами будут ученые и дипломированные специалисты, прошедшие обучение в лабораториях и на заводах фирмы. Мы всегда ждем Ваших заявок на организацию семинаров или на участие в семинарах, организованных нами в других городах.

Если Вы заинтересованы в получении подробной информации по какому-либо вопросу, общего каталога или специальных каталогов, информации о семинарах—сообщите нам название Вашей организации, адрес, телефон и/или телефакс, фамилию, имя, отчество специалиста для контакта.

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

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

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

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

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

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

5. Формулы и индексы должны быть вписаны четко черными чернилами или пастой, обязательно выделяя курсив (подчеркнуть полнотой 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. Название ферментов и коферментов, символы кинетики ферментов и единицы активности, написание соединений, меченных изотопами, и т. п. должны соответствовать требованиям Международного биохимического союза. Разрешаются лишь общепринятые современные сокращения слов, различных единиц измерения, физических и химических величин, терминов и т. п. В приложении к правилам для

авторов, которое публикуется в каждом первом номере нашего журнала, приводится список наиболее часто употребляемых сокращенных обозначений, применяемых без специальной расшифровки.

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

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

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

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

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

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

10. Редакция высылает авторам бесплатно оттиски опубликованной статьи.

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

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

13. Корректуру авторам редакция не высылает.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

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

The Editorial Office
Journal «Neirokhimia»
P. Sevak str. 5/1, Yerevan 375044, USSR

Arrangement of the manuscript

1. The first page should bear:
 - a) the title, concise but informative
 - b) the complete names of the author(s)
 - c) the name of the lab where the work was carried out
 - d) the address to which correspondence should be sent

2. Each paper should be preceded by a Summary giving a brief account to the most relevant contributions of the paper (100—200 words, 1.5 spacing). It's important to indicate the goal, the methods, the results and conclusions.

3. Experimental papers should be divided into the following sections: Materials of Methods, Results and Discussion, Reference List. It may be often advantageous to have only 2 sections: Results and Discussion. There's no need to split short comparison.

4. Bibliographic citations should be made in numerical order (not more than 2 references for articles, 80—for reviews, 15—for short communications), in square brackets and initials of authors, journal name, volume and issue number, inclusive page numbers and year. For book titles the style is similar but contains book title—«I» followed by initials, surname of editor, the name and location of the publishing company.

5. Tables should be typed on separate pages and numbered in the order they appear in the text. They must have heading and contain only usually adopted abbreviations. Figures and graphs should be drawn separately on good quality drawing or tracing possible. The back of each figure and photo should be labelled lightly in soft pencil to show the top of it, the author's name and the figure and photo number. Legends to figures and photos should be typed on separate pages.

6. The Editorial Board has got the right to shorten and improve the text not altering the main meaning.

7. Proofs are not sent to authors. For each article reprints are supplied free of charge.

Стандартные обозначения некоторых тринуклеотидных названий химических соединений

Ala* — аланин	Leu — лейцин
AMP, ADP, ATP** — аденозин-5'-моно-, ди- и трифосфаты	Lys — лизин
cAMP — циклический аденозинмонофосфат	Man — манноза
Ага* — арабиноза	Met — метионин
Arg — аргинин	NAD, NADH — никотинамидаденил- динуклеотид и его восстановительная форма
Asp — аспарагин	NADP, NADPH — никотинамидаденил- динуклеотидфосфат и его восстановительная форма
Asp — аспарагиновая кислота	NMN — никотинамидмононуклеотид
Asx — аспарагиновая кислота или аспара- гин	Orn — орнитин
CAMP, CDP, CTP — цитидин-5'-моно-, ди- и трифосфаты	Phe — фенилаланин
CoA — коэнзим А	— неорганический фосфат
CoASAc — ацетилкоэнзим А	— неорганический пирофосфат
Cys — цистеин	Pro — пролин
FAD, FADH ₂ — флавинаденилдину- клеотид и его восстановительная форма	Rib, dRib — рибоза, 2-дезоксирибоза
FMN, FMNH ₂ — фламинмононуклеотид и его восстановительная форма	Q, QH ₂ — убихинон, убихинол
Fuc — фукоза	Ser — серин
Fru — фруктоза	Thr — треонин
Gal — галактоза	TMP, TDP, TTP — рибозилтимин-5'-моно-, ди- и трифосфаты
Glc — глюкоза	Tgr — гриптофан
GlcA — глюкуроновая кислота (аналогич- но другим уроновым к-там)	Tyr — тирозин
GlcN — глюкозамин	UMP, UDP, UTP — уридин-5'-моно-, ди- и трифосфаты
GlcNAc — ацетилглюкозамин (аналогич- но другим дезоксахарам и их ацетил- производным)	Val — валин
Gln — глутамин	АКТГ — адренокортикотропный гормон
Glu — глутаминовая кислота	АХ — ацетилхолин
Glx — глутамин или глутаминовая кислота	ГАМК — гамма-аминомасляная кислота
Gly — глицин	ДДС-Na — додецилсульфат натрия
GMP, GDP, GTP — гуанозин-5'-моно-, ди- и трифосфаты	ДОФА — диоксифенилаланин
GSH, GSSG — глутатион и его окислен- ная форма	ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота
His — гистидин	ДОХ-Na — дезоксиксидат натрия
Hyl — оксализин	РНК — рибонуклеиновая кислота
Hyr — оксипролин	pРНК — рибосомная РНК
Ile — изолейцин	mРНК — матричная (информационная, ядерная) РНК
IMP, IDP, ITP — инозин-5'-моно-, ди- и трифосфаты	tРНК — транспортная РНК
	Glu-tРНК и т. п. — аминокислотпроизвод- ные РНК
	ТХУ — трихлоруксусная кислота
	трис — трис (оксиметил)-аминометан
	ЭГТА — этиленгликольтетраацетат
	ЭДТА — этилендиаминтетраацетат

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

** Соответствующие дезоксирибонуклеотиды обозначаются путем добавления латинской строчной буквы d перед трехбуквенным символом.

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

АХЭ—ацетилхолинэстераза	ЯМР—ядерный магнитный резонанс
БСА—бичий сывороточный альбумин	А—абсорбция (поглощение)
ВЭЖХ—высокоэффективная жидкостная хроматография	г—константа скорости реакции
ГЖХ—газожидкостная хроматография	k_d —константа диссоциации
ГЭБ—гематоэнцефалический барьер	K_i —константа ингибирования
ДЭАЭ-ц—диэтиламиноэтилцеллюлоза	K_m —константа Михаэлиса
ИКС—инфракрасная спектроскопия	K_s —субстратная константа
ИОХ—ионообменная хроматография	k_H —коэффициент Хилла
ИЭТ—изoeлектрическая точка	V —максимальная скорость реакции
ИЭФ—изoeлектрическое фокусирование	Ки—кюри
КМ-ц—О-карбоксиметилцеллюлоза	мКи—милликюри
МАО—моноаминоксидаза	Р—рентген
М. Е.—международная единица	имп/мин—импульсы за минуту
М—молярность	Д—далтон
M_r —молекулярная масса (вес)	кД—килодалтон
м-, о-, п—мета-, орто-, пара-	ч—час
н—нормальный (раствор)	мин—минута
НС—нервная система	с—секунда
ПААГ—полиакриламидный гель	мкм—микрометр
ПОЛ—перекисное окисление липидов	мл—миллилитр
СМЖ—спинномозговая жидкость	мкл—микролитр
т. кип.—температура кипения	мг—миллиграмм
т.пл.—температура плавления	мкг—микрограмм
ТСХ—тонкослойная хроматография	нг—нанограмм
У. А.—удельная активность	нм—нанометр
УФ-спектр—ультрафиолетовый спектр	нг—пикограмм
ФДЭ—фосфодиэстераза	мкАтом—микроАтом
ЦНС—центральная нервная система	ммоль—миллимоль
ЭПР—электронный парамагнитный резонанс	мкмоль—микромоль
ЭСР—электронный спиновый резонанс	нмоль—наномоль
	пмоль—пикомоль
	фмоль—фемтомоль

Примечание. Сокращения для названий ферментов, как например, ГДГ, ГДК, ГФБДГ и т. д., не допускаются. Однако нет возражений против замены названия субстрата, входящего в тривиальное наименование фермента, стандартной аббревиатурой, например: АТРаза, РНКаза, NADH дегидрогеназа и т. п. Химические элементы следует обозначать символами, а простые неорганические соединения—формулами, например: $MgCl_2$. Символы ионов следует писать так: Mg^{2+} , Cl^- , PO^{3-} .