

т. 9, № 2, 1990

ISSN 0203—393X

НЕЙРОХИМИЯ

ՆԵՅՂՈՔԻԱ



АКАДЕМИЯ НАУК СССР
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

НЕЙРОХИМИЯ ՆԵՅՐՈՔԻՄԻԱ

ТОМ 9, ВЫП. 2
АПРЕЛЬ—ИЮНЬ

Журнал основан в 1982 году
Выходит 4 раза в год

ИЗДАТЕЛЬСТВО АН АРМЯНСКОЙ ССР
ЕРЕВАН 1990

Con synthesis and uptake of [3 H] noradrenaline by rat adrenals.	261
<i>Pogosyan A. Yu., Osepian L. M., Overyan G. A., Panosyan A. G., Karagez- yan K. G., Pepoyan A. Z.</i> Metabolism of fatty acids in brain during experi- mental oedema	265

Reviews

<i>Galoyan A. A.</i> Ca^{2+} -calmodulin and coupled systems of the control	271
--	-----

Ст. редактор Э. А. Хачатурова
Лит. сотрудник Г. Р. Григорян

Сдано в набор 11.06.90 г. Подписано в печать 11.02.91 г.

Формат 70×108^{1/16}. Бумага № 1. Печать высокая.

Печ. л. 8.0, усл. печ. л. 11.2, учет. изд. л. 9.58. Тираж 715 экз.

Заказ № 708. Издат. 7854. Цена 1 р. 65 к.

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

Типография АН Армения, г. Ечмиадзин.

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 (огл. секретарь), И. П. АШМАРИН, Р. Н. ГЛЕБОВ,
К. Г. КАРАГЕЗЯН, В. К. ЛИШКО, В. С. ОГАНЕСЯН, К. С. РАЕВСКИЙ,
Л. Я. ТЯХЕПЫЛД, Г. С. ХАЧАТРЯН,
АГРАНОФФ Б. (США), ТУЧЕК С. (Чехословакия)

Редакционный совет

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

К СВЕДЕНИЮ ЧИТАТЕЛЕЙ!

Журнал «НЕЙРОХИМИЯ» (орган АН СССР и АН Армении) 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, глиии и нейронов, хромоаффинных групп 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 агенство «Международная книга». Журнал выходит 4 раза в год, цена одного номера—1 руб. 65 коп.

РЕДКОЛЛЕГИЯ



УДК 578.858

ВЛИЯНИЕ ЛИШЕНИЯ ПАРАДОКСАЛЬНОЙ ФАЗЫ СНА НА СПЕЦИФИЧЕСКОЕ СВЯЗЫВАНИЕ [^3H]МОРФИНА И [^3H]НАЛОКСОНА С СИНАПТИЧЕСКИМИ МЕМБРАНАМИ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

ТАРАНОВА Н. П., МАЛИКОВ У. М.

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

Исследовали кинетические характеристики связывания [^3H]морфина и [^3H]налоксона с опиатными рецепторами синаптических мембран из мозга крыс в норме и после 24-часового лишения парадоксальной фазы сна. Установлено, что эти рецепторы имеют один тип центров связывания с высоким сродством к опиатам. Показано, что лишение парадоксальной фазы сна не изменяет числа мест связывания [^3H]морфина и сродства рецепторов к морфину и налоксону. Однако концентрация центров связывания [^3H]налоксона при этом заметно снижается. Предполагается, что это является следствием структурно-функциональной перестройки синаптических мембран при депривации парадоксальной фазы сна.

Для исследования биологической роли и функции сна, который является жизненно необходимым периодически развивающимся функциональным состоянием, весьма эффективен метод полного лишения сна или избирательного лишения различных его фаз [1]. Этими методами достигаются эффекты искусственного продления бодрствования с нарастанием всех тех явлений, которые и вызывают необходимость сна. Показано, что избирательное лишение парадоксальной фазы сна (ПФС) вызывает ряд биохимических изменений в синаптических мембранах—изменение их проницаемости к Ca^{2+} , повышение степени гидрофобности за счет снижения активности ПОЛ и повышение количества свободных SH-групп [2, 3]. Эти биохимические сдвиги не могут не отразиться на функциях синаптических мембран, в частности их рецепторного аппарата. Так, полное лишение сна вызывает снижение сродства к лиганду низкоаффинных центров связывания серотониновых рецепторов головного мозга крыс [4], а при избирательном лишении ПФС у них отмечено уменьшение общей концентрации β -адренорецепторов коры и дофаминовых рецепторов стриатума и повышение их сродства к лигандам [5, 6]. Поскольку в физиологических процессах возникновения и поддержания состояния сна предполагается участие и опиоидов [7], нашей задачей было исследование характеристик связывания агониста μ -рецепторов [^3H]морфина и антагониста опиатных рецепторов—[^3H]налоксона с синаптическими мембранами ствола головного мозга крыс при лишении их ПФС.

Опыты выполнены на крысах-самцах линии *Wistar* массой тела 200—220 г. Избирательное лишение ПФС в течение 24 ч вызывали по методу Жувэ, помещая животных на площадки размером 5×5 см, окруженные водой. Контрольную группу составляли животные, находящиеся в клетках в состоянии относительного физиологического покоя. Крыс декапитировали, на холоде быстро извлекали головной мозг, выделяли стволовую часть и готовили 10%-ный гомогенат в 0,32 М сахарозе (на 0,05 М трис-HCl буфере, pH 7,4) в гомогенизаторе тефлон-стекло. Синаптические мембраны получали методом дифференциального центрифугирования в градиенте плотности сахарозы [8]. Осадок синаптических мембран суспендировали в инкубационном буфере следующего состава: 0,005 М HEPES, 5 mM MgCl₂, pH 7,4 (для связывания [³H]морфина) или 0,05 М трис-HCl, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0,5 mM NaH₂PO₄, pH 7,4 (для связывания [³H]налоксона). Содержание белков в суспензии синаптических мембран определяли по модифицированному методу Lowry [9]. Специфическое связывание [³H]морфина и [³H]налоксона с синаптическими мембранами ствола головного мозга исследовали методом равновесного рецепторного связывания [10] инкубируя при 37° суспензию синаптических мембран с [³H]морфином (в диапазоне концентраций от 0,18 до 6,92 нМ/л) или с [³H]налоксоном (в диапазоне концентраций от 0,1 до 12,8 нМ/л). Инкубацию проводили в параллельных пробах также в присутствии немеченого морфина и налоксона соответственно в конечной концентрации 10⁻⁶ М/л для оценки величины неспецифического связывания лигандов. Удаление несвязавшегося лиганда проводили методом вакуумной фильтрации через стекловолоконные фильтры GF/F («Whatman», Англия). Радиоактивность проб измеряли на счетчике «ISOCAP-300», используя диоксан-кислотную сцинтилляционную жидкость. При расчетах была использована динамическая модель кинетики связывания лиганда с мембраной, содержащей один центр связывания [11]. Стационарные значения такой модели позволяют вычислить характеристики центров (K_d и B_{max}). Для оценки этих параметров использовали метод перебора. В качестве оценок выбирали их значения, обеспечивающие наибольшую близость теоретических значений к экспериментальным. Кинетические характеристики центров связывания определяли на ЭВМ-3040. Полученные результаты статистически обрабатывали по Стьюденту-Фишеру.

Результаты исследования

В предварительных опытах были определены оптимальные условия для исследования специфического связывания [³H]морфина и [³H]налоксона с синаптическими мембранами. Количество белка в пробе было подобрано по результатам анализа кривой связывания лиганда в зависимости от концентрации белка в пробе (рис. 1, б) и соответствовало участку прямолинейной зависимости. В дальнейших опытах использовали 150 мкг белка в пробе с [³H]морфином и 100 мкг белка в пробе с [³H]налоксоном. Время инкубации было подобрано по установлению равновесия в реакционной среде и составляло 20 мин (рис. 1, а). Исследование связывания различных концентраций меченого лиганда в этих условиях синаптическими мембранами контрольных животных показало, что связывание как [³H]мор-

фина, так и $[^3\text{H}]$ налоксона с синаптическими мембранами ствола головного мозга крыс является специфическим и насыщаемым (рис. 2, а; 3, а). Добавление в среду инкубации помеченных лигандов в концентрации 10^{-6} М через 30 мин после меченых лигандов с последующей инкубацией в течение 20 мин уменьшало количество специфически связавшегося $[^3\text{H}]$ морфина и $[^3\text{H}]$ налоксона до уровня.

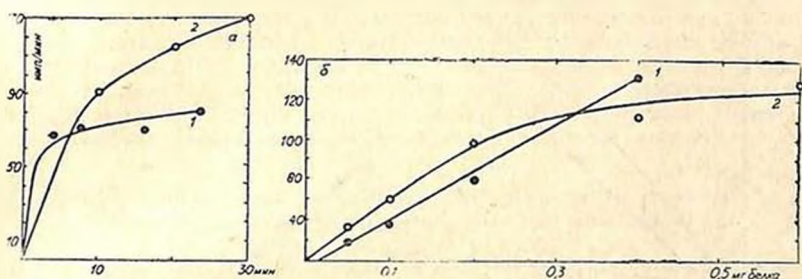


Рис. 1. Специфическое связывание $[^3\text{H}]$ морфина и $[^3\text{H}]$ налоксона с синаптическими мембранами ствола головного мозга крыс (1— $[^3\text{H}]$ морфин, 2— $[^3\text{H}]$ налоксон); а—при инкубации в течение 20 мин $1,37 \text{ нМ/л}$ $[^3\text{H}]$ морфина и $0,05 \text{ нМ/л}$ $[^3\text{H}]$ налоксона с различными концентрациями белка синаптических мембран; б—при различных сроках инкубации 100 мкг белка с $1,37 \text{ нМ/л}$ $[^3\text{H}]$ морфина и $0,05 \text{ нМ/л}$ $[^3\text{H}]$ налоксона.

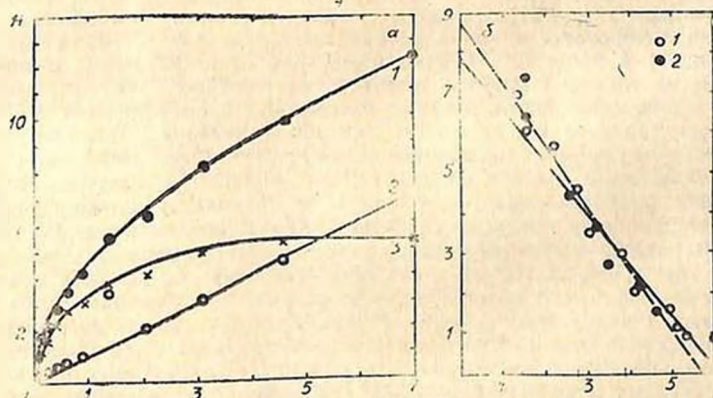


Рис. 2. Специфическое связывание $[^3\text{H}]$ морфина (в диапазоне концентраций от $0,19$ до $6,92 \text{ нМ/л}$) с синаптическими мембранами ствола головного мозга крыс (каждая точка—среднее из 5–6 экспериментов): а—график кинетики насыщения (1—общее связывание, 2—неспецифическое связывание, 3—специфическое связывание); б—специфическое связывание в координатах Скэтчарда (1—контрольных крыс, 2—после лишения парадоксальной фазы сна)

соответствующего неспецифическому связыванию, наблюдаемому при одновременном внесении меченого и немеченого лиганда. Это свидетельствует о том, что связывание этих лигандов с опиатными рецепторами синаптических мембран является обратимым.

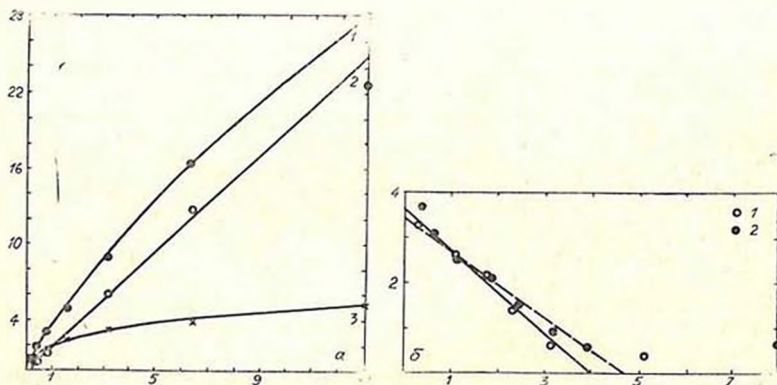


Рис. 3. Специфическое связывание $[^3\text{H}]$ налоксона (в диапазоне концентраций от 0,1 до 12,8 нМ/л) с синаптическими мембранами ствола головного мозга крыс (каждая точка—среднее из 4 экспериментов): а—график кинетики насыщения (1—общее связывание, 2—неспецифическое связывание, 3—специфическое связывание). б—специфическое связывание в координатах Скэтчарда (1—контрольных крыс, 2—после лишения парадоксальной фазы сна)

Результаты опытов по исследованию специфического связывания $[^3\text{H}]$ морфина и $[^3\text{H}]$ налоксона с синаптическими мембранами были проанализированы в координатах Скэтчарда (рис. 2, б; 3, б). Прямолинейный характер графика Скэтчарда свидетельствует о гомогенности центров связывания синаптических мембран как для агониста, так и для антагониста, а также о связывании $[^3\text{H}]$ морфина и $[^3\text{H}]$ налоксона лишь с одним типом центров связывания. Эта закономерность сохраняется у животных и после 24-часовой депривации ПФС. В то же время, в исследованиях, выполненных на тотальной мембранной фракции мозга, часто получали криволинейный характер графика Скэтчарда, указывающий на наличие двух центров связывания $[^3\text{H}]$ морфина и $[^3\text{H}]$ налоксона, что свидетельствует о гетерогенности этих центров [12—15]. По-видимому, это обусловлено присутствием мембран глиального происхождения, на которых могут быть опиатные рецепторы [16], отличающиеся по своим характеристикам от нейрональных и синаптических рецепторов. В пользу этого предположения говорит тот факт, что при исследовании кинетических характеристик опиатных рецепторов на препаратах исключительно нейронального происхождения (изолированные нейроны, синапсомы, синаптические мембраны), как правило, получают прямолинейный график Скэтчарда, подтверждающий гомогенность центров связывания опиатов на нейрональных мембранах и связывание этих лигандов лишь с одним типом рецепторов [17, 18].

Кинетические параметры связывания $[^3\text{H}]$ морфина и $[^3\text{H}]$ налоксона представлены в таблице и указывают на высокоаффинный харак-

тер связывания как [^3H]морфина ($K_d = 5,2 \pm 0,53$ нМ), так и [^3H]налоксона ($K_d = 0,98 \pm 0,08$ нМ) с рецепторами синаптических мембран, причем сродство рецепторов к налоксону оказалось значительно выше, чем к морфину. Но концентрация центров связывания агониста опиатных μ -рецепторов [^3H]морфина и антагониста этих рецепторов [^3H]налоксона в синаптических мембранах оказалась примерно одинаковой (таблица).

Лишение ПФС в течение 24 ч не вызывало заметных изменений ни числа мест связывания [^3H]морфина с синаптическими мембранами, ни сродства рецепторов к этому лиганду (таблица). В то же время депривация ПФС приводила к снижению общей концентрации центров связывания антагониста—[^3H]налоксона, хотя сродство опиатных рецепторов к этому лиганду при этом достоверно не изменялось (таблица). Поскольку было показано, что полное лишение крыс

Таблица

Кинетические характеристики связывания [^3H]морфина и [^3H]налоксона с синаптическими мембранами ствола головного мозга крыс в норме и при лишении их ПФС

Условия эксперимента	Количество экспериментов	B_{max} (фмоль/мг белка)	K_d (нМ)
Контроль 24 ч лишения ПФС	5	[^3H] морфин $4,90 \pm 0,21$	$5,20 \pm 0,53$
	6	$4,60 \pm 0,39$	$4,70 \pm 0,57$
Контроль 24 ч лишения ПФС	4	[^3H] налоксон $3,60 \pm 0,24$	$0,94 \pm 0,10$
	4	$2,67 \pm 0,69$ (—26%) $p < 0,05$	$0,75 \pm 0,10$ (—20%) $p > 0,05$

сна в течение 24 ч в цилиндрическом титре также не вызывало изменений сродства к [^3H]налоксону рецепторов и в тотальной мембранной фракции мозга [19], можно думать, что длительные нарушения сна способны изменить экспрессию опиатных μ -рецепторов, но не их сродство к лиганду.

Ранее нами было высказано предположение, что в механизмах развития нарушений функций ЦНС при длительной депривации сна определенную роль играют изменения состояния опиоидной системы мозга, о чем свидетельствовали сдвиги в содержании Met-энкефалина [20] и β -эндорфина [21]. Полученные в данной работе результаты подтверждают это предположение и указывают на то, что в реакции опиоидной системы мозга на депривацию сна в какой-то мере участвует также и структурно-функциональная перестройка опиатных рецепторов, локализованных в синаптических мембранах.

THE EFFECT OF REM-SLEEP DEPRIVATION ON BINDING OF [^3H]MORPHINE AND [^3H]NALOXONE WITH SYNAPTIC MEMBRANES IN RAT BRAIN

TARANOVA N. P., MALIKOV U. M.

J. P. Pavlov Institute of Physiology, USSR Academy of Sciences, Leningrad

The specific binding of [^3H] morphine and [^3H] naloxone with synaptic membranes of the rat brain has been studied in the norm and after

REM-sleep deprivation. According to results obtained the opiate receptors of the synaptic membranes have only one high-affinity binding site for [3 H]morphine and [3 H]naloxone. After 24-hour REM-sleep deprivation the number of [3 H]morphine binding sites and its affinity as well as the affinity of the [3 H]naloxone binding sites were not altered. At the same time the number of [3 H]naloxone binding sites was shown to increase. These effects appear to originate by structural-functional reorganization of synaptic membranes during REM-sleep deprivation.

ЛИТЕРАТУРА

1. Демин Н. Н., Коган А. Б., Моисеева Н. Н. Нейрофизиология и нейрохимия сна, Л., Наука, 1978.
2. Демин Н. Н. Нейрохимия, т. 1, № 1, с. 720—727, 1982.
3. Таранова Н. П., Пилова Н. С. Физиол. журн. СССР, т. 72, № 8, с. 1065—1068, 1983.
4. Wesemann W., Welner N., Rotsch M., Schulz E. J. J. Neural Transmission, suppl 18, p. 287—294, 1983.
5. Mogilnicka E. Pharm. Biochem. Behav., v. 15, p. 149—151, 1981.
6. Zwicker A. P., Callil H. M. Pharm. Biochem. Behav., v. 24, p. 809—812, 1986.
7. Wilson L., Dorosz L. Med. Hypotheses, v. 14, p. 269—280, 1984.
8. Pert C. B., Snowman A. M., Snyder S. H. Brain Res., v. 70, p. 184—188, 1974.
9. Miller G. Z. Anal. Chem., v. 31, № 5, p. 964, 1959.
10. Bennet J. P. Neurotransmitter receptor binding, N. Y., Raven Press, 1978.
11. Варфоломеев С. Д., Зайцев С. В. Кинетические методы в биохимических исследованиях, М., МГУ, 1982.
12. Scics M., Benyhe S., Borsodi A., Woltemann M., Jancso G., Szecsi J., Medzihradsky K. Life Sci., v. 32, p. 2777—2784, 1983.
13. Зайцев С. В., Курочкин И. Н., Сергеева М. Г., Варфоломеев С. Д. Биохимия, т. 49, вып. 7, с. 1127—1133, 1984.
14. Blorton P. A., Broadhurst A. M., Wood M. D., Willie M. G. J. Receptor Res., v. 6, № 1, p. 85—93, 1986.
15. Балашов А. М., Петриченко О. Б., Алябьева Т. Н., Панченко Л. Ф. Биохимия, т. 53, вып. 9, с. 1527—1531, 1988.
16. Абутидзе К. Д., Соломония Р. О., Микеладзе Д. Г. Нейрохимия, т. 6, № 3, с. 418—421, 1987.
17. Rogers N. F., El-Fakahany E. E. Eur. J. Pharmacol., v. 124, p. 221—230, 1986.
18. Pollack A. E., Wooten G. F. Life Sci., v. 41, p. 385—390, 1987.
19. Wirz-Justice A., Tobler I., Kafka M. S., Naber D., Marangos F. J., Borbély A. A., Wehr T. A. Psychiatry Res., v. 5, p. 67—76, 1981.
20. Таранова Н. П., Глущенко Т. С., Маликов У. М. Тезисы 10 Всесоюзн. конф. «Фундаментальные достижения нейрохимии—медицине», с. 86—87, Горький, 1987.
21. Przewlocka B., Mogilnicka E., Lason W., Lnytelaaar E. L. J. M., Coenen A. M. L. Neurosci. Lett., v. 70, № 1, p. 138—142, 1986.

Поступила 22.XII.1989



УДК 612.822.1.014.467

СВОЙСТВА МЕСТ СПЕЦИФИЧЕСКОГО СВЯЗЫВАНИЯ ЭТИЛОВОГО ЭФИРА β -КАРБОЛИН-3-КАРБОЛОВОЙ КИСЛОТЫ, ОТЛИЧНЫХ ОТ БЕНЗОДИАЗЕПИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ В МОЗГУ КРЫСЫ

*МЕЛИКСЕТАН М. Б., КОРНЕЕВ А. Я., СЕРЕДЕНИН С. Б.

^{*}Институт физиологии им. А. А. Орбели АН Армении, Ереван

НИИ фармакологии АМН СССР, Москва

Радиорецепторным методом выявлено специфическое связывание [^3H]этилового эфира β -карболин-3-карболовой кислоты ([^3H]BCCE) в присутствии 20 мкМ AgNO_3 (CuSO_4) и 10 мкМ диазепама в мозгу крысы. Небензодиазепиновое связывание [^3H]BCCE возрастает при наличии в среде аскорбиновой кислоты и хлорид-ионов, при pH 7,4 и 0°. Связывание является обратимым, насыщаемым, относительно мозгоспецифичным. Концентрация небензодиазепиновых мест связывания в мозгу $=607 \pm 14$ пмоль/г ткани, $K = 105 \pm 10$ нМ, в то время как параметры связывания [^3H]BCCE с бензодиазепиновыми рецепторами имеют значения соответственно 81 ± 9 пмоль/г и $3,2 \pm 0,4$ нМ.

Согласно современным представлениям, ряд производных β -карболин-3-карболовой кислоты, в частности ее эфиры, обладают ярко выраженным анксиогенным действием и являются обратными агонистами бензодиазепиновых (БД) рецепторов.

Ранее высказывалось предположение о существовании участков связывания [^3H]BCCE, не блокируемых высокими концентрациями диазепама, причем в присутствии 50 мМ дитиотрептола (ДТТ) связывание было ничтожно мало [1].

Нопге и соавт. [2], Braestrup и соавт. [3] наблюдали небензодиазепиновое связывание [^3H] ДМСМ (метил 6, 7 диметокси-4-этил β -карболин-3-карбоксилата) при обработке мембран мозга крысы 0,1 мМ AgNO_3 . Методом радиационной инактивации было установлено, что эти участки представляют собой белок с величиной M_r 100 кД.

Специфическое связывание [^3H] поргармана с местами, не связывающими бензодиазепины, было описано ранее [4].

Основываясь на приведенных выше данных, попытались выявить небензодиазепиновые места связывания [^3H]BCCE в присутствии 20 мкМ AgNO_3 (CuSO_4) и 10 мкМ диазепама.

Материалы и методы

Крыс декапитировали, ткань мозга быстро извлекали, гомогенизировали в 10 объемах 50 мМ трис-HCl буфера (pH 7,4) на гомогенизаторе «Политрон» в течение 30 с.

Гомогенат центрифугировали в пробирках «эппендорф» на скорости 12000 g в течение 3 мин. Супернатант сливали, осадок ресуспендировали в 10 объемах 50 мМ трис-HCl буфера и повторно центрифугировали. Процедуру повторяли 4 раза. Затем осадки замораживали при -20° . Перед употреблением осадки размораживали, ресуспендировали и центрифугировали 1 раз в тех же условиях. Суспензия мембран, используемая в экспериментах, имела концентрацию 15 мг/мл в пересчете на исходный вес ткани.

Из исходного препарата $[^3\text{H}]\beta\text{CCE}$ (У. А. 29 Ки/ммоль, «Amersham», Англия) готовили рабочий раствор метки в буфере, конечная концентрация которого находилась в пределах от 1 до 35 нМ.

Для определения величины специфического связывания $[^3\text{H}]\beta\text{CCE}$ с БД рецепторами пробы объемом 1 мл, каждую из которых ставили в трех параллелях, инкубировали с радиолигандом и тестируемыми соединениями в 50 мМ трис-HCl буфере pH 7,4 в течение 40 мин в ледяной бане и затем фильтровали под вакуумом через GF/B фильтры (диаметр 2,4 см, «Whatman», Англия), после чего их промывали 3 раза по 3 мл буфера в течение 10 с.

Фильтры помещали во флаконы со сцинтилляционной жидкостью, и связанную радиоактивность просчитывали на жидкостном сцинтилляционном счетчике.

Для определения величины неспецифического связывания $[^3\text{H}]\beta\text{CCE}$ пробы инкубировали в присутствии 10 мкМ диазепама; специфическое связывание определяли как разность между общим и неспецифическим связыванием и выражали в пмоль/г исходного веса ткани.

Для определения небензодиазепинового связывания $[^3\text{H}]\beta\text{CCE}$ нами был разработан следующий состав инкубационного буфера: N-2 гидроксипиперазин-2-этаносульфоная кислота (HEPES) — 20 мМ, Na_2CO_3 — 20 мМ, диазепам — 10 мМ, аскорбиновая кислота — 0,1%, NaCl — 200 мМ.

Неспецифическое связывание $[^3\text{H}]\beta\text{CCE}$ с небензодиазепиновыми местами связывания определяли в присутствии 10 мкМ βCCE . Все процедуры, связанные с инкубацией проб, были те же, что и в случае определения связывания $[^3\text{H}]\beta\text{CCE}$ с БД рецепторами.

Для оценки аффинности $[^3\text{H}]\beta\text{CCE}$ к небензодиазепиновым местам связывания методом LOGIT-LOG преобразования определяли величину 50%-ного ингибирования связывания IC_{50} , K комплекса рецептор-лиганд и максимальную концентрацию мест связывания определяли из графика Скэтчарда.

Результаты и обсуждение

В первых сериях экспериментов обнаружено резкое возрастание как общего, так и неспецифического связывания $[^3\text{H}]\beta\text{CCE}$ в присутствии 20 мкМ AgNO_3 в условиях, адантированных к выявлению специфического связывания $[^3\text{H}]\beta\text{CCE}$ с БД рецепторами. При этом установлено, что неспецифическое связывание $[^3\text{H}]\beta\text{CCE}$ в присутствии 10 мкМ диазепама на 50% превышает неспецифическое связывание в присутствии βCCE , что позволило предположить наличие мест связывания $[^3\text{H}]\beta\text{CCE}$, не блокируемых высокими концентрациями диазепама. Следовательно, наличие в среде инкубации 10 мкМ диазепама, полностью исключающего возможность связывания с БД рецепторами, позволяет наблюдать «небензодиазепиновое» связывание $[^3\text{H}]\beta\text{CCE}$, то есть связывание с местами, отличными от БД рецепторов.

Была изучена зависимость небензодиазепинового связывания от присутствия в среде ионов различных металлов. В концентрации 0,1 мМ не оказывали влияния на связывание $[^3\text{H}]\beta\text{ССЕ}$. Ионы меди обладали стимулирующим действием, однако, в отличие от ионов серебра, эффект наблюдался только в присутствии 0,1%-ной аскорбиновой кислоты. При концентрации ионов серебра (меди) 1 мкМ небензодиазепиновое связывание практически отсутствовало. Начиная с концентрации 20 мкМ, величина небензодиазепинового связывания в присутствии ионов серебра достигает максимума и при дальнейшем увеличении концентрации ионов не изменяется (рис. 1, а). Увеличение же концентрации ионов меди свыше 20 мкМ влечет за собой возрастание величины неспецифического связывания и некоторое уменьшение специфического связывания (рис. 1, б).

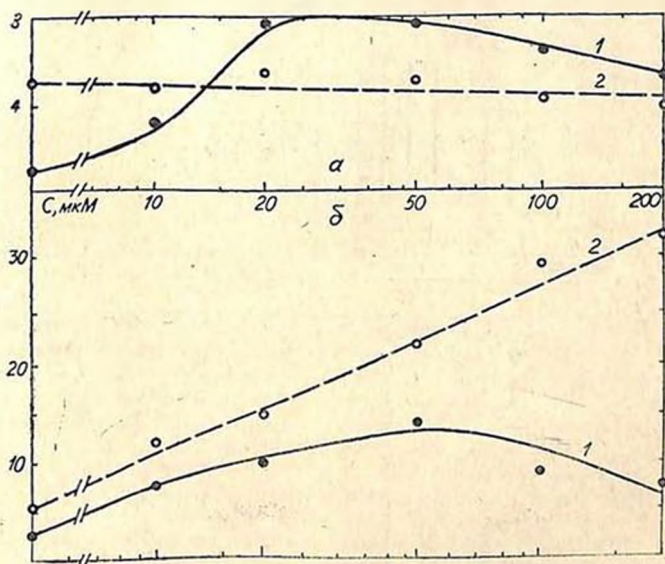


Рис. 1. Влияние ионов серебра (а) и меди (б) на небензодиазепиновое связывание этилового эфира β -карболин-3-карбоновой кислоты и мозга крысы. По оси абсцисс—концентрация $[\text{Ag}^+/\text{Cu}^{2+}]$ мкМ. 1—специфическое связывание, 2—неспецифическое связывание. Концентрация радиолиганда 2 нМ (а) и 1 нМ (б)

Влияние состава инкубационной среды на специфическое небензодиазепиновое связывание $[^3\text{H}]\beta\text{ССЕ}$ продемонстрировано на рис. 2, а, б. Можно видеть, что наличие в среде инкубации 200 мМ NaCl стимулировало $\text{Ag}^+/\text{Cu}^{2+}$ -зависимое связывание $[^3\text{H}]\beta\text{ССЕ}$.

Как видно из табл. 1, небензодиазепиновое связывание $[^3\text{H}]\beta\text{ССЕ}$ в присутствии 50 мМ ДТТ-агента, разрушающего дисульфидные связи в белках, практически не наблюдается, что позволяет предположить, что небензодиазепиновые места связывания имеют белковую природу.

Изучена также зависимость небензодиазепинового связывания $[^3\text{H}]\beta\text{ССЕ}$ от температуры и pH среды инкубации (рис. 3, а, б). Можно видеть, что при повышении температуры от 0 до 37° специфиче-

ское связывание уменьшается почти в 5 раз. Оптимум связывания находится вблизи значения pH 7,5, причем при снижении pH наблюдается резкое падение величины связывания.

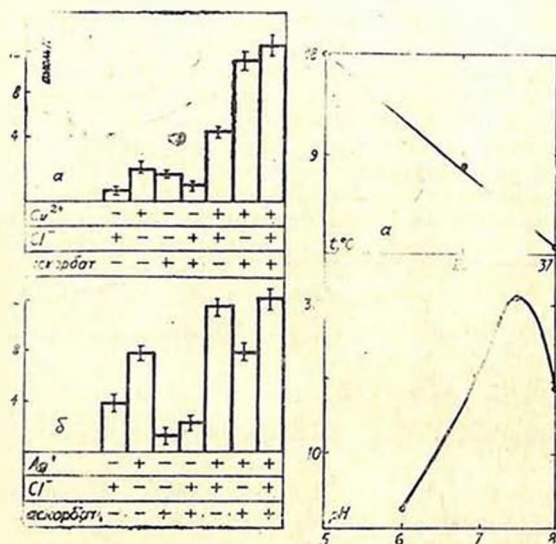


Рис. 2. Влияние состава среды инкубации на величину специфического связывания этилового эфира β -карболин-3-карболовой кислоты с небензодиазепиновыми местами связывания в мозгу крысы в присутствии ионов меди (а) и серебра (б). По оси абсцисс: в присутствии компонента (+), в отсутствие компонента (-). По оси ординат — величина специфического связывания, нмоль/г. Концентрация радиолиганда 3 нМ

Рис. 3. Зависимость специфического связывания этилового эфира β -карболин-3-карболовой кислоты с небензодиазепиновыми местами связывания от температуры и pH среды инкубации. По оси абсцисс — температура (а) и величина pH (б). По оси ординат — величина специфического связывания, нмоль/г. Концентрация радиолиганда 6 нМ (а) и 3,6 нМ (б)

Таблица 1

Влияние дитиотреитола (ДТТ) на небензодиазепиновое связывание этилового эфира β -карболин-3-карболовой кислоты ($[^3\text{H}]\text{BCCE}$)

Активирующий ион	специфическое связывание, нмоль/г		% контроль
	контроль	ДТТ (50 мМ)	
Серебро	10.2 ± 1.9	1.4 ± 0.2	13
Медь	22. ± 2.5	1.9 ± 0.3	8

Примечание. Здесь и в табл. 2 связывание определяли в присутствии 200 мМ NaCl, 10 мкМ диазепам, 0,1%-ной аскорбиновой кислоты. Концентрация радиолиганда 2,5 нМ.

Для оценки специфичности эффекта Ag^+ (Cu^{2+}) в отношении лиганда мы исследовали влияние этих ионов на связывание $[^3\text{H}]\text{флуни-}$
 нитразепама ($[^3\text{H}]\text{FNZ}$) и $[^3\text{H}]$ 8 гидрокс-2-дипропиламиноптери-
 172

на ($[^3\text{H}]\text{ДРАТ}$) с серотониновыми рецепторами типа 1А по методам, описанным ранее [5, 6]. Установлено, что ионы серебра (меди) в концентрации 20 мкМ не оказывают воздействия на связывание $[^3\text{H}]\text{FNZ}$ с 5HT рецепторами и даже несколько ингибируют связывание $[^3\text{H}]\text{ДРАТ}$ с серотониновыми рецепторами типа 1А.

Для оценки аффинности $[^3\text{H}]\beta\text{ССЕ}$ к небензодиазепиновым местам связывания в присутствии () определяли величины 50%-ного ингибирования связывания тремя различными производными β -карболин-3-карболовой кислоты. Как видно из табл. 2, значения

Таблица 2

Эффект производных β -карболин-3-карболовой кислоты ($\beta\text{ССЕ}$) на небензодиазепиновое связывание этилового эфира β -карболин-3-карболовой кислоты ($[^3\text{H}]\beta\text{ССЕ}$)*

Лиганд	IC_{50} , нМ	
	в присутствии Ag^+ (20 мкМ)	в присутствии Cu^{2+} (20 мкМ)
FG-7142	98.0 ± 6.2	—
$\beta\text{ССЕ}$	22.0 ± 2.2	31 ± 4.4
$\beta\text{ССМ}$	46.0 ± 5.3	—

Примечание. * Концентрация радиолиганда 4 нМ.

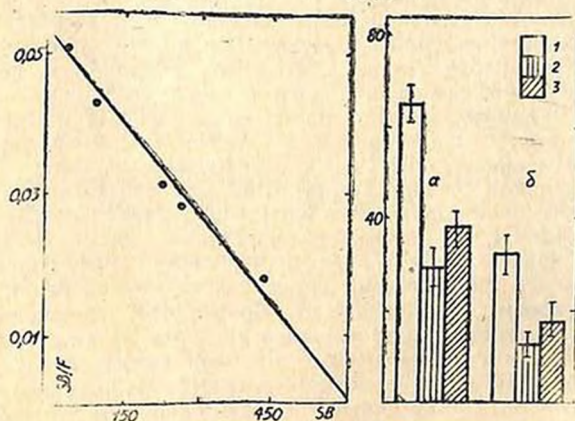


Рис. 4. График Скэтчарда для небензодиазепинового связывания этилового эфира β -карболин-3-карболовой кислоты с мембранами мозга крысы. По оси абсцисс—специфическое связывание (SB), пмоль/г ткани. По оси ординат—отношение специфического связывания (SB), пмоль/г к концентрации свободно-го лиганда F (нМ)

Рис. 5. Обратимость связывания этилового эфира β -карболин-3-карболовой кислоты с небензодиазепиновыми местами связывания в мозгу крысы в присутствии 20 мкМ Cu^{2+} (а) и 20 мкМ Ag^+ (б). По оси абсцисс: 1—общее связывание, 2—неспецифическое связывание в присутствии 10 мкМ β -карболин-3-карболовой кислоты, 3—инкубация пробы с этиловым эфиром β -карболин-3-карболовой кислоты в течение 50 мин с добавлением β -карболин-3-карболовой кислоты и фильтрованием через 5 мин

50%-ного ингибирования IC_{50} для β ССЕ в присутствии ионов серебра и меди различаются незначительно, что дает основание предполагать, что эти ионы инициируют связывание $[^3H]\beta$ ССЕ с одними и теми же местами связывания. Значения K и максимальная концентрация мест связывания для небензодиазепинового связывания, определенные из графика Скэтчарда (рис. 4), оказались следующие: $K_d = 105 \pm 10$ нМ, $B_{max} = 607 \pm 14$ пмоль/г ткани. Определенные в параллельных экспериментах аналогичные параметры для связывания $[^3H]\beta$ ССЕ с БД рецепторами составляют соответственно $3,3 \pm 0,4$ нМ и 81 ± 9 пмоль/г ткани. Таким образом, аффинность небензодиазепиновых мест связывания к $[^3H]\beta$ ССЕ на порядок ниже, чем у БД рецепторов, а их концентрация в мозгу на порядок превышает концентрацию БД рецепторов.

Небензодиазепиновое связывание характеризуется быстрой насыщенностью (равновесие в системе наступает за время порядка минуты) и обратимостью—при добавлении в пробы с радиолигандом 10 мкМ немеченого β ССЕ специфическое связывание резко падает (рис. 5).

Большой интерес представляет вопрос о характере распределения небензодиазепиновых мест связывания в различных тканях. Согласно полученным данным, специфическое небензодиазепиновое связывание $[^3H]\beta$ ССЕ в концентрации 3 нМ в мозжечке составляло $4,1 \pm 0,7$ пмоль/г, в то время как в коре головного мозга—соответственно $8,9 \pm 1,2$ пмоль/г. Специфическое связывание $[^3H]\beta$ ССЕ в печени и почках оказалось гораздо ниже, чем в коре головного мозга и составляло соответственно $2,1 \pm 0,4$ и $1,3 \pm 0,1$ пмоль/г, что позволяет говорить об относительной мозгоспецифичности эффекта.

На основании полученных результатов можно полагать, что активация ионами серебра (меди) связывания $[^3H]\beta$ ССЕ с небензодиазепиновыми местами связывания может иметь несколько возможных механизмов: во-первых, может происходить окислительно-восстановительный процесс с участием ионов серебра (меди) и лиганда, либо белка, связывающего $[^3H]\beta$ ССЕ. Во-вторых, возможно образование комплекса ионов серебра (меди) с белком или же с самим лигандом. Вследствие обоих процессов происходит резкое возрастание аффинности $[^3H]\beta$ ССЕ к небензодиазепиновым местам связывания. Приведенные данные о тканевой специфичности эффекта позволяют предположить, что модификация подвергается именно белок, а не лиганд. Вместе с тем, не исключено образование окисленной формы β ССЕ, представляющей собой фактически иной лиганд, взаимодействующий со своими специфическими местами связывания.

Таким образом, совокупность полученных данных позволяет заключить, что небензодиазепиновое связывание соответствует ряду критериев рецепторного связывания: оно относительно специфично для мозга, является обратимым, насыщенным, число мест связывания ограничено. При этом остается открытым вопрос об эндогенном лиганде этих мест связывания; возможно, что ими являются эндогенные β -карболины [7, 8]. Не исключено, что $[^3H]\beta$ ССЕ связывающий белок играет определенную роль в реализации фармакологических эффектов β ССЕ.

PROPERTIES OF SPECIFIC BINDING SITES FOR β -CARBOLINE-3-CARBOXYLIC ACID ETHYL ESTER DIFFERENT FROM THE DIAZEPINE RECEPTORS IN RAT BRAIN

*MELIXETIAN M. B., KORNEYEV A. YA., SEREDENIN S. B.

*I. A. Orbell Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Armenia,
Yerevan

Institute of Pharmacology, USSR Academy of Medical Sciences, Moscow

Using the radioreceptor technique we have determined specific binding of [3 H]ethyl ester of β -carboline-3-carboxylic acid ([3 H]CCE) in the presence of 20 μ M AgNO₃ (CuSO₄) and 10 μ M diazepam in rat brain. Non-benzodiazepine binding of [3 H]CCE increase in the presence of ascorbic acid and chloride ions in the incubation medium at pH 7.4 and 0°. The binding is reversible, saturable and is relatively specific for the brain. Concentration of non-benzodiazepine binding sites in the brain is $B_{max} = 607 \pm 14$ pmol/g tissue and dissociation constant $K_d = 105 \pm 10$ nM, whereas parameters of [3 H]CCE binding with benzodiazepine receptors have the corresponding values equal to 81 ± 9 pmol/g and 3.2 ± 0.4 nM.

ЛИТЕРАТУРА

1. Korneyev A. Ya., Belonogoff O. B., Zuzin V. N. *Neu osci. Lett.*, v. 61, p. 279—284, 1986.
2. Honore T., Nielsen M., Braestrup C. *Life Sci.*, v. 35, p. 2257—2268, 1984.
3. Braestrup C., Nielsen M., Honore T. J. *Neurochem.*, v. 41, p. 454—465, 1983.
4. Pawlitz M., Rommelspacher H. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 147, p. 163—171, 1988.
5. Speth R., Wastek G. J., Tohson P. C., Yamamura H. J. *Life Sci.*, v. 22, p. 859—864, 1978.
6. Stephen J. Peroutka. *Biol. Psychiatry*, v. 20, p. 971—986, 1985.
7. Pena C., Medina J. H., Novas M. L., Paladini A. C., De Robertis E. *Neurobiology*, v. 83, p. 4952—4969, 1986.
8. Paul S. M., Marangos P. J., Skolnick P., Goodwin F. K. *L'Encephale*, v. VIII p. 131—144. 1982.

Поступила 20.III.1990



УДК 612.815.1:616—092/.9+615—092:615.711.1

РЕЦЕПТОРНЫЕ СИСТЕМЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС РАЗЛИЧНОЙ ТИПОЛОГИЧЕСКОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ ПРИ СТРЕССЕ, ДОБРОВОЛЬНОМ ПОТРЕБЛЕНИИ ЭТАНОЛА И СУБХРОНИЧЕСКОМ ПРИМЕНЕНИИ МЕБИКАРА И БЕФОЛА

КИРИАКОВ Г. В., РОЖАНЕЦ В. В., РУСАКОВ Д. Ю.,
КОЛОДКИНА И. Г., КАМПОВ-ПОЛЕВОВ А. Б., МАПСКИЙ А. И.,
ЛЕЖАВА Г. Г.

НИИ фармакологии АМН СССР, Москва

Изучено влияние хронического психогенного стресса на добровольное потребление этанола, а также на характеристики бензодиазепиновых рецепторов (БДР), β -адренорецепторов (β -АР) и активность аденилатциклазы (АЦ) головного мозга крыс, высокоактивных (ВА) и низкоактивных (НА) в тесте неизбежаемого плавления. Разделение крыс в этом тесте позволяет выявить группу (ВА животные), в которой хронический психогенный стресс приводит к увеличению потребления алкоголя. При этом только у этих крыс алкоголь предотвращает увеличение относительного веса надпочечников, вызываемое стрессом. У обоих типов животных стрессирование сопровождается десенситизацией изучаемых рецепторов и АЦ. Потребление этанола предотвращает развитие субчувствительности β -АР, но не уменьшение активности изопротеренолчувствительной АЦ у ВА животных, в то время как у НА крыс эффект алкоголя наблюдается в отношении лишь базальной активности АЦ. Можно предположить, что характер влияния стресса на потребление этанола у ВА животных определяется чувствительностью их адренергической системы к воздействию алкоголя.

Субхроническое введение мебикара приводит к уменьшению потребления этанола в группе лишь ВР крыс, а бефола—только в группе НА животных. Анализ изменений концентраций β -АР после применения данных препаратов подтверждает роль адренергической системы в механизмах алкогольной мотивации ВА, но не НА крыс.

Участие БДР и β -АР рецепторов в формировании реакции на стресс доказано многочисленными исследованиями [1—5]. Известно кроме того, что на фоне стресса возможно также и увеличение добровольного потребления крысами раствора этанола, связанное, как считают, с его транквилизирующими свойствами [6], которые, в свою очередь, опосредуются ГАМК-бензодиазепиновым рецепторным комплексом [7]. Показано, что такое влияние стресс оказывает не на всех животных гетерогенной популяции [8]. Возникают следующие вопросы: какими типологическими особенностями экспериментальных животных может определяться способность стресса индуцировать у них алкогольную мотивацию, и не связаны ли различные эффекты стресса на добровольное потребление этанола с неоднознач-

ными реакциями на алкоголь и стресс БДР, β -АР и соответствующей АЦ у этих типов животных.

Целью настоящей работы явилось изучение действия хронического психогенного стресса на потребление этанола у животных с различными типами поведенческого реагирования с последующим исследованием характеристик БДР, β -АР и изопротеренолзависимой аденилатциклазы головного мозга этих же животных. Все указанные показатели исследовали также при субхроническом применении транквилизатора мекликара и атипичного антидепрессанта бефол (препаратов, используемых в клинике алкоголизма) у животных с алкогольной мотивацией, сформированной на фоне стресса.

Материалы и методы

Опыты проводили на беспородных крысах-самцах массой 200—250 г.

Поведенческое типирование животных проводили в условиях неизбежного плавания по методике, предложенной нами ранее [9]. Для эксперимента отбирали ВА животных, у которых время иммобилизации в тестовых условиях составило менее 120 с за 600 с наблюдения и НА крыс, у которых общее время иммобилизации превышало 300 с.

Отбор НА и ВА крыс проводили по результатам двойного тестирования с интервалом в 24 ч. Затем животных обоих типов подвергали хроническому психогенному стрессу, стохастически подкрепляя ударами тока световые сигналы [10]. Крыс содержали в индивидуальных клетках при избытке пищи и свободном доступе к воде и 15%-ному раствору этанола. Потребляющими этанол считали животных, в поилках которых уменьшение раствора спирта было больше 2 мл в сутки (самопроизвольная потеря жидкости в поилке в наших условиях составляла до 2 мл в сутки). Стрессирование прекращали на 15-й день, и с 16-го дня 2 раза в день в течение 10 суток потребляющим этанол животным обоих типов вводили внутривентрикулярно физиологический раствор (1 мл), мекликар (100 мг/кг) или бефол (1 мг/кг). Крыс контрольной группы декапитировали через 24 ч после последнего тестирования; группы не потребляющих и потребляющих этанол крыс—через 24 ч после последнего стресс-воздействия; животных, получавших физиологический раствор, мекликар и бефол—через 24 ч после последнего введения препаратов. Выраженность стресс-реакции оценивали по относительной массе надпочечников (мг/кг массы животного). Во всех группах обоих типов животных изучали состояние БДР, β -АР и сопряженной с ними АЦ чистой фракции синаптических мембран головного мозга.

Чистую фракцию синаптических мембран выделяли центрифугированием в градиенте сахарозы [11], объединяя попарно мозги крыс одной группы (каждая группа состояла из 8 крыс). В каждом полученном мембранном препарате изучали специфическое связывание [3 H]диазепама [12], [3 H]дигидроалprenолола [13], а также определяли скорость образования α -[32 P] сАМР из α -[32 P] АТР [14]. Параметры рецепторного связывания—величину K_d комплекса рецептор-лиганд и концентрацию рецепторов (B_{max}) определяли в координатах Скэтчарда для каждого мембранного препарата, а затем усредняли по группам. Изопротеренолчувствительную активность АЦ подсчитывали как разность скорости накопления α -[32 P] сАМР в

присутствии 10^{-6} М изопротеренола и в его отсутствие (базальная активность) для каждого препарата в отдельности, а затем также усредняли по группам. Достоверность различий оценивали с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Результаты проведенной работы показали, что 15-дневный стресс вызывал увеличение доли потребляющих этанол ВА крыс (45% без стресса и 58% на фоне стресса, $p=0,05$, точный метод Фишера) и практически не менял этого показателя у НА животных (79% без стресса и 73% на фоне стресса). Стресс-реакция была выражена ($p \leq 0,05$) у не потребляющих этанол животных обоих типов (относительная масса надпочечников в мг/кг: контроль— 84 ± 4 у ВА и 78 ± 9 у НА животных; крысы, не потребляющие этанол— 106 ± 9 у ВА и 107 ± 3 у НА животных). Для потребляющих алкоголь животных стресс-реакция была выражена лишь у НА крыс (относительная масса надпочечников у ВА животных 90 ± 4 мг/кг, а у НА— 127 ± 10 мг/кг, $p \leq 0,05$). Эффект препаратов на потребление этанола стрессированными крысами зависел от их типологической принадлежности: мебикар активен у ВА, а бефол—у НА животных (табл. 1).

Таблица 1

Влияние введения психотропных препаратов на количество потребляющих этанол животных разной типологической принадлежности

	Высокоактивные	Низкоактивные
Физиологический раствор	0.94 ± 0.06	0.87 ± 0.09
Мebикар	$0.59 \pm 0.10^{1,3,*}$	0.88 ± 0.08
Бефол	0.94 ± 0.06	$0.52 \pm 0.10^{1,2,*}$

Примечание. Приведены значения $M \pm m$ доли потребляющих этанол животных после 10-дневного введения (2 раза в день) физиологического раствора (1 мл), мебикара (100 мг/кг) или бефола (1 мг/кг) крысам, потреблявшим алкоголь на фоне стресса. 1, 2, 3—достоверные отличия соответственно от групп: физиологический раствор, мебикар и бефол животных одного типа, *—отличия от соответствующей группы иного типа животных. Здесь и в табл. 2—4— $p \leq 0,05$ по *t*-критерию Стьюдента.

В исходном состоянии у ВА и НА крыс не выявлено различий в количестве БДР, в то время как аффинность рецепторов к диазепаму у ВА животных была существенно выше (табл. 2). Хронический психогенный стресс приводил к уменьшению плотности рецепторов у не потребляющих этанол животных обоих типов, нивелируя исходные отличия в их аффинности. В противоположность этому, у потребляющих при стрессе алкоголь животных обоих типов не обнаружено уменьшения концентрации БДР, а их аффинность у ВА крыс оказалась уменьшенной. Введение физиологического раствора не влияло на параметры связывания $[^3H]$ диазепама с синаптическими мембранами потребляющих этанол животных. Мebикар вызывал уменьшение K_d БДР у обоих типов крыс, в то время как влияние на эти рецепторы бефола обнаружено лишь для НА животных.

Как видно из табл. 3, сродство к ди гидроалprenололу β -АР у интактных ВА крыс было больше, чем у НА животных при одинаковой плотности у них этих рецепторов. Во всех группах стрессированных животных, за исключением потребляющих этанол ВА крыс, наблюдалась редукция количества β -АР, которая у НА животных сопровождалась увеличением их сродства к ди гидроалprenололу. 10-

Таблица 2

Влияние стресса, потребления этанола и введения психотропных препаратов на характеристики бензодиазепиновых рецепторов мозга крыс разной типологической принадлежности

	Высокоактивные		Низкоактивные	
	$K_d(\text{нМ})$	$B_{\text{max}}\left(\frac{\text{фмоль}}{\text{мг белка}}\right)$	$K_d(\text{нМ})$	$B_{\text{max}}\left(\frac{\text{фмоль}}{\text{мг белка}}\right)$
Контроль	0.59 ± 0.10	1291 ± 126	$1.18 \pm 0.09^*$	1544 ± 165
Не потребляющие этанол	0.52 ± 0.06	869 ± 16^1	0.41 ± 0.01^1	875 ± 143^1
Потребляющие этанол	$1.69 \pm 0.14^{1,2}$	1407 ± 58^2	$1.21 \pm 0.09^{2,*}$	1591 ± 165^2
Физиологический раствор	$1.45 \pm 0.15^{1,2}$	1432 ± 60^2	1.34 ± 0.13^2	1684 ± 96^2
Мебикар	$1.19 \pm 1.12^{1,2,3}$	1401 ± 688^2	$0.84 \pm 0.10^{1,2,3,4}$	1791 ± 163^2
Бефол	$1.94 \pm 0.32^{1,2}$	1669 ± 242^2	$0.82 \pm 0.12^{1,2,3,4}$	$1338 \pm 56^{2,4,5}$

Примечание. Здесь и в табл. 3: 1—5—достоверные отличия соответственно от групп: контроль, не потребляющие этанол, потребляющие этанол, физиологический раствор, мебикар животных одного типа; *—достоверные отличия от показателей соответствующей группы иного типа.

Таблица 3

Влияние стресса, потребления этанола и введения психотропных препаратов на характеристики β -адренергических рецепторов мозга крыс разной типологической принадлежности

	Высокоактивные		Низкоактивные	
	$K_d(\text{нМ})$	$B_{\text{max}}\left(\frac{\text{фмоль}}{\text{мг белка}}\right)$	$K_d(\text{нМ})$	$B_{\text{max}}\left(\frac{\text{фмоль}}{\text{мг белка}}\right)$
Контроль	0.53 ± 0.06	220 ± 27	$0.87 \pm 0.12^*$	271 ± 22
Не потребляющие этанол	0.42 ± 0.03	113 ± 6^1	$0.24 \pm 0.02^{1,*}$	97 ± 18^1
Потребляющие этанол	0.66 ± 0.06^2	234 ± 19^2	$0.34 \pm 0.06^{1,*}$	$130 \pm 22^{1,*}$
Физиологический раствор	0.56 ± 0.09	181 ± 17^2	0.41 ± 0.08^1	146 ± 16^1
Мебикар	$0.98 \pm 0.11^{1,2,4}$	$342 \pm 39^{1,2,3,4}$	$0.42 \pm 0.14^{1,*}$	$241 \pm 47^{1,3,4}$
Бефол	$0.33 \pm 0.03^{1,3,5}$	166 ± 33^5	0.43 ± 0.10^1	$176 \pm 14^{1,2}$

дневное введение физиологического раствора не меняло состояния β -АР как у ВА, так и у НА крыс. Лечение мебикаром, но не бефолом, вызывало увеличение концентрации этих рецепторов у обоих типов животных. Препараты оказывали противоположное влияние и на аффинность рецепторов ВА крыс.

Данные по изучению базальной и изопротеренолчувствительной активности АЦ не показали существенных отличий этого фермента у крыс разной типологической принадлежности (табл. 4). У крыс обоих типов, подвергнутых хроническому стрессированию, но не потребляющих при стрессе алкоголь, снижалась базальная активность АЦ. У ВА животных, потребляющих при стрессе этанол, падала и активность изопротеренолстимулируемой АЦ. У НА крыс как базальная,

Таблица 4

Влияние стресса, потребления этанола и введения психотропных препаратов на активность изопротеренолчувствительной аденлатциклазы мозга крыс разной типологической принадлежности

	Высокоактивные		Низкоактивные	
	Базальная активность	Изопротеренол-чувствительная активность	Базальная активность	Изопротеренол-чувствительная активность
Контроль	109 ± 21	14 ± 3	82 ± 30	15 ± 5
Не потребляющие этанол	60 ± 8 ¹	21 ± 6	35 ± 7*	11 ± 2
Потребляющие этанол	61 ± 6 ¹	7 ± 1 ^{1,2}	95 ± 23 ²	13 ± 4
Физиологический раствор	129 ± 11,2,3	6 ± 1,2	27 ± 31,3	27 ± 42,3*
Мебикар	101 ± 29,3,4	36 ± 12,3,4	149 ± 122,3,4	28 ± 54,3
Бефол	28 ± 31,2,3,5	2,5 ± 21,3,4	12 ± 214,5*	20 ± 7

Примечание. Данные приведены в пмоль сАМР/мг белка/мин; 1—5—достоверные различия соотношения от групп: контроль, не потребляющие этанол, потребляющие этанол, физиологический раствор, мебикар животных одного типа; *—отличия от соответствующей группы иного типа животных.

так и изопротеренолзависимая активность АЦ при потреблении алкоголя на фоне стресса не отличалась от контрольной. Через 10 дней в группах крыс, получавших физиологический раствор, наблюдалось значительное уменьшение базальной активности АЦ, сопровождающееся у НА крыс увеличением чувствительности к изопротеренолу. Мебикар восстанавливал базальную активность у обоих типов животных, а у ВА крыс нормализовал и стимуляцию АЦ изопротеренолом. Бефол, в свою очередь, увеличивал активность лишь сопряженной с β -АР АЦ у ВА животных, не восстанавливая у них базальной активности. В противоположность этому у НА крыс лечение этим препаратом корригировало как базальный, так и чувствительный к изопротеренолу уровень активности АЦ.

Ранее рядом исследователей [15, 16] также отмечались схожие изменения базальной активности АЦ при стрессе и введении различных психотропных препаратов. На наш взгляд, одной из причин наблюдаемых отличий базальной активности АЦ в разных группах может являться различное содержание в соответствующих мембранных препаратах эндогенных стимуляторов этого фермента (норадреналина, дофамина и др.). Присутствием разных концентраций норадреналина в используемых мембранных препаратах могут объясняться и полученные отличия кажущейся аффинности β -АР к антагонисту (дигидроалprenололу), которые могут возникать и за счет изменений текучести мембран в разных группах. Микровязкостью мембран может модулироваться и сопряжение АЦ с β -АР [17]. Изменения изопротеренолчувствительной активности АЦ, как видно из наших

данных (табл. 3, 4), не всегда сопровождаются соответствующими изменениями плотности β -АР. Это свидетельствует о разном сопряжении рецептора с изученной эффекторной системой в разных группах.

Результаты проведенного исследования показали, что у не потребляющих этанол при стрессе животных обоих типов развивается десенситизация изученных рецепторов и АЦ (табл. 2—4). Различные виды стресса, как известно, могут приводить к уменьшению концентрации БДР [1—3]. Неоднократно описана и субчувствительность β -АР и сопряженной с ними АЦ головного мозга в ответ на усиление секреции катехоламинов при стрессовых воздействиях [4, 5]. Сообщалось также о десенситизации БДР, β -АР и АЦ у ВА и НА животных, не находившихся в контакте с алкоголем и подвергнутых такому же психогенному стрессу, как и в настоящей работе [16]. Принимая все это во внимание, можно сделать вывод, что отличия, выявленные в нейрохимических характеристиках головного мозга животных, потребляющих и не потребляющих этанол при стрессе, отражают не те индивидуальные особенности, которые определяют отношение к алкоголю, а само влияние этанола на эти параметры.

Таким образом, полученные данные позволяют сделать заключение о выраженности антистрессового действия алкоголя у ВА животных, так как потребление ими этанола в период стресса предотвращало и увеличение массы надпочечников, и уменьшение количества БДР и β -АР. По-видимому, именно этим можно объяснить увеличение доли ВА крыс, потребляющих этанол при хроническом стрессировании. Возможно, что чувствительность к антистрессовым эффектам алкоголя ВА животных связана с выявленной исходно большей аффинностью БДР их головного мозга при одинаковой плотности этих рецепторов у обоих типов крыс (ранее мы показали, что анксиолитические эффекты малых доз этанола реализуются с участием ГАМК-бензодиазепинового рецепторного комплекса [7]). Большую чувствительность бензодиазепиновой системы к этанолу у ВА животных отражает также и уменьшение кажущейся аффинности их БДР при потреблении алкоголя. Этот эффект может являться проявлением увеличенной продукции эндогенных лигандов БДР под влиянием этанола у ВА крыс. Можно предположить, что с исходной гипочувствительностью БДР у НА животных связана и практическая неэффективность у них мебикара, действие которого также опосредуется ГАМК-бензодиазепиновым рецепторным комплексом [18]. В основе различной эффективности препаратов может лежать и неодинаковое влияние их на изученные нейрохимические системы. Так, мебикар, но не бефол, частично нормализовал аффинность БДР у ВА животных, то есть животных, у которых именно он подавлял потребление этанола. В то же время, активный у НА животных препарат бефол уменьшал у них, но не у ВА крыс, концентрацию БДР. Разнонаправленное влияние бефол и мебикар оказывали также на количество β -АР и их родство к диэтилоэтилпирилолону у ВА крыс. Способность препаратов корригировать базальную активность АЦ полностью совпадает с их воздействием на потребление этанола разными типами животных.

Следует особо подчеркнуть, что потребление этанола предотвращает развитие субчувствительности β -АР, но не уменьшение активности изопротеренолчувствительной АЦ у ВА животных, в то время как у НА крыс эффект алкоголя наблюдается в отношении лишь базальной активности АЦ. Можно предположить, что характер влия-

ния стресса на потребление этанола у ВА животных связан с тем, что в отличие от НА крыс, их адренергическая система чувствительна к действию алкоголя. В свою очередь, субхроническое введение мебикара также лишь у ВА животных приводит к достоверному увеличению концентрации β -АР выше контрольного уровня. Обращает на себя внимание тот факт, что и этанол, и мебикар, подавляющий его потребление у животных этого типа, действуют в этом отношении однонаправленно.

Таким образом, анализ действия стресса, этанола и использованных препаратов на концентрацию β -АР позволяет предположить, что алкогольная мотивация у ВА животных связана с чувствительностью адренергической системы головного мозга к этанолу и эффективно в данных условиях мебикару. В случае НА животных прямой связи между алкогольной мотивацией и состоянием адренергической системы не наблюдается.

BRAIN RECEPTOR SYSTEMS IN RATS WITH DIFFERENT TYPOLOGICAL TAXONOMY DURING STRESS: VOLUNTARY ETHYL ALCOHOL CONSUMPTION AND SUBCHRONIC TREATMENT WITH BEFOL AND MEBICAR

KIRIAKOV G. V., ROZHANETS V. V., RUSAKOV D. YU., KOLODKINA N. G.,
KAMPOV-POLEVOI A. B., MAISKY A. I., LEZHAVA G. G.

Institute of Pharmacology, USSR Academy of Medical Sciences, Moscow

The effect of the psychogenic stress on the voluntary ethanol consumption, brain benzodiazepine receptors (BDR), beta-adrenoreceptors (β -AR) and the activity of coupled adenylate cyclase (AC) were studied in rats, with high activity (HA) and low activity (LA) in the forced swimming test. The division of rats in this test made it possible to identify a group of animals in which the chronic psychogenic stress led to increased alcohol consumption. Ethyl alcohol intake prevented the stress-induced increase in the relative weight of adrenal glands only in HA rats. Stress resulted in desensitization of the studied receptors and AC in both types of animals. Ethanol intake prevented the development of subsensitivity of β -AR, but did not affect the decreased activity of the isoproterenol-sensitive AC in the HA animals, while in the LA rats the alcohol consumption affected only basal AC activity. We propose that the effect of the stress on ethanol consumption in the HA animals is determined by the sensitivity of their adrenergic system to the influence of alcohol intake.

Subchronic administration of Mebicar decreased ethanol consumption only in the HA group of rats and of Befol—only in the LA group. Analysis of changes in concentrations of β -AR after the administration of these drugs confirms the role of the adrenergic system in the mechanisms of alcohol motivation in HA and not in LA rats.

ЛИТЕРАТУРА

1. Braestrup C., Nielsen M., Nielsen E. B. *Psychopharmacology*, v. 65, p. 273—277, 1979.
2. Ledoux J. E., Sahaguchi A., Reis D. J. *Brain Res.*, v. 216, p. 399—408, 1983.
3. Petkov V. V., Yanev S. *Pharm. Res. Commun.*, v. 14, p. 739—744, 1982.

4. Вальдман А. В. — В кн.: Нейрофармакология антидепрессантов (под ред. А. В. Вальдмана), с. 9—50, М., 1984.
5. Stone E. A. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 7, p. 503—509, 1983.
6. Буров Ю. В., Ведерникова Н. Н. Нейрохимия в фармакология алкоголизма, М., Медицина, 1985.
7. Кириаков Г. В., Рожанец В. В., Русаков Д. Ю., Малин К. М., Вальдман А. В. — В кн.: Медико-биологические проблемы алкоголизма (Материалы Всесоюзной конф., Воронеж, 1987), с. 45—50, М., 1988.
8. Rockman G. E., Hall A., Hong J., Glavin G. B. *Life Sci.* v. 40, p. 1245—1252, 1987.
9. Каклюв-Полесей А. Б. — В кн.: Фармакология экспериментального алкоголизма (под ред. Ю. В. Бурова), с. 130—135, М., 1982.
10. Данчев Н. Д., Рожанец В. В., Вальдман А. В. Бюл. экспер. биол., С1, N1, с. 57—59, 1986.
11. De Robertis E. et. al. *J. Neurochem.*, v. 9, p. 23—35, 1962.
12. Рожанец В. В., Русаков Д. Ю., Данчев Н. Д., Вальдман А. В. Бюл. экспер. биол., т. 96, N7, с. 46—48, 1983.
13. Byland G. B., Snyder S. J. *Mol. Pharmacol.*, v. 12, p. 568—575, 1976.
14. Bilezikian J. P., Dornfeld A. M., Gammon D. E. *Biochem. Pharmacol.*, v. 27 p. 1445—1454, 1978.
15. Newman M. E., Solomon H., Lerer B. J. *Neurochem.* v. 46, p. 1667—1669, 1986.
16. Valdman A. V., Rozhants V. V. In: *Receptors and Biotechnological Approaches* (ed. by M. E. Vartanjan), p. 62—81, University Press, 1988.
17. Bakardjeva A., Galla H., Helmerich E. *Biochemistry*, v. 18, p. 3016—3023, 1979.
18. Рожанец В. В., Чахбра К. К., Данчев Н. Д. и др. — Бюл. экспер. биол., N1, с. 40—42, 1986.

Поступила 20.XII.1989



УДК 616.85—02:616.831—008.9—085.214—092.9

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ НЕЙРОХИМИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В СТРУКТУРАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ НЕВРОЗЕ

НЕРУШ П. А.

Днепропетровский государственный медицинский институт

Изучено влияние диазепама (0,5 мг/кг. внутривенно) на содержание медиаторных аминокислот (аспартата, ГАМК, глицина, глутамата и таурина) и свободных жирных кислот (миристиновой, пентадекановой, пальмитиновой, стеариновой, олеиновой, линолевой и арахидоновой) в значительно различающихся филогенетически отделах гиппокампа-ретикуло-неокортикальной системы мозга и полосатом теле при невротическом состоянии у крыс. Установлено, что экспериментальный невроз у животных вызывал повышение уровня глутамата в гиппокампе и полосатом теле, а также ГАМК в коре головного мозга, гиппокампе и полосатом теле. Это сопровождалось увеличением количества ненасыщенных жирных кислот (арахидоновой и линолевой) в коре головного мозга. Уровень линолевой кислоты увеличился также и в подкорковых образованиях головного мозга.

Диазепам снижал содержание ГАМК в ряде структур мозга, отмечалось снижение глутамата, что коррелировало и с показателями жирнокислотного состава.

Согласно гипотезе, в патогенезе неврозов важная роль отводится церебральной гипоксии [1].

Нарушение мозгового кровообращения по современным представлениям сопровождается избыточным накоплением нейромедиаторных возбуждающих аминокислот—глутамата и аспартата [2] и развитием гиперфункции медиаторной системы возбуждающих аминокислот. В настоящее время существенно возрос интерес к роли возбуждающих аминокислот в патогенезе неврологических и психических заболеваний [2—7].

Исследованиями показано, что образование перекисей и свободных гидроксильных радикалов сопровождалось высвобождением возбуждающих аминокислот из срезов гиппокампа, преинкубированных с [^3H]Д-аспартатом, что вызывало гибель нейронов при анаксии и ишемии [8].

Установлено также, что активация N-метил-D-аспартатчувствительных глутаматных рецепторов стимулирует выделение арахидоновой кислоты в первичной культуре гранулярных клеток мозжечка [9]. Причем глутамат и аспартат были более эффективны по сравнению с N-метил-D-аспартатом, каннабисом и квинквалатом.

Поэтому представляло интерес изучить изменение количества нейромедиаторных аминокислот и свободных жирных кислот в различных структурах головного мозга в условиях невротического состояния крыс на фоне фармакологической коррекции.

Материалы и методы

Опыты проведены на 62 крысах-самках линии *Wistar* массой 170—190 г. Для формирования невротического состояния применяли модель нейрогенного стресса «конфликт афферентных возбуждений», основанную на возникновении у животного состояния неопределенности, тревоги и страха при вероятностном подкреплении звуковых и световых стимулов неизбежаемым электрическим раздражением пороговой величины [10]. С этой целью применяли сконструированную нами электродную клетку с программирующим устройством.

Содержание нейромедиаторных аминокислот (аспартата, ГАМК, глутамин, глутамат, таурин) в коре головного мозга, гиппокампе, полосатом теле и среднем мозгу определяли с помощью автоматического анализатора Т-339 по методике, описанной нами ранее [11].

Количественное определение свободных жирных кислот в этих же образованиях измеряли газохроматографическим методом с помощью хроматографа «Schimadzu» (Япония) по методу Burchfield, Storre [12].

Действие диазепама (0,5 мг/кг, внутривенно) изучали на фоне сформированного невроза через 40 мин после введения препарата. Результаты исследований обработаны статистически [12].

Результаты и обсуждение

Было установлено, что состояние невроза характеризовалось разлитием дисбаланса медиаторных аминокислот в изучаемых нами мозговых образованиях (табл. 1). Это проявлялось повышением концентрации ГАМК в коре головного мозга, гиппокампе и полосатом теле соответственно на 56, 29 и 27% ($p < 0,01, 0,05$ и $0,001$).

Таблица 1
Влияние диазепама (0,5 мг/кг) на содержание нейромедиаторных аминокислот в структурах ЦНС при неврозе (моль/100 г · 10⁻³)

Структур- Амино- кислота	Невроз (n=5)					Невроз + диазепам n 10)				
	тау- рин	ГАМК	гли- цин	спар- тат	глута- мат	тау- рин	ГАМК	гли- цин	аспа- рат	глутамат
КГМ	М 5,53	2,55**	1,06*	3,54	9,27	4,80	1,5**	1,05	3,19	8,95
	m 0,23	0,33	0,04	0,10	0,60	0,29	0,9	0,12	0,15	0,30
	% -10	+56	20	-7	-5	-13	-39	-1	-10	-4
Р	М 5,41	2,78*	1,32	2,75	10,66*	4,83	1,73**	1,02*	2,68	7,82**
	m 0,35	0,32	0,09	0,13	0,66	0,19	0,13	0,05	0,14	0,4
	% -1	+29	+17	+2	-28	-11	-38	-23	-3	-27
ПТ	М 6,21	2,22**	0,77	1,86	9,36*	5,54	2,09	0,87	2,45**	8,69**
	m 0,34	0,10	0,04	0,08	0,40	0,34	0,27	0,09	0,14	0,46
	% +12	+27	-11	+4	+25	11	-6	+14	+32	-29
СМ	М 1,75**	1,92	3,23	2,54	6,36	2,06	1,79	3,43	2,86	5,97
	m 0,07	0,17	0,20	0,09	0,18	0,11	0,18	0,13	0,16	0,15
	% -25	+3	-13	-8	-0,5	+16	-7	-9	+13	-6

Примечание. Процент изменений приведен по отношению к контролю, для невроза—по отношению к интактной группе, для невроза диазепам—по отношению к неврозу. Здесь и в табл. 2, 3 * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. КГМ—кора головного мозга, Г—гиппокамп, ПТ—полосатое тело, СМ—средний мозг.

Таблица 2
Изменение уровня свободных жирных кислот в различных отделах головного мозга крыс при неврозе (мМ/г ткани)

Группы		Контроль (n=7)						Невроз (n=7)							
Свободные жирные кислоты		миристиновая	пентадекановая	пальмитиновая	стеариновая	олеиновая	линолевая	радионическая	миристиновая	пентадекановая	пальмитиновая	стеариновая	олеиновая	линолевая	арахидиновая
КГМ	М % 0,01	1,06 0,18	7,19 0,15	12,46 3,25	13,56 1,4	0,34 0,03	0,43 0,06	0,03* 0,01 -57	0,79* 0,01 -26	7,68 0,75 +7	7,22* 0,62 -42	14,65 0,53 +8	0,68* 0,10 +100	1,06** 0,15 +120	
Г	М % 0,001	0,18 0,04	5,35 0,21	7,66 0,50	18,84 2,72	0,29 0,04	2,08 0,19	0,02** 0,001 +100	0,22 0,02 +22	6,36 0,67 +19	8,79 1,13 +15	16,69 1,90 -11	0,70** 0,11 +162	1,36* 0,18 -34	
ПТ	М % 0,01	0,07 0,01	6,99 0,07	9,50 0,61	17,06 0,59	0,36 0,1	2,18 0,64	0,09* 0,01 +50	0,04* 0,01 -43	6,77 0,53 -3	9,12 1,13 -4	21,80* 2,60 -21	0,54* 0,09 +50	1,56* 0,18 -23	
СМ	М % 0,001	0,58 0,07	5,80 0,63	18,9 3,23	32,29 3,3	0,50 0,10	4,45 0,33	0,04*** 0,005 -89	0,05*** 0,004 -91	5,81 0,64 +0,2	8,25* 1,13 -56	30,96 8,83 -4	0,62* 0,04 +64	1,95** 0,21 -56	

В подкорковых структурах головного мозга—гиппокампе и полосатом теле—установлено повышение количества глутаминовой кислоты на 28 и 25% ($p < 0,05$). Содержание глицина в коре головного мозга снижалось на 20% ($p < 0,05$). В среднем мозгу отмечалось снижение таурина на 25% ($p < 0,01$).

Изменение количественных показателей тормозных и возбуждающих нейромедиаторных аминокислот при неврозе сопровождалось нарушением и жирнокислотного спектра липидов в этих же структурах (табл. 2). Наблюдения этой серии показали, что состояние невроза сопровождалось разнонаправленным изменением жирных кислот в различных образованиях головного мозга. Причем в коре головного мозга отмечали резкое нарастание количества арахидоновой (+120%, $p < 0,01$) и линолевой (+100%, $p < 0,05$) кислот.

В подкорковых образованиях конечного мозга (гиппокампе, полосатом теле, а также в среднем мозгу) содержание арахидоновой кислоты снижалось от 28 до 56 в зависимости от структуры. Изменения линолевой кислоты в структурах мозга были однонаправленными и характеризовались ее повышением, причем в большей степени в коре головного мозга (+100%, $p < 0,05$) и гиппокампе (+162%, $p < 0,01$). Менее выраженными, но статистически значимыми они были в полосатом теле (+50%, $p < 0,05$) и среднем мозгу (+64%, $p < 0,05$).

В среднем мозгу, в отличие от других отделов, наиболее значительным было снижение миристиновой, пентадекановой и стеариновой кислот.

Применение диазепама (табл. 1) вызывало снижение ГАМК в коре головного мозга на 39 и в гиппокампе на 38% ($p < 0,01$). Как видно из табл. 1, под влиянием диазепама снижалось и содержание глицина в гиппокампе на 23% ($p < 0,05$).

Не менее важным представляется снижение количества глутаминовой кислоты в гиппокампе на 27% ($p < 0,01$), полосатом теле на 29% ($p < 0,001$), а также повышение аспартата в полосатом теле.

Результаты, характеризующие действие диазепама на содержание свободных жирных кислот в головном мозгу при неврозе (табл. 3), свидетельствуют о том, что препарат в той или иной степени из-

Таблица 3

Влияние диазепама (0,5 мг/кг) на содержание свободных жирных кислот в различных отделах головного мозга при неврозе ($\mu\text{М/г}$ ткани)

Структура	миристи- новая	пентаде- кановая	пальми- тиновая	стеар- иновая	олеи- новая	линоле- вая	арахи- ди- новая
КГМ	М 0,01*** м 0,001 % -66	0,82 0,14 +4	7,34 0,31 -5	5,30 0,87 -31	9,23* 1,73 -37	0,46 0,20 -33	0,72 0,07 -32
Г	М 0,06 м 0,01 % +20	0,06 0,01 -73	6,89 0,78 +8	9,06 0,98 +3	24,04** 1,79 +44	0,71 0,03 -7	1,34 0,14 -3
ПТ	М 0,12 м 0,004 % +33	0,04 0,01 -20	6,77 0,53 +13	9,12 1,13 +8	21,9 2,60 +10	0,61 0,08 +13	1,46 0,16 +6
СМ	М 0,05 м 0,005 % +25	1,06*** 0,17 +21раз	5,86 0,76 +1	9,14 0,20 -26	27,62 7,39 -10	0,85 0,10 +3	3,56** 0,35 -83

менял их содержание. Установлено, что диазепам в этих условиях вызывал существенные изменения в содержании свободных жирных кислот. При этом в коре головного мозга по сравнению с чистым неврозом снижалось содержание арахидоновой кислоты при одновременном ее повышении в среднем мозгу. Известно, что арахидоновая кислота принимает активное участие в метаболических процессах в головном мозгу, является субстратом в биосинтезе простагландинов. Арахидоновая кислота входит в состав большинства фосфолипидов мозга, преимущественно диацилглицеролфосфоинозитидов [4].

В коре головного мозга имело место также снижение олеиновой и линолевой кислот. Сравнительный анализ жирнокислотного состава в изучаемых мозговых образованиях показал, что диазепам на фоне невроза в гиппокампе вызывал противоположные изменения со стороны олеиновой и линолевой кислот, и практически не изменялось содержание арахидоновой кислоты по сравнению с группой чистого невроза. В полосатом теле, в отличие от других структур, диазепам приближал жирнокислотный спектр липидной фракции к показателям интактных животных. В среднем мозгу, кроме арахидоновой кислоты, выраженные изменения отмечались и со стороны пентадекановой.

Устойчивая патология высшей нервной деятельности у крыс вызывала нарушения системы медиаторных аминокислот и жирнокислотного состава гиппокампа-ретикуло-неокортикальной системы мозга и полосатого тела. Развитие экспериментального невроза вызывает снижение скорости локального мозгового кровотока [1] и таким образом способствует гипоксии отдельных участков мозга и, в первую очередь, коры головного мозга, которая более чувствительна к ишемии. В связи с этим нарушение высшей нервной деятельности при неврозе, как нами установлено, сопровождается количественными различиями в метаболизме филогенетически значительно различающихся отделов мозга.

Выявлено, что невротическое состояние у крыс сопровождалось увеличением содержания глутамата в гиппокампе и полосатом теле и ГАМК—в коре головного мозга, гиппокампе и полосатом теле. Это может свидетельствовать о повышении в этих условиях функциональной активности данных нейромедиаторных систем.

Известно, что в условиях ишемии мозга имеет место активация NMDA-рецепторного Ca^{2+} -ионофорного комплекса, которая развивает нейродеструктивные изменения нейронального аппарата в ЦНС, что сопровождается повышением внутриклеточной концентрации Ca^{2+} [15, 16].

О количественных особенностях метаболизма изучаемых мозговых систем свидетельствуют также изменения показателей ненасыщенных жирных кислот. Можно предположить о существовании определенной зависимости изменений в системе возбуждающих аминокислот и обмене липидов, наблюдаемых в условиях невротического состояния.

Диазепам при неврозе вызывал снижение уровня ГАМК в ряде структур мозга, отмечалось также снижение глутамата, что коррелировало с показателями жирных кислот.

PHARMACOLOGICAL CORRECTION OF NEUROCHEMICAL CHANGES IN RAT CEREBRAL STRUCTURES IN EXPERIMENTAL NEUROSIS

NERUSH P. A.

Medical Institute, Dnepropetrovsk

The influence of diazepam (0,5 mg/kg, i. p.) on the contents of mediator amino acids (aspartate, GABA, glycine, glutamate and taurine) and free fatty acids (myristic, pentadecanoic, palmitic, stearic, olein, linoleic and arachidonic) in considerably varying phylogenetically sections of hippocampo-reticulo-neocortex brain system and striate body in rats with neurotic condition was studied.

It was revealed that experimental neurosis in animals was accompanied by increased level of glutamate-ergic system in hippocamp and striate body and GABA-ergic in cortex, hippocamp and striate body. It was accompanied by increasing of unsaturated fatty acids (arachidonic and linoleic) in cerebral cortex. The level of linoleic acid was also increased in subcortex.

Diazepam decreased the content of GABA (excluding striate body) and glutamate below the initial level in intact animals that correlated with indications of fatty acid composition.

ЛИТЕРАТУРА

1. Айрапетянц М. Г., Вейн А. М. Неврозы в эксперименте и в клинике М., Наука, 1982.
2. Kemp J. A., Foster A. C., Gill R., Woodruff G. N. Trends in Pharmacol. Sci., v. 8, № 11, p. 414—415, 1987.
3. Возбуждающие аминокислоты как нейромедиаторы (под ред. К. С. Раевского). — Физиология человека и животных, т. 36, с. 184, Итоги науки и техники, 1989.
4. Раевский К. С., Георгиев В. П. Медиаторные аминокислоты: нейрофармакологические и нейрохимические аспекты, М., Медицина—София. Медицина и физкультура, 1986.
5. Engelsen B. Acta Neurol. Scand., v. 74, p. 337—355, 1986.
6. Meldrum B. S. Clin. Sci., v. 68, p. 113—122, 1985.
7. Meldrum B. S., Evans M. C., Swan Y. H., Simon R. P. Med. Biol., v. 65, № 2—3, p. 153—157, 1987.
8. Pellegrini-Giampietro D. E., Cherict G., Carlà V., Moroni F. Pharmacol. Res. Commun., v. 20 Suppl. № 2, p. 295, 1988.
9. Lazarewicz Y. W., Wroblewski Y. T., Palmer M. E., Costa E. Neuropharmacology, v. 27, № 7, p. 765—769, 1988.
10. Ведяев Ф. П., Воробьева Т. М. Модели и механизмы эмоциональных стрессов, Киев, Здоров'я, 1983.
11. Неруш П. А., Крауз В. А., Бородкин Ю. С., Вестн. АМН СССР, № 9, с. 54—56, 1985.
12. Burchfield H. P., Storrs E. B. Biochemical Applications of Gas Chromatography, Academic Press, N. Y., 1962.
13. Минцер О. П., Угаров Б. Н., Власов Е. В. Методы обработки медицинской информации, Киев, Вища школа, 1982.
14. Мартикян А. Р., Вартанян Г. С., Карагезян К. Г. Нейрохимия, т. 3, № 3, с. 288—290, 1984.
15. Козловский В. Л., Гейнисман Н. В., Прахье И. В. Фармакология и токсикология, т. 53, № 2, с. 27—29, 1990.
16. Meldrum B. S. Clin. Sci., v. 68, p. 113—122, 1985.

Поступила 22 VI.1991



О СВЯЗЫВАНИИ КАЛЬМОДУЛИНА С КОРОНАРОСУЖИВАЮЩИМИ ПЕПТИДАМИ ГИПОТАЛАМУСА

БАРХУДАРЯН Н. А., *ХОРВАТ Л., ГАЛОЯН А. А., *ОВАДИ Ю.

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

*Институт энзимологии ВАН, Будапешт

Используя метод ферментзависимого иммуносорбентного анализа (ELISA) было обнаружено, что коронаросуживающие пептиды гипоталамуса ингибируют образование иммунного комплекса кальмодулин-антитело путем связывания с кальмодулином, причем по сравнению с известным антагонистом кальмодулина—трифторперразином, исследуемые нейропептиды ингибируют образование иммунного комплекса в концентрации, меньшей на три порядка. Показано, что в присутствии нейропептидов изменяется чувствительность кальмодулина к трифторперразину. Обсуждается вопрос аллостерической регуляции кальмодулина коронаросуживающими пептидами гипоталамуса.

О влиянии кардиоактивных соединений гипоталамуса на активность Ca^{2+} -кальмодулинзависимых ферментов было сообщено Галояном и соавт. впервые в 1976 г. Было показано, что коронарорасширяющий нейрогормон «С» [1] и его множественные формы [2] являются ингибиторами ФДЭ циклических нуклеотидов. Впоследствии из кардиоактивной фракции гипоталамуса были выделены термостабильные пептидные факторы, вызывающие активацию кальмодулинчувствительной ФДЭ без участия Ca^{2+} и кальмодулина [3]. На основании полученных данных А. А. Галоян выдвинул концепцию о существовании в мозгу Ca^{2+} -независимой пептидной системы активации Ca^{2+} -кальмодулинзависимых ферментов [4—5].

Как сообщалось ранее [6], были выделены из гипоталамуса крупного рогатого скота 5 коронаросуживающих пептидных факторов (ПФ) с M_r от 3 до 7 кД. Было обнаружено, что и эти нейропептиды оказывают регуляторное воздействие на активность ряда Ca^{2+} -кальмодулинзависимых ферментов [7—8]. Было высказано предположение о том, что в молекулярном механизме этого воздействия кальмодулин играет важную роль [8]. Для выяснения этого вопроса представлялось целесообразным исследовать взаимоотношение кальмодулина с ПФ, и влияние Ca^{2+} на этот процесс.

Как известно, кальмодулин—это эволюционно консервативный белок—оказался универсальным акцептором Ca^{2+} , он участвует в большинстве регулируемых кальцием процессов в эукариотических клетках. Присоединение Ca^{2+} , приводящее к аллостерической активации кальмодулина, ведет к тому, что ранее свободный кальмодулин связывается в клетке с различными белками-мишенями и играет роль

190

медиатора во многих ферментативных реакциях и системах мембранного транспорта, активируемых Ca^{2+} [10—14].

Показано, что кальмодулин способен Ca^{2+} -зависимым способом связывать некоторые биологически активные пептиды (АКТГ, β -эндорфин, вещество Р и др.) [15—16]. Пептиды в зависимости от их химической структуры связываются с кальмодулином преимущественно через гидрофобные или ионные взаимодействия [17—18]. С кальмодулином связываются различные низкомолекулярные органические соединения, в их числе—лекарственные препараты, связывание которых с кальмодулином препятствует его взаимодействию с различными кальмодулинзависимыми ферментами [19—20] или модифицирует это взаимодействие [21].

В настоящей работе сообщается об исследовании влияния коронаросуживающих нейропептидов гипоталамуса на образование иммунокомплекса кальмодулин-антитело с помощью метода ферментзависимого иммуносорбентного анализа [22], который позволил установить, что коронаросуживающие нейропептиды гипоталамуса связываются с молекулой кальмодулина. Изучено влияние Ca^{2+} на этот процесс. Исследовано одновременное воздействие нейропептидов гипоталамуса и трифторперазина—известного антагониста кальмодулина на процесс образования иммунокомплекса кальмодулин-антитело.

Материалы и методы

Кальмодулин очищали из бычьего мозга до гомогенного состояния, используя аффинную хроматографию на трифторперазин-сефарозе-4В по методу Charbonneau и соавт. [23]. Кролики были иммунизированы 1-фтор-2,4-динитробензоатым производным бычьего кальмодулина по методу Wallace и соавт. [24]. Иммуноглобулиновую фракцию получали из антисыворотки, используя хроматографию на QAE-Сефадексе А-50 по методу Tijssen и соавт. [25]. Моноспецифические антитела против бычьего кальмодулина были получены с помощью аффинной хроматографии на кальмодулин-сефарозе-4В. Иммуноглобулиновая фракция была проведена несколько раз через колонку с кальмодулин-сефарозой, затем колонку тщательно промывали 0,05 М трис-солевым буфером, рН 8,0. Антитела элюировали с колонки 0,2 М глицин-НСl буфером, рН 2,7 и сразу же нейтрализовали 0,2 М трис-НСl буфером, рН 8,0. Затем антитела были диализованы против Na-бикарбонатного буфера, рН 9,6 и хранили при 4° в присутствии 0,2% NaN_3 .

В эксперименте по определению образования иммунокомплекса кальмодулин-антитело был использован метод непрямого ELISA с некоторыми модификациями по методу Van Eldik и соавт. [26]. Для иммобилизации кальмодулина на платы в лунки плат вносили по 100 мкл смеси раствора кальмодулина в 0,05 М Na-бикарбонатном буфере, рН 9,6 (концентрация раствора 2,5 мкг/мл) и платы инкубировали 18 ч при 4°. Затем после 3-кратного промывания фосфатно-солевым буфером (ФСБ), содержащим 0,05%-ный твин-20 (ФСБ-Т) в лунки плат вносили по 100 мкл смеси, содержащей пептидные факторы и антитела в концентрации 7,5 мкг/мл. Раствор смеси, приготовленный на основе ФСБ-Т, содержал также 0,1%-ную желатину. Платы инкубировали 2 ч при комнатной температуре. Затем, после 3-кратного промывания плат ФСБ-Т в лунки плат вносили по 100 мкл раствора анти-IgG, конъюгированного с пероксидазой хрена в

разведении 1:1000 и платы инкубировали 2 ч при комнатной температуре. Затем, после 3-кратного промывания плат ФСБ-Т в лунки плат вносили по 200 мкл смеси, содержащей H_2O_2 и *o*-фенилендиамина (смесь содержала 17 мг *o*-фенилендиамина и 10 мкл H_2O_2 , объем смеси 25 мл). Платы инкубировали 1 ч в темноте при комнатной температуре. Затем после фиксации содержимого лунок добавлением 50 мкл $2\text{N} \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$ наблюдали поглощение при 492 нм. Активность связанного с твердой фазой фермента прямо пропорциональна концентрации антител в исследуемом образце.

В работе использованы следующие реактивы: CNBr-активированная сефароза-4В, QAE-сефадекс А-50 («Pharmacia», Швеция), ЭГТА («Sigma», США), трифторперазин («Chinoin Pharmaceutical Co.», Венгрия).

Результаты и обсуждение

Было изучено влияние ПФ₅ на образование иммунокомплекса кальмодулин-антитело. Эксперименты показали, что ПФ₁₋₄ (рис. 1) в значительной степени (до 90% и более) ингибировали связывание антител с кальмодулином, а ПФ₅ лишь в очень незначительной

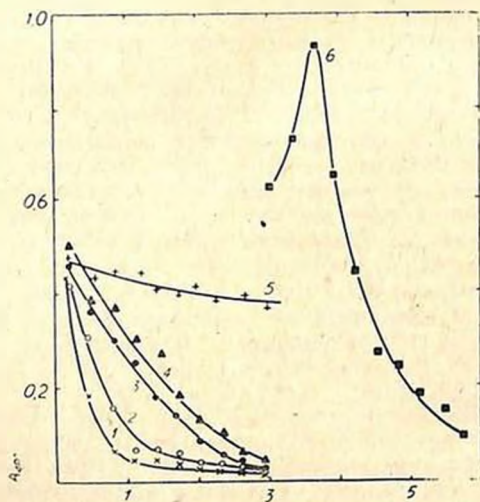


Рис. 1. Влияние пептидных факторов гипоталамуса (ПФ) и трифторперазина (ТФП) на образование иммунокомплекса кальмодулин-антитело. Был использован метод непрямого ELISA с применением кроличьих антител против бычьего кальмодулина. Кальмодулин иммобилизовали на платах в концентрации 2,5 мкг/мл. Антитела вносили в лунки плат в концентрации 7,5 мкг/мл. 1—ПФ₁; 2—ПФ₂; 3—ПФ₃; 4—ПФ₄; 5—ПФ₅; 6—ТФП. По оси абсцисс—концентрация ПФ в мкМ; по оси ординат—поглощение при A_{492} нм

степени подавлял образование иммунного комплекса. Концентрации, при которых ПФ₁₋₄ вызывали 50%-ное ингибирование образования иммунного комплекса (I_{50}), равны 2,5; 4,6; 15,8 и 31,6 нМ для ПФ₁, ПФ₂, ПФ₃ и ПФ₄ соответственно. При сравнении эффекта нейропептидов с эффектом классического антагониста кальмодулина—трифтороперазина (ТФП) видно (рис. 1), что ПФ₁₋₄ являются значительно более эффективными ингибиторами образования иммунного комплекса, чем ТФП [14]; они ингибируют образование иммунного комплекса в концентрации, на три порядка меньшей, чем ТФП. Причем необходимо отметить, что наблюдается определенная корреляция между ингибиторным эффектом ПФ и их величиной M_r . Так, ПФ₁ с M_r 3 кД является наиболее эффективным ингибитором, в то же время ПФ₅ с M_r 7 кД—наименее эффективен.

Были выдвинуты следующие альтернативные объяснения ингибиторного эффекта нейропептидов на образование иммунного комплекса: 1) пептиды связываются с молекулой кальмодулина и препятствуют его связыванию с антителами; 2) ПФ₁₋₄ являются фрагментами молекулы кальмодулина и, связываясь с антителами против бычьего кальмодулина, делают их недоступными для кальмодулина. Для выяснения механизма ингибирования образования иммунного комплекса под влиянием ПФ был проведен эксперимент, в котором вместо кальмодулина на пластах были иммобилизованы антитела против бычьего кальмодулина. Использовали 2 концентрации антител—5 мкг/мл и 10 мкг/мл. Как видно из таблицы, эксперименты с использованием разных концентраций ПФ₂ и ПФ₄ совпадают с контрольными, не содержащими ПФ. В то же время использование в этих экспериментах кальмодулина (таблица) показало ингибирование связывания анти-

Таблица

Влияние нейропептидов и кальмодулина на взаимодействие антител против бычьего кальмодулина с анти-IgG, конъюгированного с пероксидазой хрена

Анализируемые вещества в мкМ	Конц. антител мкг/мл	Разведение анти-IgG	A_{492} нм
—	5	1:2000	—
—	5	1:1000	—
—	5	1:500	—
—	10	1:1000	0,130
—	10	1:500	0,230
Кальмодулин, 0,51	10	1:500	0,165
ПФ ₁ , 0,207	10	1:500	0,230
ПФ ₂ , 0,006	10	1:500	0,230
ПФ ₃ , 0,207	10	1:500	0,230
ПФ ₄ , 0,006	10	1:500	0,225

тел с анти-IgG. Эти данные позволили отклонить выдвинутое предположение о том, что ПФ₁₋₄, возможно, являются фрагментами молекулы кальмодулина. Полученные результаты позволили заключить, что ингибирование образования иммунного комплекса кальмодулин-антителом под воздействием коронаросуживающих пептидов гипоталамуса происходит в результате их связывания с кальмодулином.

Было исследовано влияние Ca^{2+} на связывание нейропептидов с кальмодулином. Следует отметить, что для образования иммун-

комплекса кальмодулин-антитело более благоприятными условиями являются те, когда кальмодулин иммобилизован на платах в присутствии Ca^{2+} , то есть процесс— Ca^{2+} -зависимый.

Нами были проведены две серии экспериментов. В одном случае кальмодулин был иммобилизован на платах в присутствии 1 мМ CaCl_2 . Затем в инкубационную смесь, наряду с ПФ и антителами, добавляли 1 мМ CaCl_2 или 1 мМ ЭГТА (рис. 2, а). Полученные данные показали отсутствие каких-либо различий в ингибировании образования иммунокомплекса под действием нейропептидов. В следующей серии экспериментов кальмодулин был иммобилизован на платах в

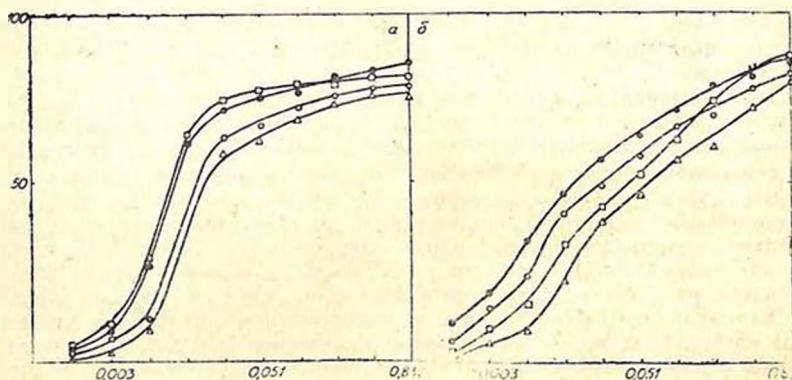


Рис. 2. а. Влияние пептидных факторов гипоталамуса (ПФ) на образование иммунокомплекса кальмодулин-антитело в присутствии 1 мМ CaCl_2 (●—ПФ₁; ○—ПФ₂) и 1 мМ ЭГТА (○—ПФ₂; △—ПФ₃). Кальмодулин был иммобилизован на платах в присутствии 1 мМ CaCl_2 . По оси ординат—% ингибирования связывания антител с кальмодулином; по оси абсцисс—концентрация ПФ в мМ.

б. Влияние пептидных факторов на образование иммунокомплекса кальмодулин-антитело в присутствии 1 мМ CaCl_2 (●—ПФ₁; ○—ПФ₂) и 1 мМ ЭГТА (○—ПФ₂; △—ПФ₃). Кальмодулин был иммобилизован на платах в присутствии 1 мМ ЭГТА. По оси ординат—% ингибирования связывания антител с кальмодулином; по оси абсцисс—концентрация ПФ в мМ.

присутствии 1 мМ ЭГТА. В инкубационную смесь также добавляли в одном случае 1 мМ CaCl_2 , в другом—1 мМ ЭГТА. В том случае, когда иммобилизованный кальмодулин был свободен от Ca^{2+} , наблюдалось связывание нейропептидов с кальмодулином (рис. 2, б). Мы не обнаружили каких-либо изменений в ингибиторной способности нейропептидов, когда инкубационная среда содержала Ca^{2+} или была свободна от них. На основании полученных данных был сделан вывод: хотя сродство нейропептидов гипоталамуса к кальмодулину несколько выше, когда он иммобилизован на платах в присутствии Ca^{2+} , они достаточно хорошо связываются с кальмодулином и в отсутствие ионов кальция.

Полученные данные позволили по-новому осветить Ca^{2+} -независимое регуляторное влияние ПФ₁₋₃ на активность киназы легких цепей миозина (КЛЦМ)— Ca^{2+} кальмодулинзависимого фермента,

ответственного за фосфорилирование легких цепей миоина [27—28].
Нами было обнаружено, что ПФ в концентрации 0,05 мкМ вызывают Ca^{2+} -независимую активацию фермента от 30 до 100% по сравнению с контролем, содержащим 1 мМ ЭГТА и не содержащим ПФ [8—9]. Стимулирующее действие ПФ на активность КЛЦМ имело место только при наличии в инкубационной среде кальмодулина. Данные, полученные с помощью метода ELISA о связывании ПФ с кальмодулином, позволили заключить, что коронаросуживающие пептидные факторы гипоталамуса осуществляют свое воздействие на активность КЛЦМ путем связывания с молекулой кальмодулина и образования комплекса кальмодулин-пептидный фактор, который, связываясь с каталитической субъединицей фермента, вызывает его активацию. Полученные результаты дают основание предположить, что коронаросуживающие нейропептиды гипоталамуса можно причислить к числу Ca^{2+} -независимых регуляторов в клетке, которые и в условиях *in vivo* могут принимать участие в регуляции активности КЛЦМ и, возможно, других Ca^{2+} -кальмодулинзависимых ферментов при низком внутриклеточном уровне содержания Ca^{2+} . В этом случае коронаросуживающие нейропептиды, по-видимому, могут принимать уча-

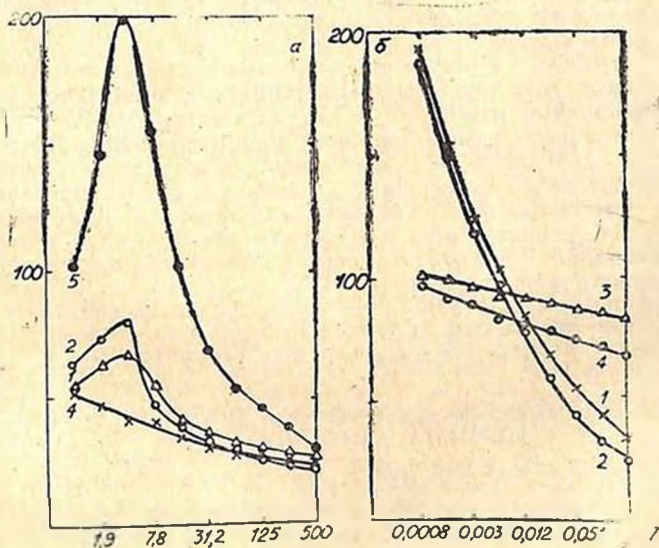


Рис. 3. а. Влияние пептидных факторов (ПФ) гипоталамуса (в концентрации, равной I_{50}) на образование иммунного комплекса кальмодулин-антитело в присутствии различных концентраций трифторперазина. 1—ПФ₁; 2—ПФ₂; 4—ПФ₄; 5—ПФ₅. По оси ординат—% связывания антител с кальмодулином; по оси абсцисс—концентрация трифторперазина в мкМ

б. Влияние пептидных факторов гипоталамуса на образование иммунного комплекса кальмодулин-антитело в присутствии постоянной концентрации трифторперазина, равной 3,9 мкМ. 1—ПФ₁; 2—ПФ₂; 3—ПФ₃; 4—ПФ₄. По оси ординат—% связывания антител с кальмодулином; по оси абсцисс—концентрация ПФ в мкМ

ствие (как и Ca^{2+}) в аллостерической регуляции кальмодулина, приводя его структуру в зависимости от концентрации ПФ (как и в случае Ca^{2+} в различных активные конформационные состояния).

Интересные данные были получены при изучении совместного эффекта нейропептидов гипоталамуса и ТФП на образование иммунокомплекса. В одном случае (рис. 3, а) исследовалось влияние ПФ (в концентрации I_{50}) в сочетании с разными концентрациями ТФП, а в другом (рис. 3, б) — влияние разных концентраций ПФ в присутствии постоянной концентрации ТФП, равной 3,9, которая вызывает увеличение образования иммунокомплекса до 100% и более [14]. Полученные данные показали, что ПФ подавляют активирующий эффект ТФП и только ПФ₅ повторяет эффект ТФП (рис. 3, а). Как видно из рис. 3, б, ПФ₁₋₄ полностью подавляют активирующий эффект ТФП и только при очень низких концентрациях ПФ₅, когда ингибирующий эффект этих нейропептидов не проявлялся или был выражен очень слабо (около 10%), мы наблюдали активирующий эффект ТФП. Очевидно, что ПФ₁₋₄ конкурируют с ТФП за центр связывания с кальмодулином. Как видно из того же рис. 3, б, одновременное связывание ПФ₁ и ТФП с кальмодулином препятствует как проявлению активирующего эффекта ТФП (даже при очень низких концентрациях ПФ), так и ингибирующего эффекта нейропептидов, что, очевидно, также связано с конформационными изменениями в структуре кальмодулина.

Таким образом, на основании полученных данных можно выдвинуть следующую гипотезу: связывание ПФ с кальмодулином вызывает конформационные изменения в его антигенном участке, расположенном в С-концевом домене кальмодулина (последовательность аминокислот 137—143) [29—30], в результате чего теряется чувствительность кальмодулина к антителам, приводящая к ингибированию образования иммунокомплекса кальмодулин-антитело. Конформационные изменения, происходящие в молекуле кальмодулина в результате его связывания с нейропептидами гипоталамуса, изменяют также чувствительность кальмодулина к ТФП.

Дальнейшие исследования будут направлены на изучение влияния комплекса кальмодулин-пептидный фактор гипоталамуса на активность ряда Ca^{2+} -кальмодулинзависимых ферментов.

ABOUT CALMODULIN-BINDING CORONAROCONSTRICTORY HYPOTHALAMIC PEPTIDES

Barkhudaryan N. A., *Horvath L., Galeyan A. A., *Civadi J.

G. Ch. Bunatyan Institute of Biochemistry, Academy of Science of the Armenia, Yerevan

*Institute of Enzymology, B. R. C. Hungarian Academy of Sciences, Budapest

Using the technique of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) we found that coronaryconstrictory hypothalamic neuropeptides inhibit the formation of calmodulin—antibody immune complex by binding with calmodulin. As compared with trifluoroperazine, a classic calmodulin antagonist, these neuropeptides inhibit the formation of the immune complex when added at three orders of magnitude lower concentration. It has been demonstrated that the sensitivity of calmodulin to trifluoroperazine changes in the presence of neuropeptides. The problem of allosteric regulation of calmodulin by coronaroconstrictory hypothalamic peptides is discussed.

ЛИТЕРАТУРА

1. Галоян А. А., Гурвиц Б. Я., Погосян М. А. *Вопр. биохимии мозга*. Ереван, Изд-во АН АрмССР, т. 2, с. 117—120, 1976.
2. Галоян А. А., Срапионян Р. М., Карапетян Р. О., Абелян Ж. Г., Саакян Ф. М., Саакян С. А., Абрамян С. С., Григорян Л. А., Одабашян А. Б., Бочко И. Ф. *Нейрохимия*, т. 5, № 4, с. 354—365, 1986.
3. Галоян А. А., Гурвиц Б. Я. *Нейрохимия*, т. 5, № 4, с. 420—422, 1986.
4. Галоян А. А. *Нейрохимия*, т. 6, № 1, с. 3—9, 1987.
5. Галоян А. А., Гурвиц Б. Я., Шарова Н. П. Тезисы докл. X Всесоюзн. конф. по биохимии нервной системы «Фундаментальные достижения нейробиологии в медицине» (под ред. С. Е. Северина) с. 125—126, Горький, 1987.
6. Галоян А. А., Бархударян Н. А., Валко К., Закарян Т. Р. *Нейрохимия*, т. 7, № 4, с. 519—524, 1988.
7. Galoyan A. A., Barkhudaryan N. A., 12th ISN Meeting, Algarve, Portugal, 1989, J. Neurochem., v. 52, suppl., S 74B, 1989.
8. Бархударян Н. А., Закарян Т. Р., Шувалова Л. А., Галоян А. А. Тезисы докл. VI Всесоюзн. конф. по биохимии мышц, Тбилиси, с. 19—20, 1989.
9. Бархударян Н. А., Закарян Т. Р., Шувалова Л. А., Чаилян С. Г., Алексанян А. Р., Галоян А. А. *Нейрохимия*, т. 8, № 4, с. 335—341, 1989.
10. Cheung W. Y. *Science*, v. 207, p. 19—27, 1980.
11. Means A. R., Dedman J. R. *Nature*, v. 285, p. 73—77, 1980.
12. Klee C. B., Crouch T. H., Richman P. G. *Annual Rev. Biochem.*, v. 49, p. 489—515, 1980.
13. Basiron C. O., Wolff D. J. *Biochem. Pharmacol.*, v. 30, № 12, p. 1395—1405, 1981.
14. Ovadi J. *Progress in Drug Research*, v. 33, p. 352—355, 1989.
15. Malenck D. A., Anderson S. R. *Biochemistry*, v. 21, p. 3430—3485, 1982.
16. Malenck D. A., Anderson S. R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 114, № 1, p. 50—56, 1983.
17. Giedron D. P., Paett D., Ling N., Staros J. V. J. *Biol. Chem.*, v. 258, p. 16—22, 1983.
18. Mauket F., Cox J. A. *Biochemistry*, v. 22, p. 5580—5586, 1983.
19. Levin R. M., Weiss R. *J. Pharmacol.*, v. 13, № 2, p. 690—697, 1977.
20. Weiss P., Prozialeck W., Cimino M. *Adv. Cycl. Nucl. Res.*, v. 12, p. 213—225, 1980.
21. Orose F., Christova T. Y., Ovadi J. *Mol. Pharmacology*, v. 33, p. 678—682, 1988.
22. Engvall E. *Methods in Enzymol.*, v. 70, p. 419—439, 1980.
23. Charbonneau U., Cormier M. J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 90, p. 1039—1047, 1979.
24. Wallace J. W., Cheung W. J. *J. Biol. Chem.*, v. 254, p. 6564—6571, 1979.
25. Tijssen P., Kurstak E. —In: *Viral Immunodiagnosis* (eds. Kurstak E., Mortisset R.) p. 125. Academic Press, New York, 1974.
26. Van Eldik L. J., Watterson D. M. —In: *Calcium Physiology* (ed. Marme D.), Springer, Berlin, p. 215—226, 1984.
27. Yagi K., Yazawa M., Kakiuchi S., Ohshima M., Uenishi K. *J. Biol. Chem.*, v. 253, № 5, p. 1338—1343, 1978.
28. Blumenthal D. K., Stall J. T. *Biochemistry*, v. 19, p. 5608—5614, 1980.
29. Van Eldik L. J., Watterson D. M. *J. Biol. Chem.*, v. 256, p. 4205—4210, 1981.
30. Zuklys K., Kramer J., Magocsi M., Ovadi J. *Immun. Letter* (in press) 1990.

Поступила 19.III 1990



УДК 616.008.939+633.2.02+616.008.931:577.152.311

ВЛИЯНИЕ АНТАГОНИСТА КАЛЬМОДУЛИНА W-7 НА РЕГУЛЯЦИЮ АКТИВНОСТИ КАЛЬМОДУЛИНЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ ФДЭ ИЗ МОЗГА БЫКА С-МОДУЛИНОМ

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

Институт биохимии им. Г. Х. Бунятяна АН Армянской Республики, Ереван

*МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

В присутствии ЭГТА антагонист кальмодулина W-7 ингибирует базальную активность Ca^{2+} -кальмодулинзависимой ФДЭ из мозга быка на 50% и не влияет на сродство субстрата к ферменту. Инактивация ФДЭ происходит по механизму неполного неконкурентного ингибирования с $K \sim 25$ мкМ. Действие W-7 приводит к подавлению активности ФДЭ, стимулированной под действием С-модулина 1, и сопровождается 10-кратным увеличением значения константы активации ФДЭ С-модулином, равной в других условиях $\sim 2 \cdot 10^{-6}$ М. Однако величина эффективной константы диссоциации стремится к предельному значению при избыточных концентрациях ингибитора, что свидетельствует об аллостерическом механизме ингибирования активности комплекса (ФДЭ-С-модулин 1) с K W-7 ~ 50 мкМ. Результаты настоящей работы указывают на неконкурентный по отношению к сАМР и С-модулину 1 характер связывания W-7 с ФДЭ.

Регуляция активности многих кальмодулинчувствительных (КМ) систем, в том числе и ФДЭ циклических нуклеотидов [1], лимитирована внутриклеточным уровнем содержания ионов кальция [2]. Предполагается, что при уменьшении концентрации Ca^{2+} ниже 10^{-6} М *in vivo* в действие вступают КМ-подобные, но Ca^{2+} независимые биологические структуры, способные заменять многие функции, выполняемые КМ [3]. К настоящему времени известны многие системы, регулирующие активность ФДЭ Ca^{2+} -независимым путем. К их числу относятся жирные кислоты и фосфолипиды [4], некоторые простагландины и гормоны, ферменты [5, 6].

Среди них особое место отводится выделенной ранее из состава кардиотропного нейrogормона С группе коронаросуживающих соединений под общим названием С-модулины [7], отражающим их основное свойство—способность Ca^{2+} независимой, аллостерической регуляции Ca^{2+} -КМ-чувствительной ФДЭ сАМР, коррелирующей с биологической активностью. Изучение характера действия С-модулинов на активность ФДЭ привело к выводу об их возможном участии в регуляции активности уровня содержания сАМР внутри клетки [8]. Однако эффект Ca^{2+} -независимой стимуляции гидролиза сАМР данными соединениями мало изучен, что затрудняет строгую интерпретацию результатов исследований.

Отсутствие высокоэффективных методов оценки избирательности С-модулинов к ФДЭ представляет собой актуальную проблему, в связи с чем в настоящей работе предпринята попытка изучения действия антагониста КМ—W-7 на активность комплекса ФДЭ · С-модулин 1 (СМ₁) с целью идентифицировать избирательность ФДЭ к Ca²⁺ -независимым модуляторам.

Материалы и методы

В работе были использованы следующие коммерческие препараты: сАМР, ЭГТА („Calbiochem“, США), [³H] сАМР („Amersham“, Англия), трис-азид-Na („Serva“, ФРГ), трифторуксусная кислота (ТФУ), ацетонитрил („Fluka“, Швейцария), β-меркаптоэтанол („Merck“, ФРГ), хроматографические сорбенты фенилсефароза („Pharmacia“, Швеция), ДЭАЭ TSK Toyppearl 650 M („Toyo soda“, Япония), анионообменная смола Dowex 1×2(50—100 меш, „Serva“, ФРГ).

Уровень радиоактивности проб определяли с помощью жидкостного сцинтилляционного спектрометра „Intertechnique—2000“ (Франция) с использованием сцинтиллятора ЖС-7А („Союзреахим“, СССР).

ВЭЖХ проводили на хроматографе („Altex-Beckman“, США) с применением колонок C-18 Ultrasphere OSD („Altex“, США), ДЭАЭ TSK 3 SW („LKB“, Швеция) и колонки для гель-фильтрации Sphero-gel TSK 3000 и 2000 („Altex-Beckman“, США).

Гомогенат центрифугировали на центрифуге „Beckman“, (ротор JA-14 и JA-21, „Beckman“, США).

Активность ФДЭ определяли по методу Thompson, Appleman [9], основанному на измерении концентрации [³H]аденозина в реакционной среде, образующегося в результате двухстадийной реакции гидролиза [³H] сАМР и [³H] 5'-АМР с участием ФДЭ и 5'-нуклеотидазы.

Препарат ФДЭ получали по методу Бобрускина, Шафхина [10] в четыре хроматографические стадии: на ионообменном сорбенте ДЭАЭ TSK (4×11), аффинном—фенил-сефароза (4×5,6 см), с последующей ВЭЖХ на ДЭАЭ TSK-3SW и гель-фильтрацией на колонке TSK—3000 SW (7,5×600 мм). Элюцию на всех стадиях осуществляли буфером, содержащим 25 мМ трис-НСl, рН 7,0, 1 мМ MgCl₂, 1 мМ ДДТ, 0,1 мМ азид натрия. В качестве дополнительных вилгридиентов, в зависимости от метода хроматографии, использовали 0,2 М NaCl, 0,2 М ЭГТА и 2 мМ Ca²⁺.

Очистку КМ проводили по модифицированной методике Gopalakrishna, Anderson [11], предложенной ранее [10].

Дальнейшую очистку КМ проводили методом ВЭЖХ на колонке TSK ДЭАЭ (21,5×150 мм). Элюцию осуществляли линейным градиентом NaCl (150—350 мМ) в 25 мМ трис-НСl буфере, рН 7,0. Гомогенность препарата КМ проверяли методом электрофореза в 14%-ном ПААГ в присутствии 0,1%-ного ДДС-Na по методу Laemmli [12].

Препарат СМ₁ получали методом, предложенным ранее [7], с помощью ОФ-ВЭЖХ на колонке C-18 с использованием линейного градиента ацетонитрила в воде (0—30%) в присутствии 0,1%-ной ТФУ. Скорость потока—0,8 мл/мин. Выход продукта контролировали по поглощению в УФ-области 210—220 нм. Чистоту препаратов СМ₁ проверяли электрофоретическим методом в 12,5%-ном ПААГ в присутствии 8 М мочевины и 0,1%-ного ДДС-Na. По данным элек-

трофореза, препарат активатора был электрофоретически гомогенным.

Результаты и обсуждение

На рис. 1, а, б представлены результаты эксперимента, свидетельствующие об ингибировании базальной активности ФДЭ под действием антагониста КМ—W-7. Как оказалось, W-7 в присутствии 0,2 мМ ЭГТА не утрачивает своей способности инактивировать гидролиз сАМР, но подавляет активность ФДЭ до определенного уровня. Соотношение скоростей гидролиза в отсутствие ингибитора и в присутствии его избыточных концентраций равно ~2. Иными словами,

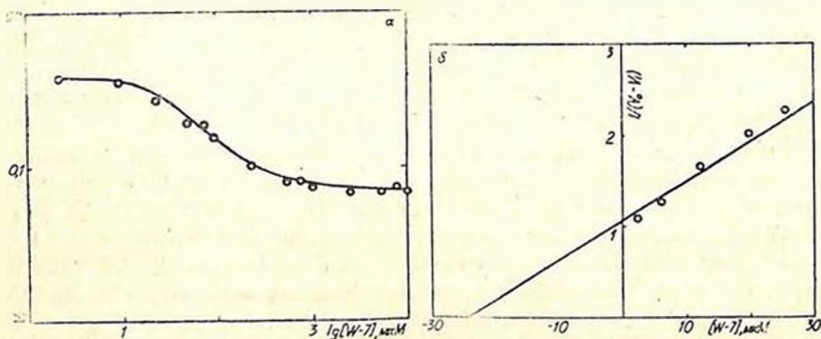


Рис. 1. а—зависимость начальной скорости гидролиза сАМР от концентраций соединения W-7; б—зависимость обратной величины начальной скорости гидролиза сАМР от концентраций W-7: по оси абсцисс—логарифмы концентраций W-7, выраженный в мкМ; по оси ординат—скорость гидролиза сАМР (5 мкМ) в отн. ед. (ОЕА); измерения выполнены в присутствии 0,2 мМ ЭГТА.

наблюдаемый эффект ингибирования, равный 50%, свидетельствует о неполной инактивации фермента, характеризующейся уменьшением максимальной скорости гидролиза сАМР с ростом концентрации ингибитора. Величина K определенная по пересечению прямой с осью абсцисс на рис. 1, б, составляет ~25 мкМ. Представленные результаты оказались несколько неожиданными в рамках известных на сегодняшний день литературных данных относительно действия антагонистов КМ [15—17].

В этой связи для уточнения характера ингибирования базальной активности ФДЭ под действием W-7 был проведен эксперимент, результаты которого представлены на рис. 2, а, свидетельствующий о том, что эффективная константа сродства субстрата к ФДЭ, равная ~100 мкМ, не претерпевает изменений при увеличении концентрации W-7 более чем на порядок. Следовательно, ингибирование является неконкурентным и неполным. В данном случае эффект инактивации под действием W-7 можно объяснить образованием комплекса (ФДЭ·W-7).

На следующем этапе работы нами была проверена возможность влияния W-7 на активность комплекса (ФДЭ·С-модулин).

На рис. 2, б представлены результаты, согласно которым в присутствии избыточных концентраций $СМ_1$ антагонист КМ не влияет на сродство сАМР к ФДЭ.

На рис. 3 представлен график зависимости начальной скорости гидролиза сАМР в присутствии различных концентраций W-7 от концентраций СМ₁ в координатах Лайнуивера-Берка. Линейность протекаемой реакции свидетельствует об отсутствии кооперативности.

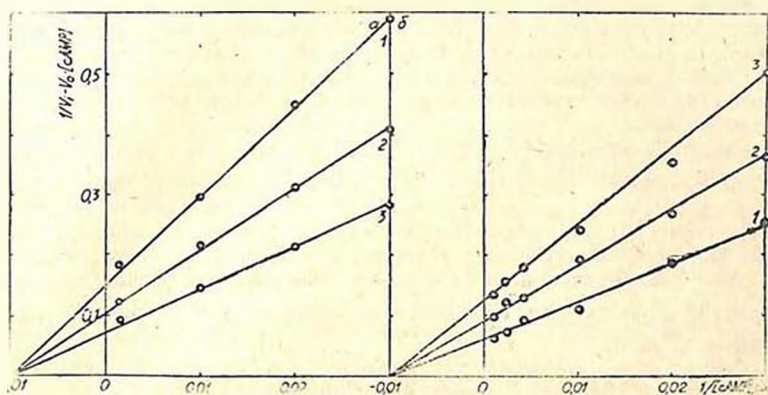


Рис. 2. Зависимость начальной скорости гидролиза сАМР в присутствии W-7 (а) и С-модулина I+W-7 (б) от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера-Берка. По оси абсцисс—концентрация сАМР, выраженная в мкМ; по оси ординат—У. А. ФДЭ, выраженная в ОЕА (Vi). Измерения выполнены в присутствии 0,2 мМ ЭГТА и 100 нг/мл С-модулина I при фиксированных концентрациях W-7, равных (в мкМ): 1—(50), 2—(5), 3—(0)

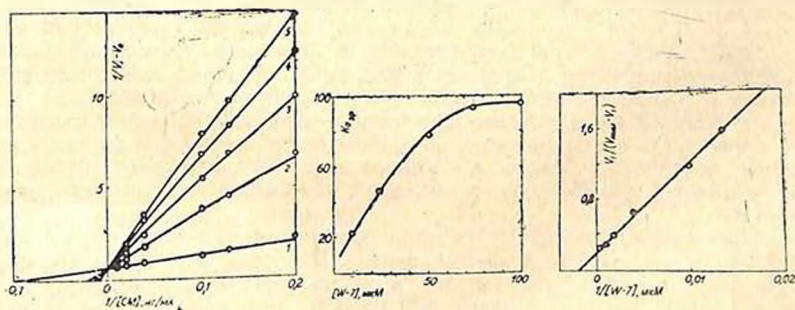


Рис. 3. Зависимость начальной скорости гидролиза сАМР от концентраций С-модулина I в присутствии W-7 в координатах Лайнуивера-Берка. Измерения выполнены в присутствии 0,2 мМ ЭГТА и различных концентрациях W-7, равных (в мкМ): 1—(0), 2—(10), 3—(25), 4—(50), 5—(100)

Рис. 4. Зависимость эффективной константы активации ФДЭ С-модулина I от концентраций W-7. По оси абсцисс—концентрация ингибитора, выраженная в мкМ, по оси ординат—значения эффективной константы активации ФДЭ под действием С-модулина I в нг/мл

Рис. 5. Зависимость начальной скорости гидролиза сАМР от концентраций W-7 в присутствии С-модулина I. Измерения выполнены в присутствии 0,2 мМ ЭГТА и 100 нг/мл С-модулина I

Эффективная константа сродства CM_1 к ФДЭ увеличивается с ростом концентрации ингибитора и, как следствие, максимальная скорость гидролиза сАМР не претерпевает существенных изменений. В данном случае представленный на рис. 3 эффект действия W-7 следовало бы отнести к случаю классического конкурентного ингибирования. Однако данные на рис. 4, отражающие зависимость эффективной константы активации ФДЭ под действием CM_1 от концентрации W-7, указывают на неполное конкурентное ингибирование, поскольку в области высоких концентраций значение эффективной константы ассоциации выходит на постоянный уровень, предельная величина которой составляет $2 \cdot 10^{-4} M$. В отсутствие W-7 значение константы ассоциации (K_i) равно $2 \cdot 10^{-4} M$, а степень инактивации комплекса (ФДЭ· CM_1) составляет ~ 10 . Следовательно, имеет место ингибирование, протекающее по механизму неполного конкурентного ингибирования. Построение графика зависимости скорости гидролиза сАМР от концентрации W-7 дает возможность определить K_i 500 мкМ. Однако при соотношении величин K_i/K_a , равном 10, K_i равно ~ 50 мкМ.

Таким образом, нами установлено, что взаимодействие W-7 с комплексом (ФДЭ· CM_1) носит неконкурентный характер, поскольку величина K_i активности комплекса под действием W-7 больше по сравнению с тем же значением в случае инактивации базальной активности фермента. Кроме того, 10-кратное увеличение K_i , CM_1 под действием W-7 вызвано аллостерическим воздействием последнего, так как в отсутствие активатора наблюдаемый процесс инактивации сопровождается только изменением константы скорости гидролиза в сторону уменьшения.

Следовательно, конкуренция антагониста КМ за центр связывания на ФДЭ невозможна, поскольку ингибирование активности комплекса (ФДЭ· CM_1) неполное. Исключена также конкуренция за каталитический центр, так как величина K остается неизменной как в присутствии, так и в отсутствие CM_1 . Иначе говоря, можно предположить о наличии аллостерического участка связывания W-7 на молекуле ФДЭ. Взаимодействие антагониста КМ с ФДЭ на этом участке приводит к ингибированию способности фермента образовать активный комплекс с CM_1 , а в случае отсутствия последнего образование комплекса (ФДЭ·W-7) приводит к изменению скорости гидролиза сАМР.

Факт существования W-7 связывающего участка является неожиданным, но отнюдь не исключительным. Известно, например, что фенотиазины способны связываться с молекулой ФДЭ, ингибируя не только стимуляцию активности (ФДЭ·КМ), но и базальную активность фермента [13]. Авторами показано, что гидрофобные участки на молекуле КМ, по которым происходит связывание антагонистов, отличаются по структуре от гидрофобных участков на молекуле ФДЭ, ответственных за связывание КМ.

THE EFFECT OF W-7, A CALMODULIN ANTAGONIST, ON THE REGULATION OF ACTIVITY OF CM-SENSITIVE PDE FROM BOVINE BRAIN BY C-MODULIN I

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

G. Ch. Bunatyan Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Armenia, Yerevan

*Lomonosov Moscow State University

W-7, a calmodulin antagonist, inhibits basal activity of Ca^{2+} , CM-dependent PDE from bovine brain by 50% in the presence of EGTA, however, it does not affect the affinity of the substrate to the enzyme. Inactivation of PDE occurs by the incomplete non-competitive mechanism with K_i equal to about 25 μM . W-7 inhibits PDE stimulated by C-modulin I (CM-I) and leads to a 10-increase in the activation constant of the enzyme by C-modulin which under these conditions equals 2×10^{-9} M. However, the value of K_s achieve the limiting value at excessive inhibitor concentrations providing evidence for allosteric mechanism of the inhibition of the PDE-CM-I complex with K_i equal to about 50 μM for W-7. Our results point out that W-7 binds to PDE non-competitively with respect to cAMP and CM-I.

ЛИТЕРАТУРА

1. Haung C. Y., Chau V. C., Chock P. B. Proc. Nat. Acad. Sci., v. 78, p. 871—874, 1981.
2. Kretsinger R. H. Am. Elsevier, New York, p. 63—72, 1977.
3. Галоян А. А. Нейрохимия, т. 6, №1, с. 3—9, 1987.
4. Wolff D. I., Brostrom C. O. Arch. Biochem. and Biophys., v. 173, p. 720—731, 1980.
5. Hamet P., Franks D. J., Tremblay J. Can. J. Biochem. and Cell Biol., v. 61 № 11, p. 1158—1163, 1983.
6. Krinks M. N., Haech J., Rhoads A., Klee C. B. —In: Advances in Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Res. (e. s. S. I. Strada, W. J. Thompson), v. 16, p. 31—47, Raven Press, N. Y., 1984.
7. Галоян А. А., Бобрускин И. Д., Гурвиц Б. Я., Абрамян Г. Э. Нейрохимия, т. 8, № 1, с. 78—86, 1989.
8. Thompson W. J., Appleton M. M. Biochemistry, v. 10, p. 311—316, 1971.
9. Бобрускин И. Д., Шайхин С. М., Муратова М. В., Баранова Л. А., Северин Е. С. Биохимия, т. 52, вып. 8, с. 1344—1352, 1987.
10. Gopalakrishna R., Anderson W., B. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 104 p. 830—836, 1982.
11. Lactmil U. K. Nature, v. 227, p. 680—683, 1970.
12. Балденков Г. Н., Меньшиков М. Ю., Феоктистов Н. А., Ткачук В. А. Биохимия, т. 50, вып. 7, с. 1141—1150, 1985.

Поступила 5.III 1990



ИЗУЧЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ И СОСТАВА ЦЕРЕБРОЗИДОВ И СУЛЬФОЦЕРЕБРОЗИДОВ В ОПУХОЛЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА

ЛЕВИТИНА М. В., ВАСИЛЬЕВ А. А.

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

Определено содержание и состав cerebrozидов и сульфocerebrozидов в опухолях головного мозга человека пяти типов (глиобластом, астроцитом, медуллобластом, невринном и менингиом), а также в белом и сером веществе головного мозга человека в норме. В исследованных опухолях отмечается исключительно низкое содержание обоих гликолипидов по сравнению с белым и серым веществом головного мозга. Существенно отличается также состав cerebrozидов в этих опухолях. Так, в них обнаружено высокое содержание глюкоцереброзидов, а также повышение доли насыщенных нормальных жирных кислот в cerebrozидах и сульфocerebrozидах глиобластом по сравнению с нормой. Полученные результаты обсуждаются в связи с предполагаемой ролью нарушений обмена гликолипидов в злокачественной трансформации тканей и с перспективами развития данного направления исследований.

Цереброзиды (Ц) и сульфocereброзиды (СЦ) являются важными компонентами мембран клеток нервной ткани. Они способны модулировать активность ферментов, процессы рецепции, обладают антигенной активностью [1—8].

Изучение Ц и СЦ в опухолях головного мозга млекопитающих и человека началось с 70-х годов [8—10]. Однако имеющиеся данные о содержании и структуре этих гликолипидов немногочисленны, неполны и противоречивы. Детальное биохимическое изучение этих гликолипидов в опухолях головного мозга представляет не только теоретический интерес, но имеет большое практическое значение для решения вопросов, связанных с диагностикой и лечением рака.

В настоящей работе сообщаются данные о содержании Ц и их сульфоефиров и об их составе в пяти типах опухолей головного мозга человека. Выявленные количественные и качественные изменения этих гликолипидов в трансформированных клетках по сравнению с нормальными клетками головного мозга обсуждаются в связи с возможной ролью этих гликолипидов в определении свойств трансформированных клеток.

Материалом для исследований служили опухоли головного мозга человека, полученные во время нейрохирургических операций в Ленинградском нейрохирургическом институте им. А. Л. Поленова. Был изучен 21 образец пяти типов опухолей—глиобластомы, астроцитомы, медуллобластомы, невриномы и менингиомы [11]. Опухоли очищали от кровеносных сосудов, промывали 0,9%-ным NaCl и приготавливали гомогенизуемую кашицу. Из нее брали пробы для определения сухой массы, белка и экстракции суммарных липидов. Из суммарных липидов выделяли Ц и СЦ с помощью одномерной ТСХ на силикагеле КСК в нейтральной системе растворителей хлороформ-метанол-вода (70:30:5). Пятна проявляли в парах йода. Количество Ц определяли по реаксозе реакцией с орцином-концентрированная H_2SO_4 при длине волны 505 и 420 нм; а количество СЦ определяли реакцией с азуром-А по методикам, описанным нами ранее [12]. Суммарные Ц разделяли на галакто- и глюкоцереброиды с помощью одномерной ТСХ на силикагеле с боратом Na в системе растворителей хлороформ-метанол-вода-концентрированный аммиак (280:70:6:1) по методу Кеп [13]. Жирные кислоты анализировали в виде метиловых эфиров на ГЖХ, используя неполярную фазу SE-30 и программирование температуры от 170 до 235°, 2°/мин. Метиловые эфиры гидроксикислот анализировали в виде сильных производных.

Результаты и обсуждение

Содержание Ц и СЦ в разных опухолях представлено в табл. 1, для сравнения приведены данные по содержанию этих гликолипидов в белом и сером веществе головного мозга человека. Проводилось также сравнение полученных результатов с данными других авторов по содержанию и составу этих липидов в нейронах и астроцитах мозга крысы [14], олигодендронитах мозга быка [15] и аксомах мозга крысы [16]. Изученные опухоли отличаются по локализации, гистогенезу и степени злокачественности [11]. Глиобластома, астроцитомы и медуллобластома относятся к группе внутримозговых опухолей нейроэпителиального происхождения. Астроцитомы являются разновидностью глиомы и считаются зрелой полужлокачественной опухолью. Из них наиболее злокачественными являются глиобластома и медуллобластома, они характеризуются незрелостью, недифференцированностью клеток. Невринома и менингиома относятся к внемозговым опухолям: первая имеет нейроэпителиальное происхождение и возникает из клеток неврилеммы (шванновской оболочки) нервных стволов; вторая имеет мезодермальное происхождение и является опухолью твердой оболочки мозга. Обе опухоли в большинстве случаев являются доброкачественными или полужлокачественными.

Содержание Ц и СЦ неодинаково в различных опухолях, поэтому рассмотрим каждую из них отдельно. Среди внутримозговых опухолей сравнительно высокое содержание обоих гликолипидов как в мг/г сухой массы, так и в % от общего содержания липидов найдено в глиобластоме: Ц составляют 3,16, а СЦ—4,85 мг/г сухой массы; существенно более низкое в астроцитоме—около 1,24 и 1,27 мг/г сухой массы соответственно; в медуллобластоме: Ц—1,36 и СЦ—1,34 мг/г сухой массы (табл. 1).

Таблица 1

Содержание цереброзидов и сульфocereброзидов в опухолях головного мозга человека

Вид опухоли или ткани мозга	Единицы измерения	Цереброзиды					Сульфocereброзиды	Ц:СЦ
		Сумма	с нормальными кислотами	с гидроксикислотами	Галакто-цереброзиды	Глаукоцереброзиды		
Глиобластома (n=3)*	мг/г сухой массы	3.16±0.44	1.44±0.44	1.72±0.06	0.51	2.65	4.85±1.60	1:1.5
	% от общих липидов	0.63±0.09	0.29±0.09	0.34±0.02	0.10	0.53	0.97±0.32	
Астроцитомы (n=5)	мг/г сухой массы	1.24±0.36	0.71±0.20	0.53±0.15	0.28±0.12	0.96±0.24	1.27	1:1
	% от общих липидов	0.26±0.08	0.15±0.06	0.11±0.03	0.06±0.03	0.20±0.05	0.25	
Медуллобластома (n=3)	мг/г сухой массы	1.36±0.17	0.94	0.42	0.27	1.19	1.34	1:1
	% от общих липидов	0.27±0.03	0.19	0.06	0.05	0.21	0.27	
Невринома (n=5)	мг/г сухой массы	1.16±0.37	0.88±0.22	0.58±0.15	0.35±0.09	1.11±0.28	0.83	1.8:1
	% от общих липидов	0.33±0.08	0.20±0.05	0.13±0.03	0.08±0.02	0.25±0.07	0.16	
Менингиома (n=5)	мг/г сухой массы	1.17±0.31	0.58±0.32	0.58±0.11	0.58	0.58	0.58±0.16	2:1
	% от общих липидов	0.24±0.06	0.12±0.06	0.12±0.01	0.12	0.12	0.12±0.03	
Серое вещество	мг/г сухой массы	17.50	7.28	10.19	17.10	0.40	5.00	3.5:1
	% от общих липидов	3.50	1.46	2.04	3.40	0.10	1.00	
Белое вещество	мг/г сухой массы	145.00	38.26	106.85	141.70	3.35	45.00	3:1
	% от общих липидов	35.60	10.16	28.45	37.70	0.90	11.00	

Примечание. * Достоверность данных, подвергнутых статистической обработке, определена на уровне значимости $p=0,05$; n—количество опухолей каждого типа.

Изучен состав Ц и СЦ этих опухолей. В глиобластоме содержится немного больше фракции Ц с гидроксикислотами, а в астроцитоме, напротив, несколько больше фракции Ц с нормальными кислотами. Для Ц медуллобластомы, одной из наиболее злокачественных опухолей среди всех исследованных, отмечено еще более значительное преобладание фракции с нормальными кислотами (относительное содержание этих Ц более чем в 2 раза выше, чем фракции Ц с гидроксикислотами).

Ц этих опухолей были разделены также по углеводному компоненту. В результате показано, что во всех 3-х типах внутримозговых опухолей, содержащих глюкозу, преобладает фракция Ц. Глюкоцереброзидов обнаружено в 3,5—5 раз больше, чем галактоцереброзидов, причем в глиобластоме—наиболее злокачественной и распространенной опухоли головного мозга—отмечена наиболее выраженное преобладание глюкоцереброзидов. По этому показателю Ц опухолей мозга резко отличаются от Ц серого и белого вещества мозга человека в норме, в которых значительно преобладает галактоза.

По жирнокислотному компоненту были разделены только гликоэффинголипиды глиобластомы. Из Ц и СЦ глиобластомы выделены насыщенные и моноеновые жирные кислоты от 16 до 27 С атомов (табл. 2). В целом Ц и СЦ глиобластомы содержат в основном насыщенные

Таблица 2

Состав жирных кислот цереброзидов и сульфocereброзидов глиобластом человека (в % от суммы нормальных кислот и от суммы гидроксикислот)

Жирные кислоты	Ц е р е б р о з и д ы		Сульфocereброзиды	
	нормальные кислоты	гидроксикислоты	нормальные кислоты	гидроксикислоты
16:0	24.5	1.4	24.0	8.0
17:0	1.7	сл.	1.8	сл.
18:0	12.8	2.0	12.1	2.0
18:1	0.8	сл.	1.8	сл.
20:0	2.5	1.4	2.1	6.0
20:1	1.2	1.8	1.8	сл.
21:0	0.8	сл.	сл.	4.0
22:0	4.9	9.6	4.6	12.0
22:1	сл.	сл.	сл.	4.0
23:0	5.4	16.9	4.6	8.0
23:1	сл.	сл.	сл.	2.0
24:0	15.6	45.3	13.6	8.0
24:1	6.6	4.8	7.1	16.0
25:0	6.6	10.1	6.1	6.0
25:1	1.6	1.7	1.8	2.0
26:0	1.6	4.8	2.5	4.0
26:1	11.1	2.0	10.0	18.0
27:0	1.5	сл.	2.9	сл.
27:1	1.8	сл.	3.2	сл.
насыщенные	76.9	91.5	74.3	58.0
длинноцепочечные*	46.4	68.7	47.2	54.0

Примечание. * Жирные кислоты с C₂₄ по C₂₇. сл.—следовые количества (менее 0,5%).

нормальные жирные кислоты (более 70% всех нормальных кислот). Что касается гидроксикислот, то в Ц они в основном насыщенные (92% от суммы гидроксикислот), а в СЦ—значительно менее насыщенные

ные (58% от суммы гидроксикислот). Обращает на себя внимание довольно низкое относительное содержание нервновои кислоты (24:1) в обоих липидах опухоли (7%).

Ц и их сульфозифиры обнаружены и в исследованных висерно-вох опухолях (нервновои и менингиоме). В нервновои содержание Ц и СЦ немного больше, чем в менингиоме (табл. 1). В отличие от висерно-вох опухолей, в нервновои и менингиоме отмечено существенное преобладание Ц над СЦ—в 2 раза.

Ц нервновои и менингиомы содержат галактозу и глюкозу, причем в первой глюкозы в 3 раза больше, чем галактозы, а во второй оба сахара содержатся в одинаковых количествах. В менингиоме содержание фракции Ц с нормальными жирными кислотами и фракции Ц с гидроксикислотами примерно одинаково, тогда как среди Ц нервновои примерно в 1,5 раза больше Ц с нормальными кислотами.

Исследованные опухоли существенно отличаются по содержанию и составу Ц и СЦ от белого и серого вещества головного мозга человека в норме (табл. 1, 2). В общих чертах эти различия сводятся к следующему:

а) содержание обоих гликолипидов намного ниже в опухолях головного мозга, чем в сером веществе мозга. Так, например, в глиобластоме в 5 раз меньше Ц по сравнению с серым веществом и более чем в 45 раз по сравнению с белым веществом мозга. Содержание СЦ в этой опухоли по сравнению с белым веществом в 10 раз меньше. В астроцитоме концентрация обоих гликолипидов ниже почти в 14 и 3,5 раза соответственно по сравнению с серым веществом (табл. 1).

б) для опухолей головного мозга характерно иное, чем в нормальной ткани мозга соотношение между Ц и их сульфозифирами. Как известно, в головном мозгу в норме содержание Ц в несколько раз превышает содержание СЦ [9], тогда как в глиобластоме содержание СЦ более высокое, чем их предшественников, а в медуллобластоме и астроцитоме содержание обоих гликолипидов близко. Аналогично повышенная доля СЦ по отношению к Ц обнаружена в линии клеток глиомы мыши, индуцированных химическими веществами [9]. Интересно отметить, что, несмотря на преобладание Ц над СЦ в менингиомах и нервновомах, соотношение Ц/СЦ в этих висерно-вох опухолях существенно меньше, чем в норме (табл. 1).

в) особенностью исследованных опухолей кроме менингиом является более высокое содержание глюкоцереброзидов по сравнению с галактоцереброзидами (в менингиоме уровень этих Ц одинаков, табл. 1). В норме в головном мозгу взрослых млекопитающих и человека Ц содержат в основном галактозу и очень мало глюкозы [17]. Как в сером, так и в белом веществе преобладают галактоцереброзиды над глюкоцереброзидами более чем в несколько сот раз [14]. Полученные нами результаты согласуются с теми немногочисленными данными, которые имеются в литературе. Так, есть сообщения о снижении концентрации Ц и СЦ в глиоме G-25 и G-261 мыши [18] и в линии клеток глиомы D-54 Mg человека [19]. Показано, что в глаоме мозга мыши увеличена концентрация гликоцереброзидов по сравнению с нормальным мозгом [18].

г) состав жирных кислот Ц и СЦ глиобластомы заметно отличается от нормы. Так, для глиобластомы характерно относительно низкое содержание нервновои кислоты в обоих липидах, в результате чего отношение 24:0/24:1 равно 2 по сравнению с 0,4 в нормальном мозгу [20]. В литературе мы не нашли данных о составе жир-

ных кислот Ц и СЦ опухолей головного мозга человека. Только в одной работе говорится о возможном изменении состава их жирных кислот в линии клеток глиомы D-54 Mg человека на основании косвенных показателей—подвижности гликолипидов на ТСХ [19].

Данные по Ц и СЦ немозговых опухолей человека (невриномы и менингиомы) в литературе практически отсутствуют. Эти опухоли, по-видимому, имеют некоторые особенности гликолипидного состава. Известно, что невринома образуется из шванновской клетки. Представляло бы интерес сравнить содержание и состав гликолипидов невриномы с неврилеммой. Однако таких данных в литературе мы не нашли, но есть сведения о гликолипидах аксолеммы, выделенной из мозга крысы [16]. По сравнению с приводимыми в этой работе данными в невриноме содержание Ц и СЦ значительно более низкое. О более низком содержании Ц в невриноме по сравнению с нормой сообщается в одной из опубликованных работ [23].

Интересно отметить, что выявленные в опухолях существенные отличия от нервной ткани в содержании и составе Ц и СЦ в значительной мере лишают опухоли головного мозга специфических для нервной ткани особенностей состава этих гликолипидов. Это хорошо согласуется с современными представлениями о злокачественной трансформации клеток как о процессе, связанном с их недоразвитием в ходе гистогенеза или дедифференцировкой [22, 23].

Представляется важным дальнейшее детальное изучение гликолипидов, прежде всего с длинной углеводной цепью, в злокачественных опухолях мозга с целью выявления характерных для трансформированных клеток индивидуальных гликолипидов. Такого рода исследования, особенно проведенные с использованием современных иммунохимических методов существенны для понимания роли гликолипидов в процессах злокачественной трансформации и клеточного узнавания.

STUDIES OF THE LEVEL AND COMPOSITION OF CEREBROSIDES AND SULFOCEREBROSIDES IN HUMAN BRAIN TUMORS

LEVITINA M. V., VASIL'EV A. A.

I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, USSR Academy of Sciences, Leningrad

This paper describes measurements of the content and composition of cerebroside and sulfocerebroside in five types of human brain tumors (glioblastoma, astrocytoma, medulloblastoma, neurinoma and meningioma) as well as in white and gray matter of the normal human brain. All studied tumors have an extremely low level of both glycolipid types as compared with normal white and gray matter. The fractional composition of cerebroside in these tumors also shows marked differences. The tumors contain high levels of glucocerebroside. There is an increased proportion of saturated normal fatty acids in cerebroside and sulfocerebroside of glioblastoma as compared with normal brain. These results are discussed in connection with the hypothetical role of altered glycolipid metabolism in malignant tissue transformation.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ranport M. M., Gavanna R., Graf L. J. Neurochem.*, v. 4, № 1, p. 9—18, 1967.
2. Дятловицкая Э. В. Укр. бяхим. журн., т. 56, № 3, с. 263—267, 1984.
3. *Schachner M. J. Neurochem.*, v. 39, № 1, p. 1—8, 1982.
4. *Brady R. O. J. Amer. Oil Chem. Soc.*, v. 43, № 1, p. 67—69, 1966.
5. *Hofstetter W., Bologna L., Wetterwald A., Z'graggen A., Blaser K., Herschko-witz N. J. Neurosci. Res.*, v. 11, № 4, p. 341—350, 1984.
6. *Raff M. C., Mirsky R., Fields K. L., Dorfman S. H., Silberberg D. H., Greg-son N. A., Leibowitz S., Kennedy M. C. Nature*, v. 274, № 5673, p. 813—816, 1978.
7. *Raff M. C., Fields K. L., Nakomori S.-I., Mirsky R., Pruss R. M., Winter J. Brain Res.*, v. 174, № 2, p. 283—308, 1979.
8. Попова Г. М., Промыслов М. Ш. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 50, № 6, с. 71—73, 1962.
9. *Dawson G., Sundarraj N., Pfeiffer S. E. J. Biol. Chem.*, v. 252, p. 2777—2779, 1977.
10. *Robert J., Rebel G., Mandel P. J. Lipid Res.*, v. 18, № 4, p. 517—522, 1977.
11. Аюцин А. П., Вухерт Т. М., Касумова С. Ю. Вopr. нейрохирургии, № 2, с. 45—51, 1981.
12. Левитина М. В., Абрамова Л. Н., Крепс Е. М. — В сб.: Физиология и биохимия морских и пресноводных животных, с. 89—129. Л., Наука, 1979.
13. *Kean E. L. J. Lipid Res.*, v. 7, № 3, p. 449—452, 1966.
14. *Abe T., Norton W. T. J. Neurochem.*, v. 32, № 3, p. 823—832, 1979.
15. *Podusto S. E. Advance. Exp. Med. Biol.*, v. 100, p. 71, 1978.
16. *DeVries G. H., Zmachinski C. J. Neurochem.*, v. 34, № 2, p. 424—430, 1980.
17. *Kornlat F. K., Hof L. J. Neurochem.*, v. 30, № 3, p. 577—561, 1978.
18. *Stoolmiller A. C., Dawson G., Kemp S. K., Schachner M. J. Neurochem.*, v. 32, № 2, p. 637—642, 1979.
19. *Podusto S. E., Miller K., Jang J. Cancer Res.*, v. 43, № 3, p. 1014—1018, 1983.
20. *Svennerholm L., Vanler M. T., Jungbier B. J. Neurochem.*, v. 30, № 6, p. 1383—1390, 1978.
21. *Brante G. Acta Physiol. Scand.*, v. 18, suppl. 63, 1949.
22. Самоилов В. Н. Диагностика опухолей головного мозга, Л., Медицина, 1985.
23. *Goldman J. E., Geier S. S., Hirano M. J. Neurosci.*, v. 6, № 1, p. 52—60, 1983.

Поступила 12.III.1990



ВЛИЯНИЕ ГИПОТАЛАМИЧЕСКИХ БЕЛОК-ГОРМОНАЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ НА ФУКОЗИЛИРОВАНИЕ ГЛИКОПРОТЕИНОВ ГИППОКАМПА

УДК 577.171.55

СААКЯН С. А., *ГРЕКШ Г., СААКЯН Ф. М., СРАПИОНЫАН Р. М.,
**ЮРК Р., ГАЛОЯН А. А., **МАТТИЕС А.

Институт экспериментальной биологии АН Армении, Ереван

*Институт фармакологии и токсикологии, Медицинская Академия ГДР

**Институт нейробиологии и исследований мозга, АН ГДР, Магдебург

Изучено влияние ряда кардиоактивных гипоталамических соединений на фукосилирование гликопротеинов гиппокампа крыс. Установлено, что одна из форм нейротропного гормона «К» (иК₂) в значительной степени подавляет процесс фукосилирования. Коррелирующие данные были получены при изучении действия этого же соединения на изменение активности фукокиназы.

Получены результаты, свидетельствующие о возможном участии предшественника иК₂—БНК (белка-носителя нейротропного гормона «К») в процессах обучения и запоминания.

В течение продолжительного времени (более 25 лет) накоплен фактический материал, свидетельствующий о наличии в магноцеллюлярных ядрах гипоталамуса трех специфических белок-гормональных комплексов [1—3]. Указанные белок-гормональные комплексы (БГК) идентифицированы как биохимические системы, осуществляющие химическую регуляцию метаболизма функций головного мозга и ряда висцеральных органов. При диссоциации БГК было установлено, что высокомолекулярные соединения являются гликопротеинами, а нековалентно связанные с ними кардиоактивные гликопептиды, ранее обнаруженные в том же регионе мозга, кардиотропными нейротропными, условно обозначенные «К», «С», и «Г» [4]. Исследование физико-химических и структурно-функциональных свойств обнаруженных гликопротеинов наряду с достоверными данными радиоиммунохимического анализа (РИА), подтверждает существование новых нейроспецифических гликопротеинов [3].

При изучении деградации предварительно денатурированных гликопротеинов протеолитическими ферментами [5, 6] обнаружены и идентифицированы кардиоактивные триптические фрагменты, показано участие этих биологически активных соединений в ряде метаболических процессов: ингибции Ca^{2+} -тока, регуляции внутриклеточного уровня циклических нуклеотидов, гликолизе и гликогенолизе, высвобождении и захвате катехоламинов.

Совокупность приведенных данных свидетельствует о том, что эти гликопротеины являются не только носителями, но и предшественниками некоторых биологических соединений, включая прогормональные формы нейротропных гормонов «К», «С» и «Г».

Котрансляционное и/или посттрансляционное гликозилирование полипептидных цепей является основным результатом модификации

макромолекулярной структуры и/или функции ферментов, рецепторных молекул и других функциональных белков, участвующих в различных клеточных процессах. Среди модифицированных гликопротеинов наиболее изученными в функциональном отношении (в особенности в дифференциации или развитии клетки) являются (фуко)-гликопротеины. Впрочем, вопрос биосинтеза олигосахаридной цепи и механизм влияния его модификаций на фукозилрование гликопротеина остается еще в значительной степени не выясненным [7—9]. Меченая L-фукоза, как оказалось, является удобной моделью предшественника для изучения изменений в биосинтезе (фуко)-гликопротеинов, так как, по-видимому, не включается интенсивно в другие гликоконъюгаты [10]. Включение фукозы в гликопротеин является последним этапом, завершающим процессинг олигосахаридной цепи. При этом перемещение фукозы под действием фукозилтрансферазы в терминальный невосстановленный остаток [11] олигосахаридной цепи происходит после ее активации под действием специфических фукокиназ [12, 13].

Исходя из участия в ряде метаболических процессов упомянутых выше гипоталамических белок-гормональных комплексов, мы предположили о возможном моделирующем действии этих нейрогормонов, их предшественников и препрогормональных форм на фукозилрование гликопротеинов мозга и на активность фукокиназы, что стало целью настоящего исследования.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на 7-недельных крысах-самцах линии *Wistar* массой 210—240 г. Их содержали в стандартных лабораторных условиях группами по 10 особей в клетке без ограничений пищи и воды. После декапитации из гиппокампа готовили срезы толщиной 0,5 мм, нарезаая структуру перпендикулярно к ее продольной оси. В каждом эксперименте инкубировали по 3 среза из одного гиппокампа в контрольных условиях и при наличии исследуемых веществ. После предварительной инкубации в течение 15 мин в 0,8 мл инкубационной среде, содержащей (в мМ) NaCl —134, NaHCO_3 —16, CaCl_2 —0,75; KH_2PO_4 —1,24, MgSO_4 —1,3, глюкозы—10, pH —7,4, исследуемые образцы добавляли к инкубационной среде в объеме 100 мкл. Среда контрольных срезов доводили до общего объема 0,9 мл. Спустя 10 мин добавляли 2 мкМ L-[6- ^3H] фукозы (16,8 Ки/ммоль; «New England Nuclear») в инкубационную среду. Конечная концентрация меченого предшественника составляла 10 мМ. В ходе эксперимента инкубационную среду аэрировали (95% O_2 , 5% CO_2); время включения меченой фукозы составляло 1 ч. Далее проводили гомогенизацию тканевых срезов в 0,3 мл 0,1 н. NaOH . Белки осаждали добавлением к 0,2 мл гомогената 0,5 мл охлажденной во льду 12%-ной ТХУ. Полученный осадок промывали последовательно дважды 6%-ной ТХУ, водой, этанолом и растворяли в 0,3 мл гидрохлорида гуанина при 50°. Радиоактивность препаратов, растворенных в смеси диоксана, содержащего сцинтиллятор (6 г РРО, 0,2 РОРОР, 100 г нафталина) в соотношении 1:1, измеряли на сцинтилляционном спектрометре. Содержание белка в препаратах определяли по методу Lowry и соавт. [14], где в качестве стандарта использовали БСА. Чтобы вычислить скорость включения (пмоль фукозы/мг белка/ч), удельная радиоактивность всех белков (д. р. в мг $^{-1}$) была скорректирована величиной радиоактивного предшественника в инкубационной среде с использованием следующего уравнения:

$$R = \frac{d.p.m. \times \text{мг белок} - 1 \times r - 1}{d.p.m. \times \text{пмоль предшественник}^{-1} (\text{среда})}$$

где iR — нерастворимый белок, r — число распад в мин.

Активность фукокиназы (В. С. 2. 7. 1. 52) определяли путем измерения перехода $[^{14}\text{C}]$ 1-фукозы в $[^{14}\text{C}]$ фукозу-1-фосфат, в растворимой фракции ткани головного мозга крыс, по методу, описанному в литературе для различных тканей [12, 15, 16], и модифицированному нами применительно к ткани головного мозга [17]. Ткань головного мозга крыс гомогенизировали в 9 объемах 77,5 мМ TAPS буфера, pH 8,5. Гомогенат центрифугировали при 20000 g в течение 45 мин. Полученная надосадочная жидкость служила источником фермента. 200 мл этой фракции доводили до 320 мл инкубационной смеси, содержащей в мМ: TAPS—50; ATP—4,8; MgSO_4 —5,8; KF—84 и 33 μM 1-фукозы- $[^{14}\text{C}]$ (57 мКи/ммоль; («Radiochemical Centre Amersham», Англия), разбавленный 1-фукозой до 10 м Ди/ммоль). После 45 мин инкубации при 37° ферментативную реакцию прекращали, смесь переносили на колонку с Dowex (2×8, 200—400 меш, 30×5 мм), активировали 10 мл раствора, содержащего 190 г формата аммония и 54 г 85% муравьиной кислоты на 1 л, pH 7,5. После этого колонку промывали 10 мл 10 мМ формата аммония, pH 7,5 и 0,5 мл раствора, содержащего 0,1 М HCl и 0,2 М KCl, для удаления непревращенной $[^{14}\text{C}]$ фукозы. Далее 1- $[^{14}\text{C}]$ фукоза-1-фосфат элюировали 2 мл раствора, содержащего 0,2 М HCl и 0,2 М KCl. К 1 мл полученного элюата прибавляли 1 мл воды и 12,5 мл диоксиана, содержащего сцинтиллятор, и измеряли в жидком сцинтилляционном спектрометре. Активность фукокиназы выражали в пкмоль $[^{14}\text{C}]$ фукоза-1-фосфат/мг белка/ч.

Результаты и обсуждение

При исследовании влияния нейрогомона (НК_3), белков-носителей (БНК, БНГ) и их трипептических фрагментов (ТфБНГ, ТфБНГ₅) на фукозилрование гликопротеинов гипокампа крыс было найдено значительное уменьшение включения фукозы при инкубировании тканевых срезов в присутствии 0,1 μM ТфБНГ₅ и 10 μM БНГ (рис. 1). Остальные соединения не оказывали заметного влияния на включение $[^{14}\text{H}]$ фукозы в гликопротеины гипокамальных срезов.

Как видно из рис. 2, БНГ, который уменьшал в значительной мере фукозилрование гипокамальных гликопротеинов, вызывает в тех же концентрациях ярко выраженное ингибирование активности фукокиназы. Остальные исследуемые кардиоактивные соединения не изменяли активности фукокиназы. С учетом литературных данных [17, 18], свидетельствующих о многоэтапном процессе превращений фукозы перед включением в гликопротеины, и вышеописанных фактов можно допустить, что ингибирующее действие БНГ на активность фукокиназы и соответственно фукозилрование гипокамальных гликопротеинов происходит на I этапе превращения фукозы — образовании фукозы-1-фосфата.

Известно много работ о взаимосвязи процессов фукозилрования и механизмов, лежащих в основе формирования длительной памяти [17, 19—21, 26]. Одновременно установленные взаимосвязь и взаимодействие нейропептидов и «классических» нейромедиаторов в деятельности мозга также делают правомочным постановку вопроса, об их роли в интегративных процессах обучения и памяти [25, 24].

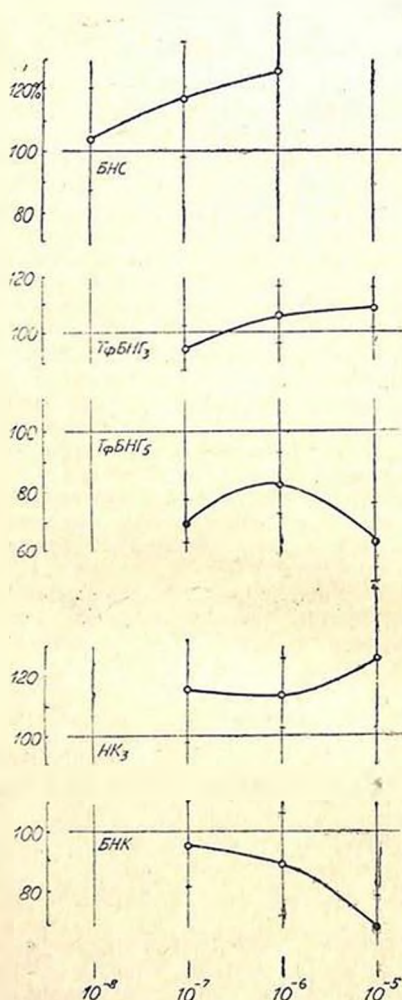


Рис. 1. Действие кардиоактивных соединений на включение фукозы в гиппокампальные срезы ($n=6$). Здесь и на рис. 2 по оси абсцисс — концентрация исследуемых веществ, в М. БНС — белок-носитель нейрогормона «С», ТФБНГ₃ — триптический фрагмент белка-носителя нейрогормона «Г₃», ТФБНГ₅ — триптический фрагмент белка-носителя нейрогормона «Г₆», НК₃ — нейрогормон «К₃», БНК — белок-носитель нейрогормона «К».

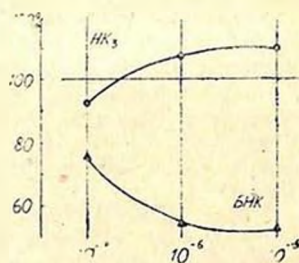


Рис. 2. Действие кардиоактивных соединений на изменение активности фукокиназы

В свете сказанного представляют интерес полученные нами ранее данные, демонстрирующие участие кардиоактивных соединений мозга в пресинаптической регуляции высвобождения катехоламинов. Изучение влияния этих соединений на нейромедиаторные соединения мозга может способствовать выявлению механизмов их действия на процессы обучения и памяти. Исследования в этом направлении были связаны с разработкой поведенческих методик [22, 23].

Полученные результаты свидетельствуют о корреляции специфического ингибирования фукозилирования гилпокампаальных гликопротеинов и потери памяти под действием БНК.

В сочетании с вышеприведенными данными результаты исследования поведенческих навыков и формирования соответствующих следов памяти могут служить признаком участия кардиоактивных БГК в механизмах их регуляции различных форм деятельности мозга.

Авторы приносят свою благодарность Ангелике Райхел за техническую помощь.

INFLUENCE OF HYPOTHALAMIC PROTEIN-HORMONE COMPLEXES ON HIPPOCAMPAL GLYCOPROTEIN FUCOSYLATION

SAHAKIAN S. A., *GRECKSCH G., SAHAKIAN F. M., SRAPIONIAN R. M.,
**JORK R., GALOYAN A. A., **MATTHIES H.

G. Ch. Bunatyan Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Armenian SSR, Yerevan, *Institute of Pharmacology and Toxicology, Medical Academy Magdeburg, G DR, **Institute of Neurobiology and Brain Research, Academy of Sciences of the GDR, Magdeburg, GDR

We have studied the effect of several cardioactive hypothalamic compounds on fucosylation of glycoproteins in rat hippocampus. We have established that one form of neurohormone K (nK_3) is a strong fucosylation inhibitor. Similar data were obtained when the effect of this compound on fucosinase activity was studied. We have evidence that PCK, precursor and protein carrier of neurohormone K, may play a part in learning and memory.

ЛИТЕРАТУРА

1. Галоян А. А. ДАН АрмССР, т. 38, № 4, с. 305—308, 1964.
2. Галоян А. А. ДАН АрмССР, т. 34, № 3, с. 157—159, 1962.
3. Срапионян Р. М. Нейрохимия, т. 6, с. 109—116, 1987.
4. Galoyan A. A., Srapionian R. M. Neurochem. Res., v. 8, p. 15—15.5, 1983.
5. Galoyan A. A. Neurochem. Res., v. 11, p. 769—787, 1985.
6. Срапионян Р. М., Саакян С. А., Саакян Ф. М., Галоян А. А. Нейрохимия, т. 1, с. 263—271, 1983.
7. Gool H. C., Felzi I., Kapadia A., Knowles B. B., Solter D., Evans M. J. Nature, v. 292, p. 156—158, 1981.
8. Minter L. N., Erickson P. F., Lusher R. S. Dev. Brain. Res., v. 4, p. 13—21, 1982.
9. Spooner E., Fukuda M., Klock J. C., Oates J., Dell A. J. Biol. Chem., v. 259, p. 4792—4801, 1984.
10. Sturgess J. M., Minaker E., Mitranic M. M., Moscarello M. A. Biochim. Biophys. Acta, v. 320, p. 123—132, 1973.
11. Broquet P., Perez-Gonzalez M. N., Louisot P. J. Neurochem., v. 32, p. 599—606, 1979.

12. *Ishihara H., Massaro D. J., Heath E. C. J. Biol. Chem.*, v. 243, p. 1103—1109, 1968.
13. *Ishihara H., Heath E. C. J. Biol. Chem.*, v. 243, p. 1110—1115, 1968.
14. *Lowry O. H., Rosebrough H. L., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265—275, 1951.
15. *Kilker R. D., Shuey D. K., Serif G. S. Biochem. Biophys. Acta*, v. 570, p. 271—283, 1979.
16. *Richards W. L., Serif G. S. Biochim. Biophys. Acta*, v. 404, p. 353—367, 1977.
17. *Popov N., Matthies H.* —In: *Neurobiology of Hippocampus* (ed. W. Selfert), p. 473—487, 1983.
18. *Jork R., Sehmitt M., Lossner B., Matthies H. Biomed. Biochim. Acta*, v. 43, p. 261—270, 1984.
19. *Matthies H.* —In: *Neuronal Plasticity and Memory Formation* (eds. C. Marsan, H. Matthies), p. 1—5, New York, Raven Press, 1982.
20. *Popov N., Ruthrich H. L., Pohle W., Schulzeck, Matthies H. Brain Res.*, v. 101, p. 295—304, 1976.
21. *Rose S. P. R.* —In: *Neural Mechanisms of Conditioning* (eds. D. L. A'kon, C. D. Woody) p. 233—247, New York, Plenum press, 1985.
22. *Jork R., Grecksch G., Matthies H. Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 25, p. 1137—1144, 1986.
23. *Rose S. P. R., Jork R. Behav. Neural Biol.*, v. 48, p. 246—258, 1987.
24. *Булаев В. М., Раевский К. С. Успехи физиол. наук*, т. 14, № 4, с. 65—82, 1982.
25. *Krieger D. T. Sciences*, v. 222, p. 975—985, 1982.
26. *Sukumar R., Rose S. P. R. J. Neurochem.*, v. 34, p. 1000—1006, 1980.

Поступила 16.IV.1990



УДК 612.822.1:577.157

РАЗЛИЧИЯ В СТАБИЛЬНОСТИ $\alpha\alpha$ И $\gamma\gamma$ ИЗОФЕРМЕНТОВ ЕНОЛАЗЫ МОЗГА ПРИ ИНКУБАЦИИ С НЕЙТРАЛЬНЫМИ СОЛЯМИ

НАЗАРЯН К. Б., КАРАПЕТЯН Н. Г., КАЗАРЯН Б. А.

Институт экспериментальной биологии АН Армении, Ереван

Показано, что нейроспецифический изофермент енолазы $\gamma\gamma$ обладает большей по сравнению с нейронеспецифической $\alpha\alpha$ -формой устойчивостью к инактивирующему действию солей одновалентных металлов в различных условиях, в том числе и близких к физиологическим. Установлено, что причиной инактивации ферментов является диссоциация димеров енолазы на мономеры.

Енолаза (2 фосфоглицерат лиаза КФ 4.2.1.11) в ЦНС млекопитающих представлена двумя гомодимерными изоферментами $\alpha\alpha$ и $\gamma\gamma$, являющимися продуктами различных генов. $\gamma\gamma$ Енолаза (нейроспецифическая енолаза) в норме локализована исключительно в нейронах и некоторых клетках нейроэктодермального происхождения. $\alpha\alpha$ Енолаза (нейронеспецифическая енолаза) обнаружена в основном в глиальных элементах. Она сходна с енолазой печени и других органов [1, 2]. Биологическая целесообразность существования в ЦНС иммунологически отличных двух изоферментов енолазы, один из которых уникален для НС, остается невыясненной.

Изучение физико-химических и каталитических свойств енолазы показало, что $\alpha\alpha$ и $\gamma\gamma$ изоферменты имеют очень близкую молекулярную массу, одинаковый субъединичный состав, но сильно различаются по значению ИЭТ—7,0 и 5,2 соответственно [3, 4]. Величина К для субстратов—2 фосфоглицерата и фосфоенолпирувата, рН и температурный оптимумы катализируемой реакции существенно не отличаются [5]. Рядом авторов выявлена большая устойчивость $\gamma\gamma$ енолазы к инактивирующему действию солей, температуры, давления [6—8]. Однако по какому механизму происходит инактивация и в чем причина большей устойчивости $\gamma\gamma$ изофермента до настоящего времени не было известно. Кроме того, не ясно, имеют ли место установленные эффекты , , , , поскольку они получены в условиях, далеких от физиологических.

Поэтому целью настоящей работы была попытка установить возможный механизм инактивации $\alpha\alpha$ и $\gamma\gamma$ изоферментов енолазы нервной ткани при воздействии на них высоких концентраций солей одновалентных металлов, а также изучить действие указанных солей на устойчивость изоферментов в модельных условиях, близких к физиологическим.

Для получения $\alpha\alpha$ и $\gamma\gamma$ изоферментов ендолазы использовали ткани головного мозга крупного рогатого скота. Очистку проводили по методике, описанной ранее [11]. Мозг очищали от бесуднейных оболочек, гомогенизировали в 0,01 М трис-фосфатном буфере (pH 7,4) с 3 мМ MgSO_4 (буфер «А»), центрифугировали 60 мин при 6000 г. Из экстракта водорастворимых белков получали фракцию (Р-60) при насыщении сульфатом аммония от 40 до 60%. ИОХ проводили на колонках с ДЭАЭ-ц (pH 7,4 и pH 5,3) КМ-целлюлозой (pH 6,5). Дальнейшую очистку проводили методом гелевой фильтрации на сефадексе G-150 и препаративного электрофореза в блоке с ПААГ. Белок определяли по методу Lowry. Енолазную активность определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 240 нм, используя в качестве субстрата натриевую соль 2 фосфоглицериновой кислоты («Boeringer», ФРГ).

Гель-фильтрацию проводили в колонке 1,5×80 см с сефадексом G-150 («Pharmacia», Швеция). Гель уравнивали 0,01 М трис-фосфатным буфером, pH 7,4. Для изучения действия солей на процесс диссоциации изоферментов готовили подобные колонки, уравнированные буферами: а) 0,01 М трис-фосфат, pH 7,4 с 1 М NaCl; б) 0,01 М трис-фосфат, pH 7,4 с 1 М LiCl. На колонку наносили 2 мл пробы, содержащей 1 мг фермента и 5 мг БСА в качестве маркера. Элюцию проводили соответствующим буфером со скоростью 8 мл/ч. Измеряли объем элюции белков с колонки. БСА выходит в определенном объеме, независимо от буфера, в то время как объем элюции ендолазы с колонки увеличивается в присутствии солей. Проводили также серию подобных экспериментов с 3 мМ MgSO_4 .

Дифференциальные спектры измеряли на спектрофотометре Specord M-40 («Carl Zeiss», ГДР). Для компенсации поглощения буфера в растворах соли спектры снимали в системе из четырех кювет (две контрольные и две—для сравнения) с длиной оптического пути по 10 мм [10]. Перед измерениями проверяли равенство оптических плотностей кювет, заполняя их попарно раствором буфера. Исследуемые белковые растворы тщательно диализовали против буфера «А» и центрифугировали 30 мин при 22000 г. Концентрацию белка определяли по поглощению при 280 нм, соблюдая строгое равенство концентраций белка в обеих кюветах (0,3 мг/мл).

Дифференциальные спектры снимали после внесения в испытываемую белковую кювету 0,5 мл раствора NaCl так, чтобы конечная концентрация соли в кювете составляла 0,5 или 1 М. Для выравнивания концентраций белков во вторую кювету с ферментом добавляли 0,5 мл буфера, а для компенсации поглощения соли в контрольную кювету с буфером добавляли такой же объем раствора соли. Измерения проводили в кюветах, термостатированных при 37°. Полученные таким образом дифференциальные спектры для пары димер + соль—димер сравнивали с дифференциальными спектрами мономер—димер для обоих изоферментов. С целью получения мономеров (удаления Mg^{2+} к изоферментам ендолазы добавляли ЭДТА до концентрации 5 мМ (при этом поддерживали значение pH 7,4). Комплекс $\text{Mg} + \text{ЭДТА}$ удаляли посредством 8-дневного диализа при 4° с ежедневной сменой буфера (7 литров 0,01 М трис-фосфата, pH 7,4). Использовали пластиковую посуду и бидистиллированную воду. В пробах мономеров $\alpha\alpha$ и $\gamma\gamma$ изоферментов ендолазы определяли остаточный Mg^{2+} [11]. Электрофорез мономеров проводили в 7,5%-ном

ПААГ в присутствии 1 мМ ЭДТА. Гели денситометрировали на спектрофотометре Spescord M-40, в белковых срезах определяли енолазную активность.

Величины $K_{\alpha\alpha}$ и $\gamma\gamma$ изоферментов определяли после ковалентного связывания с ними флуоресцентного красителя флуоресцентной изотиоцианата (ФИТЦ), который практически не влияет на енолазную активность. Затем определяли анизотропию флуоресценции меченых белков [12] различных концентраций в 50 мМ имидазол- HCl , pH 7,3 с 3 мМ MgCl_2 , после чего рассчитывали величину $K_{\text{Усто}}$. Чистоту указанных изоферментов в условиях, моделирующих физиологические, определяли после их инкубирования в среде с 0,01 М фосфатным буфером, pH 7,0, 0,15 М KCl при 38°. Содержание белка в среде было 10 мМ [13—15].

Результаты и обсуждение

В предыдущей работе нами показано, что $\alpha\alpha$ и $\gamma\gamma$ изоферменты енолазы головного мозга крупного рогатого скота обладают неодинаковой устойчивостью к инактивирующему воздействию высоких концентраций солей одновалентных металлов [8]. Наиболее сильные различия в большей устойчивости $\gamma\gamma$ изофермента были выявлены при инкубации в растворах солей NaCl и KCl в диапазоне концентраций 0,8—1,2 М. Можно предположить, что эти различия объясняются неодинаковой степенью диссоциации димеров $\alpha\alpha$ и $\gamma\gamma$ в растворах с высокой ионной силой. Для проверки этого предположения в настоящей работе был использован метод гель-фильтрации на сефадексе G-150, уравновешенном 1 М раствором NaCl в 10 мМ трис-фосфатном буфере, pH 7,5 при 25°. Если при этом димер енолазы диссоциирует на мономеры, то есть равновесие типа $\text{димер} \rightleftharpoons 2 \text{ мономеры}$ смещается вправо, то наблюдается увеличение элюционного объема фермента. Другие эффекты типа конформационных изменений субъединиц фермента при этом ожидаются незначительные, так как показано, что мономер енолазы представляет собой плотно упакованную молекулу, которая не «разрыхляется» в растворе 1 М NaCl, а если даже подобное «разрыхление» имеет место [16], то это должно привести к уменьшению, а не увеличению объема элюции. Для более точного определения объема элюции в качестве «внутреннего» стандарта использовали раствор BSA, который как видно из рис. 1, а, не меняет объем элюции в присутствии 1 М NaCl. Как показано на рисунке, объем элюции $\alpha\alpha$ енолазы в растворе 1 М NaCl увеличивается на 12 мл по сравнению с контролем. Это свидетельствует в пользу предположения о смещении равновесия $\text{димер} \rightleftharpoons 2\alpha$ вправо. В то же время объем элюции $\gamma\gamma$ изофермента меняется лишь на 2,5 мл, то есть сдвиг равновесия $\gamma\gamma \rightleftharpoons \gamma + \gamma$ выражен значительно слабее. В литературе существуют данные, указывающие на то, что димер енолазы стабилизируется Mg^{2+} [17], следовательно, если указанный эффект связан с диссоциацией димерной молекулы енолазы на мономеры, то добавление в среду Mg^{2+} должно уменьшить изменение объема элюции. Действительно, как видно из рис. 1, б, увеличение объема элюции при гель-фильтрации в колонке, содержащей кроме вышеуказанных ингредиентов 3 мМ MgSO_4 , составляет всего 5 мл для $\alpha\alpha$ изофермента, а у $\gamma\gamma$ изофермента этот объем практически не меняется.

Как показано ранее, соли Li обладают наиболее сильным инактивирующим действием на оба изофермента енолазы, что обусловле-

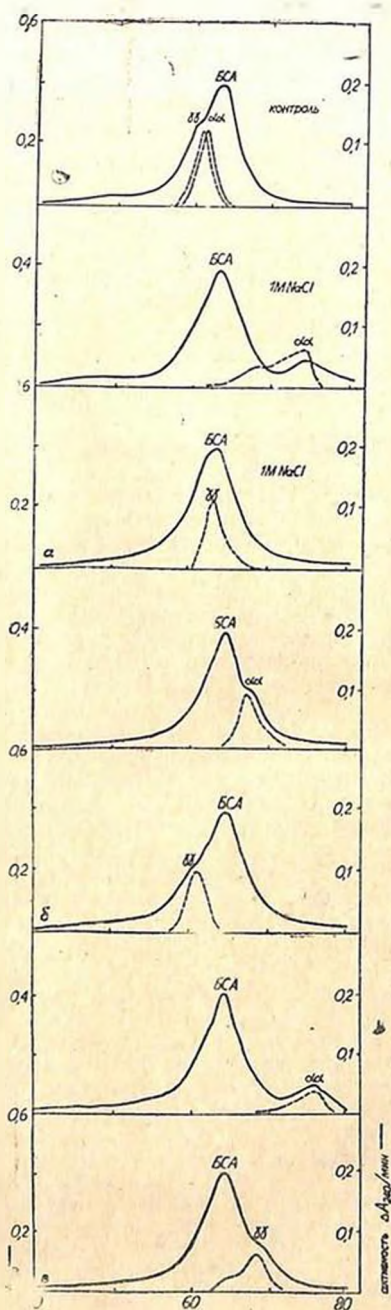


Рис. 1. Гель-фильтрация α и γ изоферментов енолазы. α —в присутствии 1 M NaCl, δ —1 M NaCl и ϵ —1 M $MgSO_4$, ζ —1 M LiCl. В контрольном варианте колонка не содержала соли. По оси абсцисс—объем элюции в мл

но, по всей видимости, особенностями его хаотропного действия [8]. Применение хлорида лития для проведения эксперимента, аналогичного вышеописанному, показало, что $\alpha\alpha$ и $\gamma\gamma$ изоферменты инактивируются в значительно большей степени, чем при воздействии NaCl (рис. 1, в). Однако максимальная разница в сдвиге объема элюции между $\alpha\alpha$ и $\gamma\gamma$ изоферментами наблюдается при использовании NaCl. Подобная картина была получена ранее при изучении действия этих солей на активность изоферментов енолазы. Исходя из этой серии экспериментов, можно с определенной вероятностью утверждать, что мономеры $\gamma\gamma$ енолазы ассоциированы в димер более прочно, чем $\alpha\alpha$ енолазы, а это является причиной большей устойчивости первой.

Для подтверждения предположения о том, что причиной инактивации енолазы является обратимая диссоциация димера, нами был применен метод дифференциальной спектроскопии, позволяющий непосредственно зарегистрировать изменение равновесия мономер—димер. Такая регистрация возможна только в случае наличия дифференциального спектра между мономером и димером изоферментов енолазы. Для получения мономеров препараты $\alpha\alpha$ и $\gamma\gamma$ изоферментов подвергали длительному диализу с ЭДТА для связывания Mg^{2+} который, по литературным данным, ответствен в основном за стабилизацию димерной структуры [17]. Полученные таким образом α и γ мономеры в паре с соответствующим димером $\alpha\alpha$ и $\gamma\gamma$ дают дифференциальные спектры в диапазоне длин волн 230—330 нм (рис. 2,

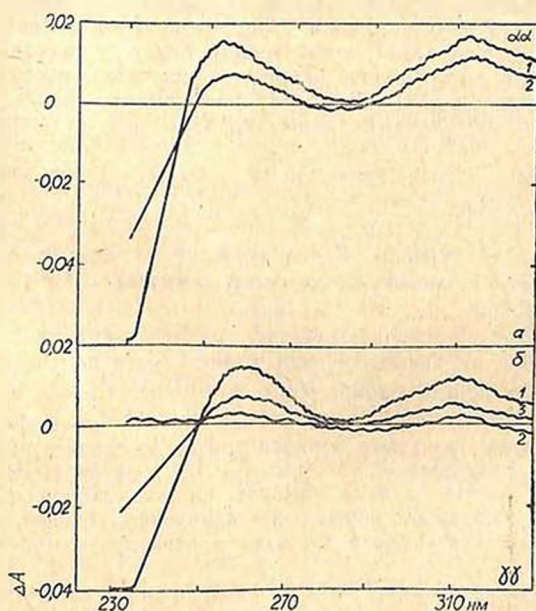


Рис. 2. Дифференциальные спектры изоферментов енолазы. а: 1—димер $\alpha\alpha$ против мономера α , 2—димер $\alpha\alpha$ против $\alpha\alpha+0,5$ М NaCl; б: 1—димер $\gamma\gamma$ против мономера γ , 2—димер $\gamma\gamma$ против $\gamma\gamma+0,5$ М NaCl, 3—димер $\gamma\gamma$ против $\gamma\gamma+1$ М NaCl

а, б). При этом максимумы дифференциальных спектров $\alpha\alpha$ изофермента регистрировались при 253 и 311 нм, а минимум—при 282 нм; для $\gamma\gamma$ изофермента максимумы наблюдались при 257 и 310 нм, а минимум—при 285 нм. Дифференциальные спектры димеров изоферментов, регистрируемые против соответствующих димеров, инкубированных в растворе NaCl, аналогичны дифференциальному спектру пары димер-мономер. Причем это сходство имеет концентрационную зависимость. Дифференциальный спектр $\alpha\alpha$ енолазы появляется при инкубации в растворе 0,5 М NaCl, в то время как спектр $\gamma\gamma$ енолазы в этих условиях имеет менее выраженные экстремумы, что свидетельствует о более сильном смещении равновесия димер $\rightleftharpoons$ 2 мономера в сторону образования мономера для $\gamma\gamma$ енолазы. Для $\gamma\gamma$ изофермента заметный дифференциальный спектр появляется лишь при увеличении концентрации NaCl до 1 М (рис. 4, б). Полученный эффект диссоциации димеров енолазы на мономеры, наблюдаемый через появление дифференциальных спектров качественно очень близок к эффекту изменения объемов элюции при гель-фильтрации на сефадексе G-150. Таким образом, при помощи двух независимых методов удалось показать более прочную ассоциацию $\gamma\gamma$ енолазы в димер по сравнению с $\alpha\alpha$ енолазой тканей головного мозга. Об этом также свидетельствуют изученные нами методом аннизотропии флуоресценции величины K_d $\alpha\alpha$ и $\gamma\gamma$ изоферментов. Ферменты метили ФИТИЦ при концентрации 20—40 мМ и разбавляли буфером, пока интенсивность флуоресценции образцов была определяемой. Измеряли изменение аннизотропии флуоресценции. При разбавлении меченых ферментов, то есть с уменьшением концентрации белка в кювете, наблюдалось уменьшение аннизотропии флуоресценции, что свидетельствует о диссоциации молекул [18]. Поскольку изоферменты енолазы являются димерами, то полученные данные сравнивались с теоретическими для равновесия типа димер $\rightleftharpoons$ 2 мономера. Расчеты показали, что димер $\alpha\alpha$ енолазы имеет значительно более низкую стабильность $K_d \cdot 3 \cdot 10^{-4}$ М в фосфатном буфере, в присутствии 3 мМ $MgCl_2$. Димер $\gamma\gamma$ енолазы в тех же условиях обладает высокой стабильностью и имеет $K_d \cdot 3 \cdot 10^{-3}$ М (рис. 3). Когда эксперимент повторяли в присутствии 50 мМ ЭДТА, молекулы которого связывали Mg^{2+} в среде, то процесс диссоциации димеров енолазы на мономеры наблюдался при более высоких концентрациях фермента. Так, для $\gamma\gamma$ енолазы K_d стала равна 10^{-4} М. Поскольку эти данные были получены без применения высоких концентраций солей, возможно, что они в некоторой степени отражают ситуацию *in vivo*. Если учесть, что физиологическая концентрация енолазы в нервной клетке составляет величину порядка 10^{-6} М, то очевидно, что при этом $\alpha\alpha$ и $\gamma\gamma$ изоферменты находятся большей частью в виде димеров. Однако полученные данные показали, что достаточно небольшого изменения условий, чтобы заметная часть $\alpha\alpha$ изофермента перешла в неактивное мономерное состояние.

Чтобы выяснить, имеет ли место диссоциация изоферментов енолазы на неактивные мономеры в физиологических условиях, был проделан следующий модельный эксперимент. Изоферменты енолазы в концентрации 10^{-6} М инкубировали в 0,01 М фосфатном буфере, рН 7,0 с 0,15 М KCl при температуре 38°. Максимальное время инкубации в этом растворе составляло 5 суток, так как время полужизни большинства белков не превышает этого срока. Как видно из рис.

$\gamma\gamma$ изофермент при таких условиях инкубации сохраняет свою первоначальную активность, в то время как $\alpha\alpha$ изофермент практически полностью инактивируется. Исходя из этого эксперимента, можно предположить, что и в физиологических условиях в нейронах и в нейроглии $\gamma\gamma$ енoлаза обладает большей устойчивостью к инактивации, которая, вероятно, происходит по уже изученному механизму диссоциации на ферментативно неактивные мономеры.

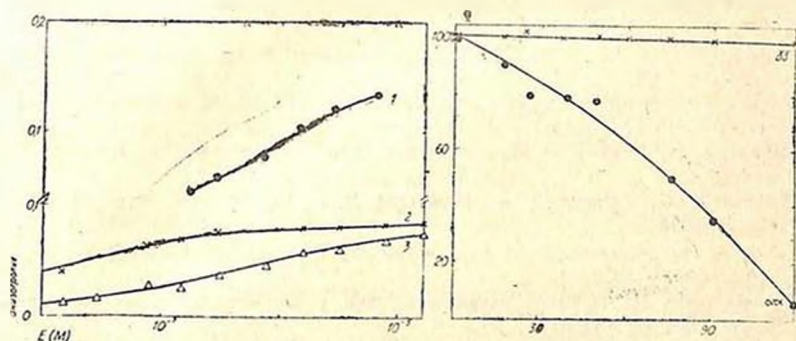


Рис. 3. Зависимость аннотропии флуоресценции меченых ФИТЦ изоферментов енoлазы от концентрации фермента. 1— $\alpha\alpha$ в присутствии 3 мМ $MgCl_2$, 2— $\gamma\gamma$ в присутствии 3 мМ $MgCl_2$, 3— $\gamma\gamma$ в присутствии 3 мМ $MgCl_2$ и 50 мМ ЭДТА в нейтральном буфере, pH 7,3 при 20°. Величина K_d димера $\rightarrow$ 2 мономера для случаев 1, 2, 3 равны $3 \cdot 10^{-6}$, $3 \cdot 10^{-6}$, $3 \cdot 10^{-6}$, 10^{-6} М соответственно

Рис. 4. Енoлазная активность $\alpha\alpha$ и $\gamma\gamma$ (в %) изоферментов при инкубации в присутствии физиологической концентрации KCl. По оси абсцисс—время инкубации, ч

Таким образом, можно утверждать, что $\gamma\gamma$ изофермент енoлазы является более устойчивым не только к воздействию высокой ионной силы, но и в условиях, близких к физиологическим. $\alpha\alpha$ Изофермент является более лабильным и имеет величину K_d на два порядка выше, чем $\gamma\gamma$ изофермент. Какие биологические преимущества дает это качество нейроспецифической енoлазы, с определенностью утверждать трудно. Во всяком случае, это одно из значительных функциональных различий $\gamma\gamma$ енoлазы, в некоторой степени объясняющее причину ее существования в ЦНС.

DIFFERENCES IN STABILITY OF $\alpha\alpha$ - AND $\gamma\gamma$ -ENOLASE ISOZYMES OF THE BRAIN DURING INCUBATION WITH NEUTRAL SALTS

NAZARYAN K. B., KARAPETYAN N. G., KAZARYAN B. A.

Institute of Experimental Biology, Academy of Sciences of the Armenia, Yerevan

$\gamma\gamma$ -Enolase, a neurospecific isozyme, has a higher stability (as compared with the $\alpha\alpha$ -form, a non-neuronospecific enzyme) to the inactivating effect of monovalent metal ions under various conditions including conditions similar to the physiological ones. The inactivation is due to dissociation of dimeric enzymes into monomers.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Schmechel D. E.* Lab Invest., v. 52, p. 239—242, 1985.
2. *Zomzely-Neurath C. E.* —In: Handbook of Neurochemistry (ed. A. Laittha), v. 4, p. 403—433, N. Y., Plenum Press, 1983.
3. *Marangos P. J., Zomzely-Neurath C. E., Goodwin F. K. J.* Neurochem., v. 28, p. 1097—1107, 1977.
4. *Назарян К. Б., Казарян Б. А., Карапетян Н. Г.* Нейрохимия, т. 4, с. 410—414, 1985.
5. *Marangos P. J., Zis A. P., Clark R. L., Goodwin F. K.* Brain Res., v. 150, p. 117—134, 1978.
6. *Kornblatt L., Kornblatt J., Hui Bon Hoa G.* Eur. J. Biochem., v. 128, p. 577—581, 1982.
7. *Marangos P. J., Parma A. M., Goodwin F. K. J.* Neurochem., v. 31, p. 727—732, 1978.
8. *Назарян К. Б., Казарян Б. А., Карапетян Н. Г.* Укр. биохим. журн., т. 58, с. 72—76, 1986.
9. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
10. *Волькенштейн М. В.* Итоги науки и техники, серия «Молекулярная биология», с. 216—285, М., МИНИТИ, 1973.
11. *Tabata M., Aito T., Totani M., Murachi T.* Clin. Chem., v. 31, p. 703—705, 1985.
12. *Лакович Д.* —В кн.: Основы флуоресцентной спектроскопии, с. 156—160, М., Мир, 1986.
13. *Csaba L., Paschen W., Hossman K.-A.* Brain Res., v. 269, p. 334—337, 1983.
14. *Немечек С.* Введение в нейробиологию, Прага, Авиченум, 1978.
15. *Иванов К. П.* Биоэнергетика и температурный гомеостазис, с. 65—98, Л., Наука, 1972.
16. *Gawronski T. H., Westhead E. W.* Biochem., v. 8, p. 4261—4270, 1969.
17. *Brewer I. M., Weber G. J.* Biol. Chem., v. 241, 2550—2557, 1966.
18. *Tomba P., Bär J., Batke J.* Eur. J. Biochem., v. 159, 117—124, 1986.

Поступила 14.II.1990



УДК 577.151.042

ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ
МЕМБРАНОСВЯЗАННОЙ ФОСФАТЗАВИСИМОЙ
ГЛУТАМИНАЗЫ СИНАПТОСОМ И МИТОХОНДРИИ КОРЫ
ГОЛОВНОГО МОЗГА.

АМБАРЦУМЯН В. Г., ВАРТАНЯН А. Г., ОГАНЕСЯН В. С.

Институт биохимии им. Г. Х. Бунятыана АН Армении, Ереван

Установлено, что стимулирующее действие цитрата (ЦТ), малеата (МТ), сукцината (СК), N-ацетил-L-аспартата (ААК) и аспартата (АК) на активность мембраносвязанной фосфатзависимой глутаминазы (ФЗГ) митохондрий в присутствии низких концентраций L-тироксина (T_4) и 3,3',5-трийод-L-тиронина (T_3) потенцируется сильнее, чем при применении высоких концентраций гормонов. Однако в синапсосомах усиление эффекта всех испытанных модуляторов наблюдается только при применении высоких концентраций T_4 и T_3 , а в присутствии низких концентраций гормонов действие СК, ААК и АК вообще не потенцируется.

При сочетании применении АК, ААК, СК, ЦТ и МТ с фосфатом в митохондриях происходит 2-3-кратное усиление их действия на активность фермента, между тем как в синапсосомах действие этих соединений в присутствии фосфата не потенцируется.

Показано, что как в синапсосомах, так и в митохондриях усиление действия ЦТ, МТ и других модуляторов наблюдается в присутствии сравнительно низких концентраций 3,3',5-трийодтиреоуксусной кислоты (T_3 УК), а при применении высоких концентраций T_3 УК (0,1 мкмоль/мл), в отличие от действия T_4 и T_3 , полностью исчезает эффект потенцирования и активность фермента падает до исходного уровня.

Полученные данные указывают на неидентичность регуляторных свойств мембраносвязанной ФЗГ синапсосом и митохондрий.

В мозговой ткани деамидирование глутамина в основном осуществляется ФЗГ, которая локализована как в синапсосомах, так и в митохондриях.

В синапсосомах она представлена только в мембраносвязанной форме, а в митохондриях как в связанной, так и в растворимой формах [1]. Регуляция активности глутаминазы с участием модуляторов различной физиологической природы носит сложный и поливалентный характер [2—6]. Установлено, что тиреоидные гормоны ТГ являются эффективными аллостерическими модуляторами этого фермента и, обладая специфическим действием, занимают центральное место в регуляции активности как мембраносвязанной, так и растворимой ФЗГ мозга и почек крыс [6—9]. Мембраносвязанная ФЗГ синапсосом и митохондрий по своим регуляторным и кинетическим свойствам во многом принципиально отличается от растворимой формы этого фермента [6, 9, 10]. Кроме того, обнаружены отличия и в

регуляторных свойствах глутаминазы митохондриальной и синапсомной фракции [10].

Настоящие исследования проводились с целью выявления новых отличительных особенностей регуляции активности мембраносвязанной ФЗГ синапсом и митохондрий с участием различных модуляторов как гормональной, так и негормональной природы.

Материалы и методы

В качестве источника фермента использовали синапсомную и митохондриальную фракции, полученные из коры мозга крыс. Для получения синапсом и очищенных митохондрий, грубую митохондриальную фракцию, выделенную по ранее описанной методике [11], подвергали дифференциальному центрифугированию в градиенте плотности сахарозы по методу Whittaker [12]. Полученные митохондриальную и синапсомную фракции суспензировали в 0,2 М трис-НСl буфере, замораживали и размораживали при -20° 6 раз. С целью освобождения от растворимой глутаминазы суспензии центрифугировали при 17000 g 30 мин. Полученный осадок митохондрий и синапсом суспензировали в 0,2 М трис-НСl буфере из расчета 600, 700 мкг белка в 0,5 мл соответственно и использовали в качестве источника фермента.

Количество белка в фракциях определяли по методу Lowry и соавт. [13]. Инкубационная среда в объеме 1,5 мл содержала 0,5 мл ферментного препарата, 20 мМ L-глутамин; в зависимости от поставленной задачи в нее добавляли активаторы T_4 («Reanal», Венгрия), T_2 , T_3 УК («Sigma», США), АК, ААК, СК, ЦТ, МТ и $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ в различных концентрациях.

Реакционную смесь инкубировали 15 мин при 37° и постоянным встряхиванием. Реакцию останавливали добавлением 0,3 мл 10%-ной ТХУ. О глутаминазной активности судили по количеству образовавшегося аммиака, который определяли методом Зелингсона в модификации Силаковой и соавт. [14].

Результаты и обсуждение

В первой серии опытов нами было изучено влияние АК, ААК, СК, ЦТ и МТ на активность мембраносвязанной ФЗГ синапсом и очищенных митохондрий мозга крыс в присутствии T_4 , T_2 и T_3 УК. Результаты этих исследований представлены на рис. 1, 2 и 3. Первоначальные точки кривых показывают активность фермента в присутствии АК, ААК, СК, ЦТ и МТ, добавленных в отдельности. Как можно заметить, вышеуказанные соединения в отсутствие ТГ стимулируют активность как синапсомной, так и митохондриальной глутаминазы. Среди использованных соединений наиболее эффективными оказались ЦТ и МТ, а наименее—АК. При одновременном добавлении АК, ААК, СК, ЦТ и МТ с различными концентрациями ТГ как в синапсомах, так и в митохондриях происходит заметное потенцирование их стимулирующего действия. Однако, как видно из приведенных данных, потенцирование как в синапсомах, так и в митохондриях в зависимости от концентрации ТГ и от природы второго модулятора происходит в различной степени. Так, в синапсомах в присутствии низкой концентрации T_4 и T_3 (0,0125 мкмоль/мл) заметное потенцирование наблюдается только при применении ЦТ и МТ, а при добавлении остальных модуляторов активность фермен-

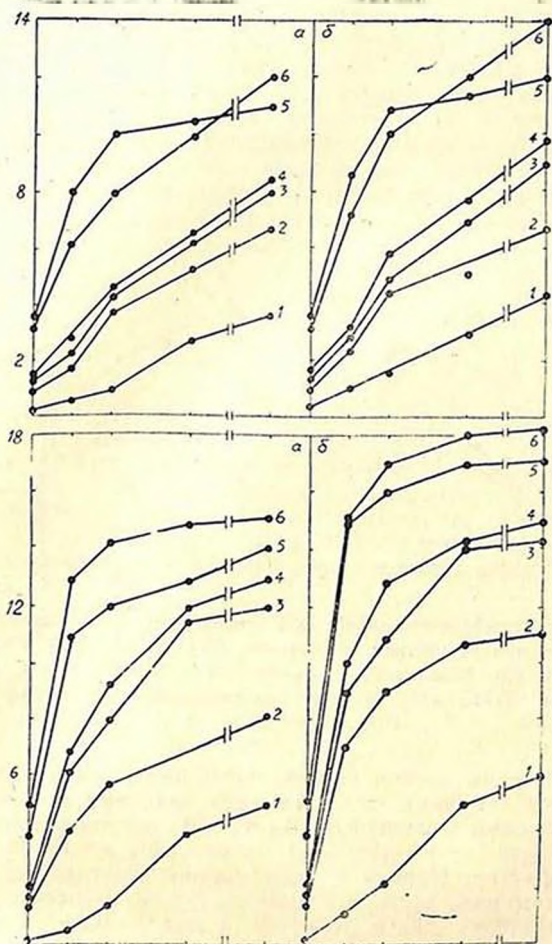


Рис. 1. Действие АК, ААК, СК, ЦТ и МТ (25 мкмоль/мл) на активность мембраносвязанной ФЗГ синапсом в присутствии различных концентраций T_4 (а) и T_3 (б), рН 8,0. 1—контроль; 2—АК; 3—ААК; 4—СК; 5—ЦТ; 6—МТ. По оси абсцисс—концентрация тиреоидных гормонов, мМ; по оси ординат—активность фермента, мкмоль NH_3 /мг белка, $n=10$

Рис. 2. Действие АК, ААК, СК, ЦТ и МТ (25 мкмоль/мл) на активность мембраносвязанной ФЗГ очищенных митохондрий в присутствии различных концентраций T_4 (а) и T_3 (б), рН 8,0. 1—контроль; 2—АК; 3—ААК; 4—СК; 5—ЦТ; 6—МТ. По оси абсцисс—концентрация тиреоидных гормонов, мМ; по оси ординат—активность фермента, мкмоль NH_3 /мг белка, $n=10$

та возрастает лишь за счет суммирования их эффекта, между тем как в митохондриях (рис. 2, а, б) в присутствии этой же концентрации T_4 и T_3 потенцирование наблюдается со всеми испытанными эффекторами, а при одновременном применении АК ААК и СК с низкой концентрацией как T_4 , так и T_3 , в отличие от синапсом, происходит

многократное усиление их эффекта. Действие остальных модуляторов потенцируется заметно слабее. В то же время при концентрации ТГ, равной 0,025 мкмоль/мл, как в синапсосах, так и в митохондриях потенцирование наблюдается со всеми применяемыми модуляторами независимо от их природы и проявляется примерно в одинаковой степени. При дальнейшем повышении концентрации ТГ степень потенцирования со всеми модуляторами и в синапсосах, и в митохондриях постепенно уменьшается, а уровень активности практически

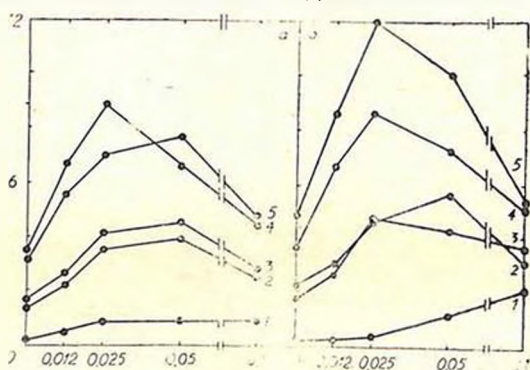


Рис. 3. Активность мембраносвязанной ФЗГ синапсосом (а) и очищенных митохондрий (б) мозга при совместном применении Т₃УК с АК, ААК, СК, ЦТ и МТ (25 мкмоль/мл) рН 8,0. 1—контроль; 2—ААК; 3—СК; 4—МТ; 5—ЦТ. По оси абсцисс—концентрация Т₃УК, мМ; по оси ординат—активность фермента, мкмоль NH₃/мг белка, n=8–10

не меняется. С точки зрения поставленной перед нами задачи, интерес представляет тот факт, что в синапсосах при применении АК, ААК и СК с низкими концентрациями Т₄ и Т₃ потенцирования не происходит и, в отличие от митохондрий, их действие в этом случае носит аддитивный характер. Наряду с этим можно заметить, что митохондриальная глутаминаза обладает более высокой чувствительностью к совместному действию ЦТ и МТ с ТГ и имеет более высокое значение V_{max}.

Примечательно, что, в отличие от мембраносвязанной ФЗГ, растворимая глутаминаза мозга практически не активируется ЦТ, МТ, АК, ААК, СК, АК и ТГ, добавленными в отдельности. Однако при сочетании применения этих соединений с Т₃ происходит очень резкое повышение активности фермента, а при их одновременном применении с Т₄ не наблюдается сколько-нибудь заметного стимулирования активности глутаминазы [6, 9]. Показано, что кинетика активации мембраносвязанной ФЗГ фосфатом также отличается от растворимой формы фермента [15, 16].

В следующей серии опытов изучили влияние АК, ААК, СК, ЦТ и МТ на активность мембраносвязанной ФЗГ синапсосом и митохондрий в присутствии Т₃УК. Результаты этих исследований, приведенные на рис. 3, а, б, показывают, что действие указанных модуляторов на активность мембраносвязанной ФЗГ синапсосом и митохондрий в присутствии Т₃УК в зависимости от ее концентрации проявляется по-разному. Как в синапсосах, так и в митохондриях мак-

симальное усиление действия ЦТ, МТ и других модуляторов в присутствии T_3UK происходит при ее концентрации, равной 0,025 мкмоль/мл, и по сравнению с эффектом T_4 и T_3 оно выражено несколько слабее. Однако, в отличие от действия T_4 и T_3 , при применении сравнительно высоких концентраций T_3UK (0,1 мкмоль/мл) эффект потенцирования полностью исчезает и активность фермента падает до исходного уровня.

Из приведенных данных видно, что в регуляции активности мембраносвязанной ФЗГ синапсом и митохондрий с участием T_3UK и других модуляторов нет никаких отличий. Однако исследования, проведенные с растворимой глутаминой показали, что стимулирующее действие ЦТ, МТ и других эффекторов при применении высоких концентраций T_3UK подчиняется иным закономерностям. С повышением концентрации T_3UK активность растворимой глутамины не только не падает, а напротив, быстро растет.

Ранее рядом авторов было показано, что одновременное при- менение фосфата с другими модуляторами приводит к усилению их действия на активность глутамины как грубой митохондриальной фракции, так и очищенного фермента мозга [17—19]. В связи с этим в следующей серии опытов мы изучили влияние АК, ААК, СК, ЦТ и МТ на активность глутамины синапсом и митохондрий в присутствии фосфата. Из результатов, представленных на рис. 4, а, б, примечательным является то обстоятельство, что в митохондриях при сочетании фосфата с указанными эффекторами наблюдается 2—3-кратное усиление их стимулирующего действия, между тем как в си-

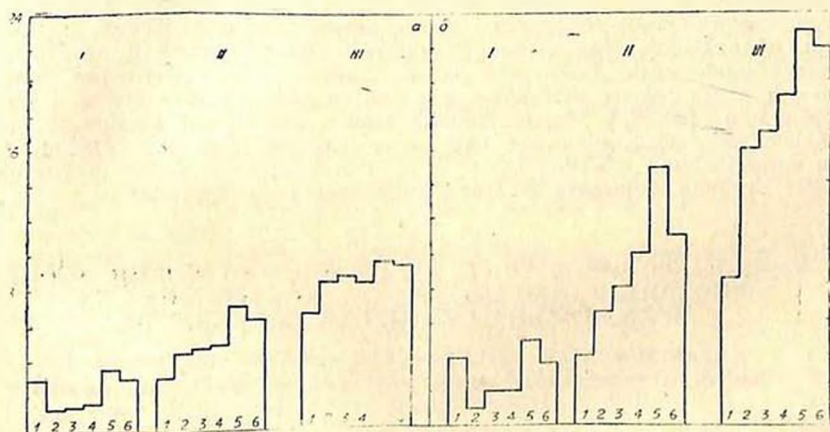


Рис. 4. Активность мембраносвязанной ФЗГ синапсом (**а**) и очищенных митохондрий (**б**) мозга при совместном применении различных концентраций фосфата с АК, ААК, СК, ЦТ и МТ (25 мкмоль/мл), pH 8,0. I—активность фермента в присутствии различных модуляторов, добавленных в отдельности. 1—фосфат 5 мкмоль/мл; 2—АК; 3—ААК; 4—СК; 5—ЦТ; 6—МТ. II—активность фермента при совместном применении АК, ААК, СК, ЦТ и МТ с фосфатом (5 мкмоль/мл). 1—фосфат 5 мкмоль/мл (Φ_5); 2—АК+ Φ_5 ; 3—ААК+ Φ_5 ; 6—МТ+ Φ_5 . III—активность фермента при совместном применении АК, ААК, СК, ЦТ и МТ с фосфатом (10 мкмоль/мл). 1—фосфат 10 мкмоль/мл (Φ_{10}); 2—АК+ Φ_{10} ; 3—ААК+ Φ_{10} ; 4—СК+ Φ_{10} ; 5—ЦТ+ Φ_{10} ; 6—МТ+ Φ_{10} . По оси ординат — активность фермента, ммолей NH_3 /мг белка.

$n=8-10$

наптосомах потенцирование не происходит. Таким образом, в случае митохондриального фермента фосфат вступает в положительное кооперативное взаимодействие с АК, ААК и другими активаторами, а в опытах с глутаминазой синаптосом эти же соединения на активность фермента действуют аддитивно. В этой связи интерес представляют результаты ранее проведенных исследований с применением фосфата и Т₃УК. Оказалось, что в митохондриях эффект фосфата на глутаминазу в присутствии низких концентраций Т₃УК (0,0125 мкмоль/мл) сильно потенцируется, однако с повышением ее концентрации потенцирование постепенно уменьшается и полностью исчезает в присутствии 0,1 мкмоль/мл Т₃УК, между тем как в синаптосомах эффект фосфата потенцируется и в присутствии высоких концентраций Т₃УК [10].

На основании вышеприведенных данных можно прийти к выводу, что регуляторные свойства мембраносвязанной ФЗГ синаптосом и очищенных митохондрий хотя и во многом сходны, в то же время обладают выраженными отличительными особенностями. В настоящее время трудно объяснить, чем обусловлены эти отличия. Можно предположить, что мембраносвязанная ФЗГ синаптосом и митохондрий либо являются различными изоферментами, либо представляют собой различные агрегированные формы фермента. Недавно в нашей лаборатории было показано, что кратковременная предварительная инкубация растворимой глутаминазы мозга в присутствии Т₃ или Т₃УК в сочетании с другими эффекторами приводит к агрегации исходной формы фермента. В зависимости как от характера тиреоидных соединений, так и от второго эффектора, применяемых при пренинкубации глутаминазы, образуются новые агрегированные формы фермента, обладающие совершенно отличными кинетическими и регуляторными свойствами. Здесь необходимо отметить, что в регуляции активности глутаминазы участвуют и такие соединения, как белки и фосфолипиды [20, 21]. Можно сделать вывод, что именно различное белковое или фосфолипидное окружение глутаминазы в митохондриях и синаптосомах тем или иным образом обуславливают регуляторные отличия фермента в этих субцеллюлярных частицах.

ASPECTS OF THE ACTIVITY CONTROL OF MEMBRANE-BOUND PHOSPHATE GLUTAMINASE OF SYNAPTOSOMES AND MITOCHONDRIA OF THE CEREBRAL CORTEX

AMBARTSUMYAN V. G., VARTANYAN A. G., OGANESYAN V. S.

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Armenia U.S.S.R.

We have demonstrated that the stimulating effect of citrate, malate, succinate, N-acetyl-L-aspartate and aspartate on the activity of membrane-bound phosphate-dependent glutaminase (PDG) of mitochondria in the presence of low concentrations of L-thyroxine (T₄) and 3,3',5-triiod-L-thyronine (T₃) is potentiated to a larger extent than when the high levels of hormones are used. However, in synaptosomes the increased effect of all the above modulators can be seen only in the presence of high T₄ and T₃ concentrations; in the presence of low hormone level the effect of succinate, N-acetyl-L-aspartate and aspartate is not potentiated at all. When citrate, malate, succinate, N-acetyl-L-aspartate and aspartate are added together with phosphate to mitochondria, their effect on the

enzyme activity is increased 2—3 times, whereas these compounds do not have any additional effect on synaptosomal enzyme in the presence of phosphate.

Both in synatosomes and in mitochondria the enhanced effects of modulators can be observed in the presence of relatively low levels of 3,3',5'-triiodothyroacetic acid (T_3AA) whereas in the presence of high concentrations of T_3AA (0.1 μ mole/ml) in contrast to T_3 and T_4 , potentiation disappears completely and the activity of the enzyme decreases down to the initial level. These data point out to nonidentical regulatory properties of the membrane-bound phosphate-dependent glutaminase in synaptosomes and mitochondria.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Nimmo G. A., Tipton Kf. J. Neurochem., v. 33, p. 1083—1094, 1977.
2. Оганесян В. С., Бунятыан Г. Х., Бадалян Л. Л., Микиртумова К. С. Вопр. биохимии мозга, т. 6, с. 5—13, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1970.
3. Kwatnie E., Torgner I. A. FEBS Lett., v. 47, p. 244—247, 1974.
4. Kwatnie E., Torgner I. A. Biochem. J., v. 149, p. 83—91, 1975.
5. Бадалян Л. Л., Бунятыан Г. Х., Оганесян В. С. Вопр. биохимии мозга, т. 10, с. 40—54, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1975.
6. Беджанян К. Д., Бадалян Л. Л., Оганесян В. С. Нейрохимия, т. 4, с. 379—387, 1985.
7. Оганесян В. С., Бадалян Л. Л., Микиртумова К. С., Саакян Ж. Дж. Вопр. биохимии мозга, т. 8, с. 77—89, 1973.
8. Саакян Ж. Дж., Оганесян В. С. Биол. журн. Армении, т. 35, с. 264—271, 1982.
9. Оганесян В. С., Бадалян Л. Л., Беджанян К. Д. Нейрохимия, т. 7, с. 558—565, 1988.
10. Оганесян В. С., Амбарцумян В. Г., Беджанян К. Д. Нейрохимия, т. 3, с. 372—381, 1984.
11. Палладин А. В., Кирсенко О. Б. Биохимия, т. 26, с. 385—390, 1961.
12. Whittaker V. P., Barker L. A. Methods of Neurochem., v. 2, p. 1—52, 1972.
13. Lowry O. H., Rosenbrough N. T., Farr A. L., Randall R. G. J. Biochem., v. 193, p. 265—275, 1951.
14. Силаксова А. И., Труш Г. П., Являкова А. Вопр. мед. химии, т. 5, с. 538—545, 1962.
15. Nimmo G. A., Tipton Kf. Biochem. Pharmacol., v. 30, p. 1635—1641, 1981.
16. Nimmo G., Tipton Kf. Eur. J. Biochem., v. 117, p. 57—64, 1981.
17. Weil-Matherbe H. J. Neurochem., 16, p. 855—864, 1969.
18. Оганесян В. С., Бунятыан Г. Х., Микиртумова К. С., Бадалян Л. Л. Вопр. биохимии мозга, т. 5, с. 5—16, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1969.
19. Szepeszy G. J. Neurochem., v. 18, p. 2201—2208, 1971.
20. Оганесян В. С., Бадалян Л. Л., Беджанян К. Д. Нейрохимия, т. 5, с. 200—201, 1986.
21. McEwan J. D., Bradford N. M. Biochem. J., v. 214, p. 649—652, 1983.

Поступила 15. X. 1989



УДК 577.156:612.015

**ПОЛУЧЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К
ГЛИАЛЬНОМУ ФИБРИЛЛЯРНОМУ КИСЛОМУ БЕЛКУ
И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ХАРАКТЕРИСТИКИ
ПОЛИПЕПТИДНОГО СОСТАВА ГЛИОСПЕЦИФИЧЕСКОГО
БЕЛКА В ОНТОГЕНЕЗЕ МОЗГА ЧЕЛОВЕКА**

ГАЙДАР Л. И., *ЛИТВИНОВА Л. В., **ВТЮРИНА И. Ю.,
*СОЛОВЬЕВ Ю. Н., БЕРЕЗИН В. А., **ВАСИЛОВ Р. Г.

Днепропетровский государственный университет

*НИИ клинической онкологии ВОНЦ АМН СССР

**ВНИИ биотехнологии Минмедбиопрома СССР, Москва

С использованием гибридной технологии получены и охарактеризованы моноклональные антитела к глияльному фибриллярному кислому белку. Моноклональные антитела клонов IC1 и 2A4 специфически взаимодействуют только с глияльным фибриллярным кислым белком и могут быть использованы в качестве диагностических реагентов в изучении опухолей нейроэпиталиального генеза. Моноклональные антитела клона 2B1 были использованы для изучения экспрессии полипептидов глияльного фибриллярного кислого белка в развивающемся мозгу человека методом иммуноблоттинга. Наблюдаемые изменения полипептидного состава глияльного фибриллярного кислого белка в онтогенезе мозга человека носят временный характер и свидетельствуют об изменении генной экспрессии при дифференцировке глии.

Глияльный фибриллярный кислый белок (ГФКБ) является специфическим компонентом цитоскелета астроглияльных клеток [1, 2]. ГФКБ представляет собой белок с М. 50 кД [3]. В последние годы разрабатывается направление по фенотипированию клеточных элементов опухолей периферической и центральной НС и мягких тканей нейроэктодермальной природы с использованием моноклональных антител к ГФКБ и нейрофиламентам [4, 5].

Настоящее исследование посвящено получению моноклональных антител к ГФКБ, характеристике их специфичности и использованию для изучения полипептидного состава ГФКБ в онтогенезе мозга человека.

Материалы и методы

Выделение и очистку ГФКБ из белого вещества мозга человека (аутопсийный материал) осуществляли по методу Dahl, Vignani [6] с модификацией. После первой экстракции белка 0,005 М фосфатным буфером pH 8,0 проводили осаждение 0,2 М ацетатным буфером pH 4,0, повторная экстракция 0,005 М фосфатным буфером pH 8,0, хро-

матогграфия белка на гидроксиланатите и высаливание сульфатом аммония при 30%-ном насыщении. На всех этапах выделения ГФКБ проводили контроль с помощью ракетного иммуноэлектрофореза с использованием кроличьей антисыворотки к ГФКБ, полученной ранее [7].

Получение гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к ГФКБ проводили по методу Köhler, Milstein [8] в модификации De Fazessa, Scheidegger [9]. Иммунизацию мышей линии BALB/c осуществляли либо путем многократных инъекций антигена (50 мкг ГФКБ на инъекцию; 3—5 инъекций с двухнедельными интервалами) внутривенно с полным адъювантом Фрейнда, либо путем однократной инъекции антигена непосредственно в селезенку. Иммунный ответ оценивали измерением титра антител в сыворотке с помощью иммуноферментного анализа [10]. У мышей с высоким уровнем антител к ГФКБ на 4-й день после последней инъекции антигена удаляли селезенку и спленциты сливали с миеломными клетками линии X63Ag8653 с помощью полиэтиленгликоля с M_n 4 кД. Скрининг гибридом осуществляли иммуноферментным методом с использованием ГФКБ. Положительные клоны исследовали методом непрямой иммунофлуоресценции на ткани мозга. Клетки из лунок, давших положительный ответ в обоих тестах, были трижды клонированы и затем использованы для паработки моноклональных антител в культуре или в виде асцита.

Твердофазный иммуноферментный анализ моноклональных антител к ГФКБ проводили следующим образом. Раствор ГФКБ (0,45 мкг/мл в 0,1 М карбонатном буфере pH 9,0) вносили в лунки планшета для иммуноанализа («Flow», Англия) по 50 мкл и инкубировали (12 ч, 4°). Затем раствор удаляли, лунки промывали забуференным физиологическим раствором (ЗФР), инкубировали с 1%-ным раствором БСА в ЗФР в течение 1 ч при 20° и вновь промывали, после чего вносили раствор исследуемых антител. После инкубации в течение 2-х ч при 37° антитела удаляли, лунки тщательно промывали и в них вносили раствор кроличьих антител к иммуноглобулинам мыши, конъюгированных с пероксидазой («Sigma», США). Затем следовала инкубация (1 ч, 37°), промывка лунок ЗФР и внесение хромогенного субстрата о-фенилендиамина («Sigma», США) в 0,05 М цитратном буфере pH 5,0. Реакцию останавливали добавлением 50%-ного раствора H₂SO₄. Оптическую плотность измеряли с помощью спектрофотометра Multiscan MCC 340 («Flow», Англия).

Моноклональные антитела исследовали с помощью иммуноблоттинга по методу Towbin и соавт. [11]. Перенос белков из ПААГ на нитроцеллюлозные фильтры («Schleicher and Schuell», ФРГ) осуществляли в течение 12 ч при силе тока 100 мА и напряжении 30 в. Затем фильтры инкубировали последовательно в 5%-ном растворе БСА в ЗФР (2 ч, 37°), растворе моноклональных антител (2 ч, 37°), растворе кроличьих антител против иммуноглобулинов мыши, конъюгированных с пероксидазой (1 ч, 37°) и в растворе субстрата диаминобензидина (5 мг в 20 мл 0,1 М Tris-HCl буфере, pH 7,4 с добавлением H₂O₂). Экстракты тканей готовили в растворе 1%-ного DDS-Na.

Иммуноморфологическое исследование проводили методом непрямой иммунофлуоресценции и ПАП (пероксидаза-антипероксидаза)—реакции на криостатных срезах толщиной 5—6 микрон с лобных долей, мозжечка и ствола мозга (аутопсийный материал не позднее 5 ч после смерти от острого кровотечения). Первичное тестиро-

вание выполнено на нефиксированных, подсушенных на воздухе кри-остатных срезах; для более детального исследования использовали срезы, фиксированные в 4%-ном растворе формалина при pH 7,4. Инкубация с моноклональными антителами длилась 1,5 ч при 20° или 20 ч при 4°; инкубация с флуоресцирующими антителами против иммуноглобулинов белой мыши (ННН микробиологии и эпидемиологии им. Н. Ф. Гамалеи и «Sigma», США)—в течение 1 ч при 20°. ПАП-реакцию проводили с использованием реагентов НИИ микробиологии и эпидемиологии МЗ РСФСР (Горький); в качестве субстрата применяли диаминобензидин («Sigma», США). Для положительных контролей в работе использовали моноклональные антитела к ГФКБ, нейрофиламентам, виментину и кератинам (РКК-1) производства фирмы «Labsystems» (Финляндия), а также ламинину и энтактину, подсушенные Любимовым и соавт. [12].

Результаты и обсуждение

ГФКБ относится к семейству белков промежуточных филаментов и имеет ряд антигенных детерминант, общих с другими членами семейства (виментином, триплетом нейрофиламентов, десминином, цитоламентом характерен для тканей определенного генеза [13], характеристиками). Поскольку в основном каждый тип промежуточных фибрилла специфичности полученных моноклональных антител может быть проведена путем исследования различных тканей как иммуногистохимически, так и методом иммуноблоттинга.

В результате трех независимых гибридизаций спленоцитов мышей линии BALB/c, иммунизированных препаратом ГФКБ, с миеломными гибридными клетками (эффективность клонирования—80%). Отбор ми клетками линии X63g8b 3 было получено свыше 600 растущих клонов, продуцирующих моноклональные антитела, проведен иммуноперментным методом с использованием в качестве антигена препарата ГФКБ. Отобрано 57 клонов, исследованных затем на срезах головного мозга человека (кора и белое вещество больших полушарий головного мозга, мозжечок и ствол) методом непрямой иммуофлуоресценции. Показано, что продукты 11 первичных клонов гибридных клеток реагировали с астроглией, 14—с нейронами, остальные—как с нейронами, так и с глиальными элементами, но обнаруживали сильное взаимодействие с эндотелием сосудов и с межклеточным веществом. Продукты первичных клонов, давших реакцию на ткани мозга только с астроглией и с нейронами (соответственно 11 и 14 образцов), исследованы на ткани кожи, молочной железы и желудка с целью исключения реакций с другими тканевыми антигенами. Из 25 исследованных образцов культуральной среды только 2 образца не дали реакций с другими тканевыми антигенами; 1 реагировал с мембранами клеток альвеол молочной железы, а антитела первичных клонов 3С3 и С3 окрашивали циточную каемку покровно-яочного эпителия желудка. Гибридомы, отобранные при помощи иммуоферментного и иммуноморфологического исследования были 3-кратно клонированы и использованы для наработки моноклональных антител. В результате получено 6 стабильных клонов, продуцирующих моноклональные антитела к ГФКБ и нейрофиламентам, пригодные для дальнейшего их в иммунохимическом анализе.

Гибридома 2В1 была получена путем однократной иммунизации в селезенку мыши препаратом ГФКБ, гибридомы 1С1, 2А4, 1С2, 3С3, С3—путем гипериммунизации препаратом ГФКБ. Моноклональные

антитела клонов 2B1, 1C1, 2A4, 1C2 на срезах мозга человека давали четкую реакцию с астроглией (рис. 1, а); антитела клона СЗ окрашивали нейроны (рис. 1, б), а клон 3С3 взаимодействовали и с астроглией, и с нейронами. При исследовании культуральной жидкости клеток клон 3С3 обнаруживалось неяркое свечение с отростками клеток в белом веществе мозга и вокруг капилляров. Как было выяснено в дальнейшем, при низких титрах антител в культуральной среде реакция прежде всего появляется в отростках астроглиальных клеток и аксонах нейронов, а не в телах клеток; причем морфологическая картина идентична как для реакции с антителами к ГФКБ,

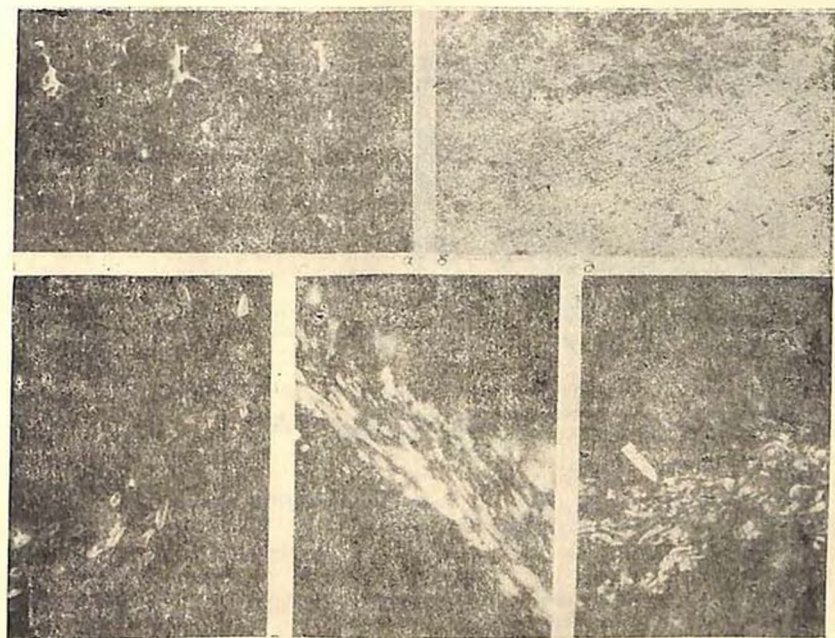


Рис. 1. Иммуноморфологическая характеристика моноклональных антител, а, в, г, д—иммунофлуоресцентный метод, $\times 160$; б—ПАП-метод $\times 63$. а—яркое свечение цитоплазмы отростков астроглии (реакция с антителами клона 2B1); б—антитела клона СЗ окрашивают аксоны нейронов мозга; в—антитела к мембранам клеток Майера; г—свечение ядерных мембран клеток волосяного фолликула с антителами клона 2B1; д—реакция антител клона 1C2 с гладкими мышцами кожи; д—реакция антител клона 1C2 с цитоплазмой клеток и отростками клеток — 3С3, в флуоресценции предрасполагающих эластических волокон

так и к нейрофиламентам. Идентичность морфологии при низких титрах антител к ГФКБ и нейрофиламентам послужила причиной отбора клон, реагирующего с детерминантой, общей для ГФКБ и нейрофиламентов.

С целью более полной характеристики специфичности моноклональных антител были проведены исследования взаимодействия со средами 10 различных органов и тканей человека, а также с некоторыми опухо-

лями человека не нейроэпителлиальной природы (рак яичника, рак молочной железы, меланома, круглоклеточная саркома). Результаты иммуноморфологической характеристики моноклональных антител, продуцируемых различными клонами, представлены в таблице. Моноклональные антитела гибридомы 1C1 не обнаружили перекрестных реакций с другими тканевыми антигенами как нормальных тканей, так и при исследовании образцов опухолей человека не нейроэпителлиальной природы. Антитела клона 2A4 нестабильно реагировали с клетками волосных фолликул кожи и клетками желчных капилляров печени, но при уменьшении концентрации антител (контролем являлась положительная реакция с астроглией) эти реакции исчезали.

Таблица

Морфологическая характеристика моноклональных антител					
Моноклональные антитела	1C1	2A4	2B1	1C2	C3
исследуемый образец					
Большие полушария головного мозга					
астроглия	+	+	+	+	—
нейроны	—	—	—	—	+
Мозжечок					
астроглия	+	+	+	+	—
нейроны	—	—	—	—	+
Щитовидная железа	—	—	мембраны ядер	цитоплазматические мембраны	—
Молочная железа	—	—	—	—	+
Кожа					
гладкие мышцы	—	—	—	+	+
волосные фолликулы	—	единичные клетки	мембраны ядер	+	+
эпидермис	—	—	—	+	—
Желудок					
слизистая оболочка	—	—	мембраны ядер	+	+
гладкие мышцы	—	—	—	—	—
Печень					
желчные капилляры	+	+	мембраны ядер	+	+
гепатоциты	—	—	—	—	—
Легкое	—	—	—	—	—
Надпочечник	—	—	мембраны ядер	—	+
Яичник					
тека-клетки	—	—	мембраны ядер	+	+
Протоковый инфильтративный рак молочной железы	—	—	—	—	—
Эндометриодный рак яичника	—	—	мембраны ядер	эпителиальные и стромальные клетки	—
Меланома	—	—	мембраны ядер	эпителиальные и стромальные клетки	+
Синовиальная саркома	—	—	мембраны ядер	—	+

Антитела клона 2B1 реагировали с оболочками ядер клеток эпителия и соединительной ткани (рис. 1, в), а также с оболочками ядер опухолевых клеток. Заметим, что на ткани мозга реакции с ядерными оболочками астроглии и нейронов не обнаружено.

Антитела гибридомы 1C2 интенсивно связывались с клетками придатка кожи, с гладкими мышцами кожи (рис. 1, г), тека-клетками яичника, с эпителием проксимальных и дистальных канальцев почек, с мембранами клеток щитовидной железы, а также с эпителиальными

ми и стромальными клеточными элементами рака молочной железы (рис. 1, *д*) и эндометриального рака (рис. 1, *е*). Антитела клон СЗ, кроме того, реагировали с клетками синовиальной саркомы.

В иммуноблоттинге с препаратом ГФКБ (рис. 2, *а*) моноклональные антитела клонов 1С1, 1С2, 2В1, 2А4, 3С3, а также использованные в качестве контроля моноклональные антитела к ГФКБ («Lab-systems», Финляндия) интенсивно окрашивали белковую зону с величиной M_r 40—50 кД, что соответствует ГФКБ и продуктам его деградации. Антитела 1С2 интенсивно реагировали также с белком с величиной M_r 57 кД (имитин) и слабо—с белками с M_r 68 кД

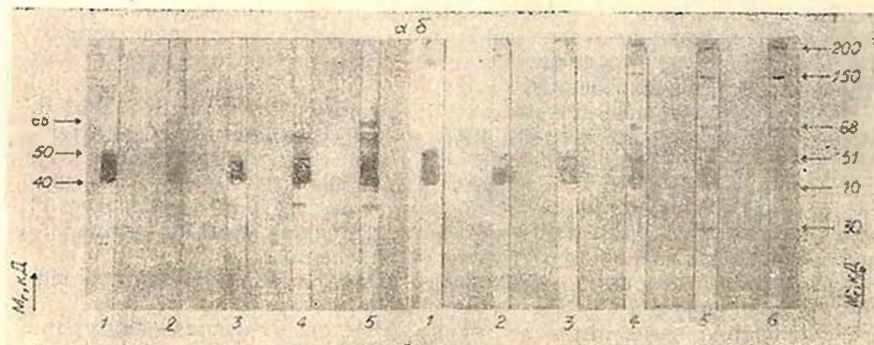


Рис. 2. Иммуноблоттинг препарата глиального фибриллярного кислого белка (*а*) и экстрактов мозга (*б*) человека с моноклональными антителами к глиальному фибриллярному кислому белку. Клоны: 1—2В1, 2—1С1, 3—2А4, 4—1С2, 5—3С3, 6—СЗ

(нейрофиламенты) и 30 кД. Антитела 3С3 показали интенсивную реакцию с белками с M_r 57 и 68 кД и несколько слабее—с белком с M_r 30 кД. Продукт клон СЗ реагировал с белком с M_r 68 кД (нейрофиламенты).

При взаимодействии с экстрактом мозга человека антитела клонов 2В1, 1С1, 2А4 (рис. 2, *б*) окрашивали только зону, соответствующую ГФКБ и продуктам его деградации— M_r 40—50 кД; антитела 1С2 и 3С3 дополнительно взаимодействовали с белками с M_r 150 и 200 кД и слабо—с полипептидами с величиной M_r 20, 30 и 37 кД. Антитела клон СЗ при реакции с экстрактом мозга (продолговатый мозг) обнаруживали полипептиды с M_r 68, 150 и 200 кД (нейрофиламенты), выявляли белки с M_r 40—50 кД, соответствующие ГФКБ, и более слабо окрашивали зоны с M_r 20, 30, 36, 57, 92, 110 и 160 кД. Аналогичная картина, только значительно слабее, наблюдалась и в случае экстракта надпочечника.

При изучении методом иммуноблоттинга экстрактов других тканей не обнаружено взаимодействия моноклональных антител с экстрактами почек; моноклональные антитела 2В1, 1С1, 2А4 не взаимодействовали с экстрактами желудка, печени, матки. Моноклональные антитела 1С2, СЗ и 3С3 выявляли две близкорасположенные полипептидные зоны с M_r 150 кД в экстракте печени и 130 и 150 кД в экстракте матки. Кроме того, антитела 3С3 и СЗ реагировали с белком с M_r 130 кД в экстракте желудка.

Таким образом, на основании проведенного иммуноморфологического анализа и анализа полипептидного состава полученные моно-

клональные антитела могут быть сгруппированы следующим образом:

1. Моноклональные антитела 1С1 и 2А4, окрашивающие на срезах мозга только астроглию и не проявляющие перекрестных реакций с антигенами других нормальных и опухолевых тканей человека. Эти антитела специфически взаимодействуют только с ГФКБ и являются кандидатами на роль диагностических реагентов в изучении опухолей нейроэктодермальной природы.

2. Моноклональные антитела 2В1, взаимодействующие в иммуноблоттинге только с ГФКБ и окрашивающие астроглию. Однако эти антитела взаимодействуют также с мембранами ядер клеток других гистологических типов тканей человека и, по-видимому, не могут быть использованы для диагностических целей, однако представляют интерес в качестве реагентов для иммунохимического анализа и нейробиологических исследований.

3. Моноклональные антитела 1С2, взаимодействующие с ГФКБ, 3С3—с эпитопом, общим для ГФКБ и нейрофиламентов, и антитела клона С3, взаимодействующие с нейрофиламентами. Антитела этих клонов, кроме того, взаимодействуют и с эпитопами некоторых других белков, что делает их непригодными для иммуноморфологической диагностики опухолей. Эти реагенты могут представлять определенный интерес для нейробиологических исследований.

Полученные клоны заморожены и хранятся в НИИ биотехнологии Минмедбиопрома СССР.

Моноклональные антитела клона 2В1 были использованы для изучения экспрессии полипептидов ГФКБ в развивающемся головном мозгу человека методом иммуноблоттинга (рис. 3). На 12-й неделе



Рис. 3. Иммуноблоттинг экстрактов мозга плода человека с моноклональными антителами клона 2В1: а—25—26-я неделя развития; б—30—32-я неделя развития. 1—кора больших полушарий, 2—мозжечок, 3—продолговатый мозг

после оплодотворения ГФКБ в мозгу представлен основной зоной 51 кД и рядом минорных низкомолекулярных полипептидов в диапазоне 35—40 кД (данные не представлены). На 25—26 неделе развития помимо полипептидной зоны 51 кД появлялась зона 100 кД

ч слабая зона 68 кД. Значительное количество низкомолекулярных полипептидов с М в диапазоне 31—45 кД обнаруживали в продолговатом мозгу, тогда как в коре больших полушарий и мозжечке эти полипептиды проявлялись слабее. Такой характер экспрессии ГФКБ может свидетельствовать, с одной стороны, о большой изменчивости процессов деградации основного полипептида *in vivo* (низкомолекулярные полипептиды, особенно в продолговатом мозгу), а с другой—либо об измененной экспрессии самого ГФКБ, либо изменениях других белков семейства промежуточных филаментов (скорее всего белок в-интерфилламентов). При этом, по-видимому, выявляются антигенные детерминанты, родственные ГФКБ, но отсутствующие у этих белков в мозгу взрослого человека и на других этапах онтогенеза (рис. 2, б). Интересно, что наблюдаемые изменения полипептидного состава ГФКБ в онтогенезе мозга человека носят временный характер. На 30—32-й неделе развития плода человека в мозжечке и продолговатом мозгу экспрессируется только основной полипептид с М 51 кД, а в коре больших полушарий и эта зона выражена очень слабо. Обнаруженные изменения экспрессии полипептидов ГФКБ, по-видимому, отражают не только разницу в числе глальных клеток, синтезирующих ГФКБ, но и изменения генной экспрессии при развитии и дифференцировке глии в онтогенезе мозга человека.

RAISING OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST GLIAL FIBRILLARY ACIDIC PROTEIN AND THEIR USE FOR CHARACTERIZATION OF POLYPEPTIDE COMPOSITION OF GLIA-SPECIFIC PROTEINS DURING HUMAN BRAIN ONTOGENESIS

GAIDAR I. I., *LITVINOVA L. V., **VTYURINA I. YU., *SOLOVYEV YU. N., BEREZIN V. A., **VASILOV R. G.

Dnepropetrovsk State University

*Institute of Clinical Oncology, National Oncological Research Centre, USSR Academy of Medical Sciences, Moscow

**Institute of Biotechnology, Minmedbioprom USSR, Moscow

Monoclonal antibodies against glial fibrillary acidic protein (GFAP) have been obtained using hybridoma technology. Monoclonal antibodies produced by clones 1C1 and 2A4 specifically interact only with GFAP and can be used as diagnostic reagents in studies of neuroepithelial tumours. Monoclonal antibodies of the clone 2B1 were used to study the expression of GFAP polypeptides in the developing brain by immunoblotting. The observed changes in the polypeptide composition of GFAP during human brain ontogenesis are temporary and provide evidence for changed gene expression during glia differentiation.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dahl D., Bignami A. Brain Res., v. 57, p. 343—360, 1973.
2. Dahl D., Bignami A. —In: Cell, and Muscle Motility, v. 6, p. 75—96, N. Y., London, 1985.
3. Eng L. —F. Int. Proteins of the nervous system, v. 2, p. 85—117, N. Y. 1980.
4. Березин В. А., Жигарева Е. Н., Ромоданов С. А., Шевченко Г. М., Бродская И. А. Вopr. онкологии, т. 31, № 12, с. 7—17, 1985.
5. Готтшалак Я., Енш В. Архив патологии, т. 49, № 3, с. 3—11, 1987.

6. *Dahl D., Bignami A.* Biochim. et biophys. acta, v. 386, № 1, p. 41—51, 1975
7. *Березин В. А., Шевченко Г. М., Жмарева Е. Н., Кузнецов А. В., Кузнецова И. В.* Нейрохимия, т. 3, № 3, с. 327, 1984.
8. *Köhler G., Milstein C.* Nature, v. 256, p. 495—497, 1975.
9. *Fazekas de S. G., Scheidegger D. J.* Immunol. Meth., v. 35, p. 1—21, 1980.
10. *Voller A., Bidwell D. B., Bartlett A.* The enzyme linked immunosorbent assay. Dynatech. Eur. Borough House, 1979.
11. *Towbin H., Staehelin T., Gordon J.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 76, с. 4350—4354, 1979.
12. *Ljubimov A. V., Afanasjeva A. V., Litvinova L. V., Sentin V. M.,* Exp. Cell Res., v. 165, p. 530—540, 1986
13. *Osborn M. J.* Invest. Dermatol., v. 281, p. 104—109, 1983.

Поступила 4.II.1990



ИММУНОХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ АУТОИММУННОЙ АГРЕССИИ АНТИТЕЛ К НЕЙРОСПЕЦИФИЧЕСКИМ БЕЛКАМ У КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ПРОРЫВОМ ГЭБ

ЧЕХОНИН В. П., ЛИДЖИЕВА Р. Ц., КОРОТЕЕВА Е. А., РЯБУХИН Н. А.
ЛЕБЕДЕВ А. С., БУРКИНА А. Ю., БЕЛЯЕВА Н. Ю.

ВНИИОСП им. В. П. Сербского, 2-й МОЛГМИ им. Н. И. Пирогова, Москва

Целью настоящей работы явилось иммунохимическое изучение процессов аутоантителообразования к нейроспецифическим белкам, а также анализ морфологических изменений в ткани мозга крыс, возникающих вследствие аутоантительной агрессии. Иммунизация крыс препаратами α_2 -гликопротеина и глиофибрилярного антигена приводила к появлению в сыворотке крови антител к данным препаратам в концентрации от 51,2 до 115,2 мг/мл. Нами проводилось морфологическое изучение ткани мозга крыс после экспериментального прорыва ГЭБ, вызванного введением нейролентика, что приводило к элиминации антител через поврежденный ГЭБ. Показано развитие в ткани мозга неспецифических острофазовых реакций по типу отека или воспаления.

Образование аутоантител к целому ряду нейроспецифических белков (НСБ) показано как в клинике [1—4], так и в эксперименте [5, 6]. В то же время остается неясным вопрос, могут аутоантитела к НСБ проникать через поврежденный ГЭБ в направлении кровь—мозг.

Целью настоящей работы явилось иммунохимическое изучение процессов аутоантителообразования к НСБ, а также анализ морфологических изменений в ткани мозга крыс, возникающих вследствие аутоантительной агрессии.

Материалы и методы

Иммунохимическому и морфологическому анализу подвергали сыворотку крови и ткань мозга 25 белых беспородных крыс массой 200 ± 10 г, которым подкожно и внутрибрюшинно вводили препараты α_2 -гликопротеина (α_2 -ГП) и глиофибрилярного антигена (GFAP), полученные из мозга крыс по методам, описанным ранее [1, 7]. Препараты вводили в дозе 65 мкг на 1 кг веса по следующей схеме: 1 мл препарата НСБ, содержащего α_2 -ГП и GFAP в концентрации по 5 мкг/мл, смешивали с равным объемом полного адьюванта Фрейнда («Sigma», США) и вводили каждому из 20 подопытных животных подкожно в зону лимфатических узлов брюшной цепочки.

Через 7 дней 1 мл препарата НСБ, содержащего 2 мкг α_2 -ГП и GFAP, вводили внутрибрюшинно каждому из 20 подопытных животных.

3 и 4 инъекции проводили с интервалом 7 суток внутрибрюшинно препаратом НСБ, содержащим по 3 мкг α_2 -ГП и GFAP.

Концентрацию антител к НСБ определяли иммуноферментным методом, как описано ранее [7]. Регистрацию результатов иммуноферментного анализа проводили на многоканальном фотометре Titeltek Multiskan („Flow Laboratories“, Англия).

Прорыв ГЭБ осуществляли внутрибрюшинной инъекцией галоперидола („Gedeon Richter“, Венгрия) в дозе 50 мг на 1 кг веса животного. Крыс декапитировали через сутки после инъекции галоперидола, мозг фиксировали в жидкости Карнуа и заливали в парафин. Срезы окрашивали по Нисслю и изучали при помощи световой микроскопии.

Для изучения распределения [125 J] меченных антител к α_2 -ГП и GFAP белым беспородным крысам (массой 220 ± 10 г) внутрисердечно вводили по 0,125 мг препаратов антител к α_2 -ГП и GFAP, полученных способом, описанным ранее [7], с удельной радиоактивностью 0,008 мКи/мкг. Декапитировали через 24, 72, 144 и 216 ч после инъекции; паренхиматозные органы (мозг, печень, селезенку, легкое, почки, сердце) массой 1 г, а также кровь подвергали сканированию на γ -счетчике Compu Gamma (LKB, Швеция).

Результаты и обсуждение

Разработанные в процессе эксперимента иммуноферментные системы определения антител к α_2 -ГП и GFAP позволили выявлять их в биологических жидкостях в интервале концентраций соответственно от 0,9 до 115,2 и от 0,8 до 102,4 нг/мл. Оптимальная работа систем достигалась при использовании для активации полистироловых плат соответственно 0,0015 и 0,0042% растворов антител к GFAP и α_2 -ГП и в качестве промежуточных антигенов 0,0003 и 0,0004% растворов этих антигенов, оптимальное разведение конъюгата антител осла к иммуноглобулинам кролика с пероксидазой («Sigma», США) составило 1:1500. На рис. 1 приведена кривая зависимости концентрации антител к α_2 -ГП и GFAP от оптической плотности при 450 нм.

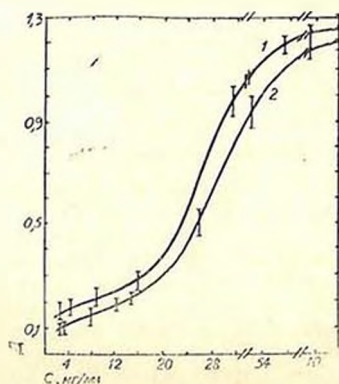


Рис. 1. Калибровочные кривые иммуноферментного определения антител к глиофибрилярному антигену и α_2 -гликопротеину

построенная на основании результатов 30 экспериментов. Статистический анализ среднего квадратичного отклонения точек не превышает соответственно 0,9 и 1,1%, что позволяет судить о надежности и хорошей воспроизводимости разработанных систем, которые были использованы для иммунохимического анализа уровня антител в сыворотке крови крыс.

Иммунизация препаратами α_2 -ГП и GFAP приводила к появлению в сыворотке крови крыс антител к данным препаратам в концентрации от 51,2 до 115,2 нг/мл. Таким образом, принципиальная возможность образования аутоантител к НСБ в процессе прорыва ГЭБ в направлении мозг—кровь не вызывает сомнений.

При анализе клинического состояния животных опытной и контрольной групп с экспериментально нарушенным ГЭБ выявляются выраженные различия в статусе животных. 3 из 25 крыс, в сыворотке крови которых присутствовал антител к НСБ, погибли в первые 5 мин после инъекции галоперидола при явлениях нарушения дыхания по центральному типу. У остальных животных данной группы в течение длительного времени (до 24 ч) сохранялись судорожный синдром, акинетико-ригидный синдром, нарушение поведенческих реакций, отмечались явления вегето-сосудистой недостаточности (тахикардия, акцианоз). У контрольных животных наблюдалась нейролептическая симптоматика, которая полностью исчезала к 6 ч после инъекции.

Учитывая тот факт, что в литературе имеются неоднородные данные о морфологических изменениях, возникающих при аутоантителной агрессии в мозг [8, 9], проводили морфологическое изучение ткани мозга крыс после экспериментального прорыва ГЭБ, вызванного введением нейрелептика, что приводило к элиминации антител через поврежденный ГЭБ. При морфологическом исследовании ткани мозга крыс, полученного декапитацией через 24 ч после инъекции галоперидола, отчетливо выявляются очаговая пролиферация клеток нейроглии, прежде всего глиальных нейрофогов, перикапиллярный отек, возбуждение астроцитов, пролиферация олигодендроцитов с образованием их отечных форм. Нейроны просветлены, наблюдаются периферический хроматоллиз, появление светлых вакуолей, признаков дистрофии в их цитоплазме. Здесь же следует отметить, что в препаратах из ткани мозга крыс контрольной группы, несмотря на прорыв ГЭБ, вышеуказанные изменения не отмечались (рис. 2).

Так как до сих пор в литературе нет однозначных доказательств, свидетельствующих о попадании в ткань мозга через поврежденный ГЭБ аутоантител к НСБ, нами проводилось радиоиммунологическое изучение распределения [125I] меченных антител к α_2 -ГП и GFAP в организме животных с нарушенной резистентностью ГЭБ. С этой целью подопытной группе животных (40 белых беспородных крыс) вводили галоперидол (как описано выше), что вызывало нарушение резистентности ГЭБ. Внутривенно вводили по 0,125 мг препарата [125I] меченных антител к GFAP и α_2 -ГП с удельной радиоактивностью 0,008 мКи/мкг. Контрольным группам животных (каждая по 20 крыс) вводили эквивалентное количество меченых антител к α_2 -ГМ и α_2 -ГМ, а также препарат [125I]. Эксперимент полностью повторяли на животных с ненарушенной проницаемостью ГЭБ. Крыс забивали спустя 24, 72, 144 и 216 ч после инъекции соответствующих препаратов и скенировали участки паренхиматозных органов на γ -счетчике Compu Gamma (ЛКВ, Швеция). Для скенирования брали по 1 г следующих органов: мозг, печень, почки, легкие, селезенка, сердце, а также кровь. Результаты распределения метки в опытных и контрольных

ных образцах приведены в табл. 1, рис. 3, из которых видно, что при полноценном ГЭБ аутоантитела в ткань мозга не проникают, а имеющаяся радиоактивность 0,0013 мКи обусловлена, на наш взгляд, радиоактивностью крови в сосудах головного мозга. В эксперименте на животных с пораженным ГЭБ антитела к GFAP и α_2 -ГП накапливаются в мозгу, причем количественное содержание метки в 1 г ткани



Рис. 2. Микроскопическая картина ткани мозга крыс с экспериментально вызванной аутоантительной агрессией к нейроспецифическим белкам: а—отек и инфильтрация мягких мозговых оболочек ($\times 250$); б—расширение сосуда и резко выраженный периваскулярный отек ($\times 300$); в—дистрофические изменения нейронов, появление клеток-теней, выраженный перикеллюлярный отек ($\times 250$); г—глиальная реакция вокруг сосуда, появление темных нейронов ($\times 350$).

Окраска по Нисслю

мозга превышало, как минимум, на 60% ее концентрацию в других исследуемых органах. Изучение локализационного индекса в тканях показало, что максимум его значения приходится на 3-и сутки от момента инъекции. Напротив, введение меченых антител к α_1 -ГМ и α_2 -ГМ, не специфичных для мозга крысы, не характеризуется накоплением их в ткани, а локализационный индекс в этом случае не превышает 1.

Обсуждая полученные результаты, можно сделать вывод о том, что прорыв аутоантител к НСБ через поврежденный ГЭБ в мозг со-

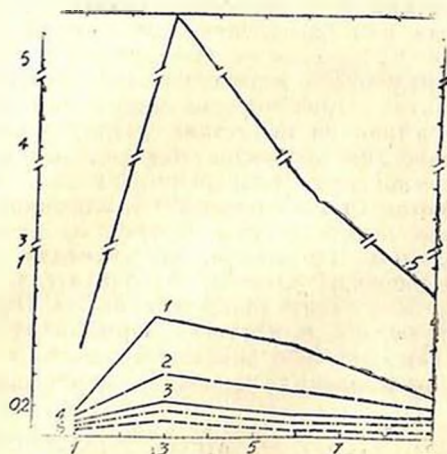


Рис. 3. Графическое изображение локализационных индексов для меченых $[^{125}\text{I}]$ антител к нейроспецифическим белкам в различные сроки после инъекции животным с экспериментально нарушенной барьерной функцией ГЭБ. По оси абсцисс—время после инъекции (в сутках), по оси ординат—локализационный индекс (в отн. ед.). Цифрами указано графическое изображение локализационного индекса при инъекции антител к глиофибрилярному антигену и α_2 -гликопротеину для ткани печени (1), к α_1 - и α_2 -гликопротеину для ткани печени (2), к глиофибрилярному антигену и α_2 -гликопротеину для ткани почек (3), к α_1 -протеину и α_2 -гликопротеину для ткани почек (4), к глиофибрилярному антигену и α_2 -гликопротеину для ткани мозга (5), к α_1 - и α_2 -гликопротеину для ткани мозга (6)

Таблица

Процентное распределение $[^{125}\text{I}]$ меченых антител к GFAP и α_2 [1] на третий сутки после введения препаратов

Органы (Iг)	Меченные $[^{125}\text{I}]$ антитела, введенные животным с нарушенной резистентностью ГЭБ	Меченные $[^{125}\text{I}]$ антитела, введенные интактным крысам
Мозг	0.630 ± 0.040	0.021 ± 0.003
Сердце	0.025 ± 0.003	0.028 ± 0.002
Легкое	0.013 ± 0.003	0.012 ± 0.002
Печень	0.110 ± 0.008	0.080 ± 0.009
Почки	0.038 ± 0.004	0.022 ± 0.004
Селезенка	0.040 ± 0.004	0.018 ± 0.003
Кровь	0.120 ± 0.020	0.800 ± 0.040

Примечание. Расчет вели от общего количества вводимой метки.

проводяется развитием в ткани неспецифических —острофазовых реакций по типу отека или воспаления, при этом в данных процессах нарушение функций ГЭБ является, по-видимому, вторичной реакцией—следствием выраженных метаболических нарушений в клетках мозга и эндотелиоцитах. Причина этих нарушений, вероятно, кроется в суммарном воздействии на них таких факторов как гипоксия, ишемия, влияние токсических продуктов метаболизма клеток организма, активированных компонентов калекреин-кининовой системы и т. д. Нарушение резистентности ГЭБ приводит к элиминации в кровь НСБ, обладающих высокой антигенностью. В ответ на их проникновение в кровь иммунная система организма, не имеющая толерантности к ним, реагирует выработкой антител. Аутоантитела, в свою очередь, могут проникать в мозг через поврежденный ГЭБ, блокируя функции специфических белков и нарушая нормальный метаболизм клеток-мишеней, что само по себе может приводить к активации комплекса процессов, вызывающих первичное нарушение проницаемости ГЭБ.

IMMUNOCHEMICAL STUDY OF MECHANISMS OF AUTOIMMUNE AGGRESSION OF ANTIBODIES TOWARDS NEUROSPECIFIC PROTEINS IN RATS WITH EXPERIMENTAL RUPTURE OF THE BLOOD-BRAIN BARRIER

CHEKHONIN V. P., LIDZHIEVA R. Ts., KOROTEEVA E. A., RYABUKHIN I. A.,
LEBEDEV A. C., BURKINA A. YU., BELYAEVA N. YU.

Serbshii Institute of Forensic Psychiatry, Moscow

N. J. Pirogov Moscow Second Medical Institute

In this paper we have attempted to perform an immunochemical study of antibody formation against neurospecific proteins and to analyze morphological changes in rat brain due to the attack by autoantibodies. Immunization of rats with α_2 -glycoproteins and glial fibrillar acidic protein resulted in the appearance in antiserum of antibodies against these molecular species in concentrations varying from 51.2 to 115.2 ng/ml. We examined brain tissue morphologically after experimental rupture of blood-brain barrier induced by a neuroleptic; this resulted in depletion of antibodies occurring through the damaged blood-brain barrier. We have demonstrated the development of non-specific acute phase reactions resembling oedema or inflammation of brain tissue.

ЛИТЕРАТУРА

1. Eng L. F. Scand. J. Immunol. v. 15, suppl. 9, p. 41—51, 1982.
2. Karcher D., Soler Federspiel B. S., Lowenthal F. D., Lowenthal A. Acta Neuropathologica (Bell.), v. 72, p. 82—85, 1986.
3. Perry G., Friedman R., Kang D. R. Brain Res., v. 420, p. 233—242, 1987.
4. Sato S., Baba H., Inuzuka I., Miyatake I. Acta Neurol. Scand., v. 74, p. 115—120, 1986.
5. Полетаев А. Б. Мозгоспецифические белки группы S-100, их эндогенные акцепторы и лиганды, и регуляция метаболических процессов в нервной ткани, Автореф. докт. дис., М., 1987.
6. Festoff B. W., Israel R. S., Engel W. K., Rosenbaum R. B. Neurol., v. 27, p. 82—85, 1977.
7. Чехонин В. П., Морозов Г. В., Кашипов Н. А., Рябухин И. А. Биотехнология, т. 4, №5, с. 648—651, 1988.
8. Heath R. G., Krupp I. M. Arch. Gen. Psychiatry, v. 16, p. 1—9, 1967.
9. Logan D. G., Deodhar S. D. JAMA, v. 212, p. 1703—1704, 1970.

Поступила 25.II.1990



УДК 577.15.153:612.8.015.32

ВЛИЯНИЕ ГИПЕРДОЗ ВИТАМИНА А НА МЕТАБОЛИЗМ НЕЭСТЕРИФИЦИРОВАННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ НЕРВНОЙ ТКАНИ

ОПАРИНА Т. И., БЛЮДЗИН Ю. А., ПУТИЛИНА Ф. Е.

Физиологический институт им. А. А. Ухтомского ЛГУ, Ленинград

Исследовано субклеточное распределение и интенсивность включения меченого предшественника во фракцию неэстерифицированных жирных кислот (НЭЖК) головного и спинного мозга растущих крыс, подвергнутых воздействию больших доз витамина А. Пероральное введение ретинола ацетата с 10-го по 16-й дни постнатальной жизни в дозе 1600 МЕ каждому животному вызывало значительное повышение уровня НЭЖК во всех исследованных субклеточных фракциях, наиболее резкое в растворимой части клеток нервной ткани. Отмечено снижение включения $[2-^{14}\text{C}]$ ацетата в НЭЖК миелина спинного мозга подопытных крыс. Газохроматографический анализ показал возрастание доли пальмитиновой и линоленовой кислот и уменьшение процентного содержания арахидоновой и докозагексаеновой кислот в составе НЭЖК головного мозга при гипервитаминозе А. Наблюдаемые нарушения обмена жирных кислот нервной ткани под воздействием избытка ретинола, вероятно, могут быть связаны с повышением притока НЭЖК из плазмы крови через ГЭБ.

Гипервитаминоз А, симптомами которого являются задержка роста, множественные переломы костей, внутренние кровоизлияния, экзофтальмия, а также нарушения репродуктивной функции [1, 2], давно известен в клинической практике. В последние годы отмечается избыточное потребление витамина А (ретинола) жителями многих развитых стран [3], приводящее к развитию гипервитаминозных состояний. Полагают, что молекулярные механизмы действия ретинола связаны с регуляцией экспрессии генов и непосредственным участием в транспорте моносахаридных остатков [4, 5]. Гипервитаминоз А оказывает существенное влияние на обмен липидов в различных тканях: наблюдается повышение концентрации холестерина в крови [6], изменение интенсивности включения меченых предшественников в липиды печени, почек, легких [7]. Однако практически не исследовано воздействие избытка витамина А на состояние липидного обмена нервной ткани, особенно уязвимого в период интенсивной миелинизации. Ранее нами было отмечено нарушение динамики соотношения холестерина и его эфиров в развивающемся мозгу крыс, получавших большие дозы ретинола ацетата [8], что косвенно свидетельствует об аномальном протекании миелиногенеза. НЭЖК относят к минорным липидным компонентам нервной ткани, так как они содер-

жаться в зрелом мозгу в следовых количествах [9]. В то же время накопление НЭЖК в мозгу, или изменение состава этой липидной фракции, вероятно, может служить критерием серьезных метаболических нарушений в ЦНС или же аномального функционирования системы пластического обмена между плазмой крови и мозгом.

Целью настоящей работы было исследование влияния больших доз витамина А на субклеточное распределение, интенсивность метаболизма и состав НЭЖК головного и спинного мозга животных в период активного формирования миелина.

Материалы и методы

В опытах использовали 88 белых беспородных растущих крыс. Потомство одной самки делили на группы контрольных и подопытных животных. Гипервитаминоз А вызывали пероральным введением раствора ретиниола ацетата в абрикосовом масле в дозе 1000 МЕ каждому животному на 10-, 12-, 14- и 16-й дни постнатальной жизни. Одновременно контрольным крысам *per os* вводили такой же объем растворителя (0,1 мл). Животных декапитировали при помощи гильотины на 6-й день после последнего введения ретинилацетата, так как для витамина А характерно замедленное действие, что связано с ограниченной его выведением из организма [10]. За 1 ч до декапитации крысам делали подкожную инъекцию $[2-^{14}\text{C}]$ ацетата в дозе 30 мкКи/100 г массы тела.

Содержание суммарных ретининов в плазме крови, печени и нервной ткани оценивали при помощи реакции с трифторацетатом [11]. Субклеточные фракции головного и спинного мозга выделяли посредством дифференциального центрифугирования [12], для дальнейшего исследования использовали мембранные фракции миелина и микросом, а также супернатант после осаждения микросом, обозначаемый как цитозоль. Содержание белка в субклеточных фракциях определяли по методу Lowry и соавт. [13]; экстракцию липидов проводили смесью хлороформа и метанола в соотношении 1:2, согласно методическому руководству [14]. Разделение общих липидов на фракции осуществляли с помощью одномерной восходящей хроматографии в тонком слое силикагеля КСК с использованием системы растворителей гексан—диэтиловый эфир—уксусная кислота (15:25:4) фракции идентифицировали по стандартным препаратам холестерина, бегеновой кислоты и капроата холестерина («Serva», ФРГ). В используемой нами системе фракция НЭЖК хорошо отделялась от неэстерифицированного холестерина: по нашим данным, для НЭЖК значение R_f составило $0,40 \pm 0,02$, для холестерина— $0,50 \pm 0,02$. Содержание НЭЖК в элюатах ТСХ определяли методом Duncombe [15] в модификации Соколовой и соавт. [16]. Для измерения радиоактивности аликвот НЭЖК использовали сцинтилляционную смесь следующего состава: 4 г 2,5-дифенилоксазола и 300 мг 1,4-ди(2,5-фенил)оксазолил) бензола в 1 л толуола, импульсы регистрировали на приборе «Beckman LS 100C» (США). Удельную радиоактивность выражали в имп/мин $\cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$, причем содержание углерода во фракции НЭЖК было принято равным 76% (рассчитано для стеариновой кислоты).

Газохроматографическое разделение жирных кислот проводили в виде их метиловых эфиров. Метилирование осуществляли в запаянных стеклянных ампулах по методу Peisker [17]. Эфирный экстракт анализировали на хроматографе «Цет-101» с колонкой, заполненной

силинизированным целитом-545 с нанесенной на него жидкой полярной фазой—полиэтиленгликольсукцинатом в количестве 10% по массе. Температура разделения—194—196°, газ-носитель—азот. Идентификацию пиков кислот проводили по их стандартам и по величинам времени относительно удерживания. Содержание каждой жирной кислоты выражали в процентах от суммы всех обнаруженных кислот, количественной характеристикой служила площадь пиков на хроматограмме. Статистическую обработку данных проводили с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Одной из предварительных задач настоящей работы был выбор адекватного способа воздействия на растущий организм избыточными дозами витамина А. При отработке методики вначале использовали подкожные инъекции масляного раствора ретинола ацетата в той же дозе [18], но при таком способе введения иногда наблюдали капсулирование введенного препарата, что затрудняло всасывание и приводило к изменению дозы витамина, поступающей в организм. При пероральном введении до 90% поглощенного витамина А абсорбируется из кишечника и разносится по организму в виде эфиров ретинола [19].

Суточная потребность взрослой крысы в витамине А составляет 30 МЕ, растущей—около 20 МЕ [1]. Тот и соавт. [20] установили, что содержание ретинола в сыворотке крови взрослых крыс, в течение 9-и дней находившихся на диете, содержащей 1500 МЕ витамина А в сутки, возрастает на 52%, а его запасы в печени увеличиваются почти в 5 раз. В наших экспериментах крысы получали общую дозу 4000 МЕ. О развитии состояния гипervитаминоза судили по концентрации суммарных ретиноидов в плазме крови, печени и нервной ткани (табл. 1). Как видно из представленных данных, у под-

Таблица 1

Содержание суммарных ретиноидов в плазме крови, печени и мозгу контрольных и подопытных животных (нмоль/г ткани)

Орган или ткань	Контроль (n=8)	Витамин А (n=7)	p
Плазма крови*	0.94±0.11	2.53±0.33	<0.01
Печень	4.48±0.51	18.52±1.91	<0.001
Головной мозг	0.57±0.04	0.90±0.06	<0.01
Спинальный мозг	0.62±0.06	0.84±0.07	<0.05

Примечание. * Содержание суммарных ретиноидов в плазме крови выражено в нмоль/мл; в скобках указано число опытов.

опытных крыс содержание ретиноидов в плазме повышено по сравнению с контролем в 2,7 раза, а запасы витамина А в печени возросли в 4,1 раза. достоверное повышение уровня ретиноидов отмечено также в нервной ткани—на 73 и 35% в головном и спинном мозгу соответственно.

Гипervитаминоз А вызывал существенное увеличение концентрации НЭЖК во всех исследованных структурах ЦНС (табл. 2), причем наиболее резко относительное содержание НЭЖК в расчете на 1 мг белка возрастало в цитозоле: в 2,5 раза—в головном и почти в

4 раза в спинном мозгу. В то же время удельная радиоактивность НЭЖК подопытных крыс практически не изменялась по сравнению с контролем, достоверное снижение было отмечено только в миелине спинного мозга (табл. 3). Интересно отметить, что доля НЭЖК от общей радиоактивности гомогената выделенных субклеточных фракций не менялась при гипервитаминозе А в цитозоле и возрастала в 2,2—3,1 раза в микросомах. Полученные данные позволяют предположить, что в условиях избытка ретинола в развивающейся нервной ткани происходит задержка включения НЭЖК, синтезированных в мозгу, или же поступивших из плазмы крови в ацилсодержащие липиды.

Таблица 2

Содержание неэстерифицированных жирных кислот в субклеточных фракциях головного и спинного мозга 22-дневных крыс (нг/мг белка)

Фракция	Контроль (n=7)	Гипервитаминоз А (n=6)	p
Головной мозг			
Микросомы	29.3±2.1	72.5±6.3	<0.001
Цитозоль	9.2±1.3	23.4±2.1	<0.001
Миелин	48.5±3.2	81.5±7.7	<0.01
Спинной мозг			
Микросомы	86.7±9.2	141.2±13.2	<0.01
Цитозоль	18.2±2.4	72.7±5.3	<0.001
Миелин	31.1±2.5	81.1±9.1	<0.001

Таблица 3

Удельная радиоактивность неэстерифицированных жирных кислот, выделенных из субклеточных фракций нервной ткани растущих крыс (нмп·мин⁻¹·мг(С)⁻¹)

Фракция	Контроль (n=7)	Гипервитаминоз А (n=6)	p
Головной мозг			
Микросомы	2416±213	1881±174	>0.05
Цитозоль	2459±269	1580±167	<0.05
Миелин	3216±344	2953±266	>0.05
Спинной мозг			
Микросомы	2219±295	1905±172	>0.05
Цитозоль	2395±278	1911±192	>0.05
Миелин	3419±310	2168±206	<0.01

Индивидуальный жирнокислотный состав фракции НЭЖК подтверждает последнее предположение: для гипервитаминозных животных характерно преобладание в составе НЭЖК пальмитиновой кислоты и резкое снижение доли арахидоновой и докозагексаеновой кислот (табл. 4). По-видимому, в условиях избытка витамина А вновь синтезированный пальмитат не сразу включается в сложные липиды мембран, а накапливается в цитозоле клеток нервной ткани. Кроме того, в мозгу подопытных крыс более чем в 5 раз возрастает содержание неэстерифицированной линоленовой кислоты, относящейся к

Таблица 4

Состав неэстерифицированных жирных кислот больших полушарий
головного мозга контрольных и подопытных крыс (в % от суммы)

Жирные кислоты		Контроль (n=4)	Вит. А (n=4)	p
Миристиновая	14:0	2,1±0,2	1,3±0,2	<0,05
Пентадекановая	15:0	1,3±0,2	1,0±0,1	>0,05
Пальмитиновая	16:0	17,1±0,9	29,1±2,3	<0,01
Пальмитолеиновая	16:1	2,6±0,3	3,0±0,3	>0,05
Стеариновая	18:0	25,3±2,1	29,0±2,3	>0,05
Олеиновая	18:1	18,3±0,7	15,3±0,9	>0,05
Линоленовая	18:3	1,0±0,2	5,3±0,6	<0,001
Эйкозеновая	20:1	1,2±0,1	1,0±0,1	>0,05
Генфкозеновая	21:1	1,2±0,2	2,0±0,3	>0,05
Арахидоновая	20:4	7,7±0,8	2,5±0,3	<0,01
Докозатетраеновая	22:4	2,8±0,5	1,4±0,2	<0,05
Докозагексаеновая	22:6	17,8±2,3	5,7±0,8	<0,01

Примечание. Первая цифра после названия кислоты означает число атомов углерода в молекуле, вторая—количество двойных связей. В таблице приведены жирные кислоты, содержание которых во фракции неэстерифицированных жирных кислот составляло не менее 1%.

незаменимым жирным кислотам. Снабжение мозга линоленовой кислотой осуществляется только из плазмы крови через ГЭБ [21]. Показано, что при избытке линоленовой кислоты в пище крыс в составе липидов мозга снижается содержание арахидоновой и докозагексаеновой кислот [22], аналогично обнаруженным нами изменениям в составе НЭЖК при избытке витамина А в растущем организме.

Таким образом, представленные результаты дают основание считать, что при гипervитаминозе А в нервной ткани нарушаются ацил-обменные механизмы и, возможно, происходит усиленный приток НЭЖК из плазмы крови. Это приводит к аккумуляции неэстерифицированных жирных кислот в растворимой части клеток, а затем и проникновению их во внутренние и внешние клеточные мембраны, в том числе миелиновые, что нарушает их биохимическую стабильность.

THE EFFECT OF VITAMIN A OVERDOSES ON METABOLISM OF NON-ESTERIFIED FATTY ACIDS OF NERVOUS TISSUES

OPARINA T. I., BLYUDZIN YU. A., PUTILINA F. E.

A. A. Ukhtomsky Physiological Institute, Leningrad State University

The subcellular distribution and incorporation of labeled precursors into the fraction of non-esterified fatty acids (NEFA) in brain and spinal cord of growing rats treated by overdoses of vitamin A have been examined. Oral administration of retinyl acetate over a period of 10D16 days of postnatal development at a dose of 1000 IU resulted in significant increase of NEFA level in all subcellular fractions, the level in the cytosol being the highest. We have also detected a decrease in incorporation of [2-¹⁴C] acetate into NEFA of myelin of the spinal cord caused by vitamin A overdose. Analysis by gas-chromatography has indicated an increased content of palmitic and linoleic acids as well as the drop in the level of arachidonic and docosahexaenoic acids in NEFA fraction of the brain during vitamin A administration. The obser-

ved characteristics of fatty acids metabolism in the nervous tissue due to excessive levels of retinol could be related to increasing transport of plasma NEFA through the brain-blood barrier.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Morell T.* — In: *The Vitamins. Chemistry, physiology, pathology, methods* (eds. W. H. Sebrell, R. S. Harris), v. 1, p. 280—294, New York — London, Acad. Press, 1967.
2. *Kistler A.* *Biochem. Soc. Trans.*, v. 14, № 5, p. 936—939, 1986.
3. *McLaren D. S.* *Amer. J. Clin. Nutr.*, v. 34, № 8, p. 1611—1616, 1981.
4. *Weber F.* *Proc. Nutr. Soc.*, v. 42, № 1, p. 31—41, 1983.
5. *Zile M. H., Cullum M. E.* *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v. 172, № 2, p. 139—152, 1983.
6. *Sklan D.* *Brit. J. Clin. Nutr.*, v. 50, № 2, p. 409—416, 1983.
7. *Shukla R. R., Srivastava N., Misra U. K.* *Biol. Neonate*, v. 46, № 6, p. 285—290, 1984.
8. *Опарина Т. И., Путилина Ф. Е.* *Нейрохимия*, т. 7, № 1, с. 95—98, 1988.
9. *Bourre J. — M. C. R. Soc. Biol.*, v. 178, № 5, p. 595—611, 1984.
10. *Дмитровский А. А.* — В кн.: *Экспериментальная витаминология* (под ред. Ю. М. Островского), с. 131—172, Минск, Наука и техника, 1979.
11. *Dugan R. E., Frigerio N. A., Seibert J. M.* *Anal. Chem.* v. 36, № 1, p. 114—117, 1964.
12. *Манукян К. Г., Левонян К. Л., Степанян А. А., Киракосян Л. Т.* — В кн.: *Вопросы биохимии мозга*, т. 12, с. 68—78, Ереван, АН АрмССР, 1977.
13. *Lewry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. I.* *Biol. Chem.*, v. 193, № 1, p. 265—275, 1951.
14. *Кейтс М.* *Техника липидологии*, М., Мир, 1975.
15. *Duncombe W. G.* *Biochem. J.*, v. 88, № 1, p. 7—10, 1961.
16. *Соколова Г. П., Кузнецова Г. Г., Золотова Л. А.* — В кн.: *Нервная система*, вып. 8, с. 53—58, Л., ЛГУ, 1967.
17. *Felsher K. J. J.* *Amer. Oil Soc.*, v. 14, № 1, p. 87—91, 1964.
18. *Опарина Т. И., Путилина Ф. Е.* *Вестник ЛГУ*, сер. 3, вып. 4, с. 113—115, 1986.
19. *Olson J. A.* *Biochem. Soc. Trans.*, v. 14, № 5, p. 928—930, 1986.
20. *Tom W. M., Fong I. Y. Y., Woo D. Y. H., Prasongwathana V.* *Chem. Biol. Interact.*, v. 50, № 3, p. 361—366, 1984.
21. *Dhopeswark G. A., Mead J. G.* *Adv. Lipid. Res.*, v. 11, p. 109—143, 1973.
22. *Huang D. H.* *Lipids*, v. 21, № 11, p. 697—701, 1987.

Поступила 12.I.1990



КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 612.822.1

ХРОНОБИОЛОГИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ДЕЛЬТА-СОН ИНДУЦИРУЮЩЕГО ПЕПТИДА И СИСТЕМА ГАМК В МОЗГУ КРЫС

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

НИИ нейрокибернетики, кафедра биохимии РГУ

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР

Изучено влияние внутрибрюшинно введенного дельта-сон индуцирующего пептида (ДСИП) на содержание гомокарнозина, ГАМК, глутаминовой и аспарагиновой кислот в различные сроки после его введения.

Обнаружено, что ДСИП вызывает увеличение содержания тормозных медиаторов и уменьшение содержания возбуждающих медиаторов, что сопровождается изменением активности ферментов их обмена.

Показано, что ДСИП обладает выраженным хронобиологическим действием.

В последние годы широко изучаются физиологические и биохимические эффекты пептида, который, как предполагали, является гуморальным фактором сна [1]. Его введение животным индуцировало в коре мозга медленно-волновую низкочастотную дельта-активность, что и определило его название дельта-сон индуцирующий пептид (ДСИП).

Более поздние исследования показали, что ДСИП обладает уникальным действием на функции и метаболизм мозга и всего организма животного. Особенно значимо, что эффект ДСИП проявляется в большой степени, когда животное находится в экстремальных или стрессовых условиях и продолжается в течение многих часов или дней после его однократного введения. ДСИП проявляет выраженное антистрессорное действие [2].

Предполагают, что ДСИП является модулятором нейромедиаторных систем. Одни авторы считают, что его действие реализуется через β -рецепторы адренергической системы [3]. Ряд работ свидетельствует о влиянии ДСИП на серотонинергические нейроны [4]. ДСИП изменяет активность МАО типа А [4]. Введение триптофана потенцирует индуцируемый ДСИП дельта-ритм [5].

Развивающаяся под действием ДСИП медленно-волновая дельта-активность мозга заставляет предположить его влияние на тормозные медиаторные системы мозга. Такие работы до сих пор не проведены. Главной тормозной системой мозга является ГАМК-ергическая [6]. Кроме того, получены доказательства тормозных эффектов гомокарнозина [7].

Мы исследовали состояние системы ГАМК и содержание гомокарнозина в мозгу крыс в разные сроки после введения ДСИП. В

ферментной системе синтеза и превращения ГАМК циркулируют две трансмиссивные аминокислоты—глутаминовая и аспарагиновая, которым присущи свойства возбуждающих медиаторов. Поэтому, принимая это исследование, мы сделали попытку определить соотношение тормозных и возбуждающих нейротрансмиссивных аминокислот мозга при действии ДСИП.

Материалы и методы

Опыты проводили на белых беспородных крысах массой 150—180 г. В процессе эксперимента животных делили на 7 групп. Первая группа состояла из интактных животных. Животным 2—7-й групп за 1, 2, 3, 7 ч. 1 и 3 суток до декапитации, соответственно, внутривенно вводили пептид дельта-сна в дозе 12 мкг на 100 г массы животного [8].

В мозгу крыс определяли содержание ГАМК и активность ферментов ее метаболизма: глутамат-1-декарбоксилазы (ГДК; КФ 4.1.1.16), 4-аминобутират-2-оксоглутаратамиинотрансферазы (ГАМК-Т-I; КФ 2.6.1.19), 4-аминобутират-2-оксоацетатамиинотрансферазы (ГАМК-Т-II; КФ 2.6.1.10). Содержание ГАМК, глутаминовой и аспарагиновой кислот определяли методом электрофореза на бумаге [9]. Об активности ГДК, ГАМК-Т-I и ГАМК-Т-II судили по накоплению конечных продуктов реакции—ГАМК, глутаминовой и аспарагиновой кислот соответственно. Результаты выражали в мкМ образованной аминокислоты на 1 г ткани. Содержание гомокарнозина определяли методом Young, Snyder [10] в модификации Бондаренко и Макленовой [11]. Результаты выражали в нмоль на 1 г ткани.

Результаты и обсуждение

В табл. 1 приведены результаты определения содержания ГАМК, гомокарнозина, глутаминовой и аспарагиновой кислот в мозгу крыс в разные сроки после введения ДСИП.

Из данных табл. 1 видно, что содержание ГАМК в мозгу крыс после введения ДСИП сохраняется на уровне контроля в первые 2 ч, а к 7-и ч возрастает на 37,8%. Содержание гомокарнозина, напротив, резко (на 58,4%) возрастает уже через 1 ч после введения ДСИП, затем постепенно снижается, но через 7 ч остается на 22,1% выше, чем в мозгу контрольных животных. Содержание глутаминовой кислоты через 1 ч после введения ДСИП—на уровне контроля, через 2 ч снижается на 28,1% и продолжает снижаться. К 7-и ч снижение составляет 37,4%. Содержание аспарагиновой кислоты под действием ДСИП не изменяется в течение 7-и ч после введения ДСИП. Эффект ДСИП, по-видимому, зависит от способа введения. Ранее нами показано, что при интерцестеральном введении ДСИП уже через 1 ч содержание ГАМК в коре и подкорковых структурах мозга крыс значительно возрастает [12]. ДСИП хорошо проходит через ГЭБ [3]. Несмотря на это, при его внутривенном введении влияние ДСИП на содержание ГАМК и глутамата проявляется только через определенное время, тогда как содержание гомокарнозина возрастает сразу после введения ДСИП. Связано это может быть с разной локализацией этих соединений в структурах и субклеточных фракциях мозга.

Через сутки после введения ДСИП содержание ГАМК в мозгу увеличивается на 30%, через 3 суток наблюдается дальнейшее повы-

Таблица 1

Содержание нейротрансмиттерных аминокислот и гомокарнозина в мозгу крыс после введения ДСИП ($M \pm m$, $n=6-10$; содержание аминокислот—мкмоль/г ткани, гомокарнозин—нмоль/г ткани)

	Контроль	1 ч	2 ч	3 ч	7 ч	1 суток	3 суток
ГАМК	$2,07 \pm 0,06$	$2,10 \pm 0,18$	$2,21 \pm 0,09$	$2,35 \pm 0,11^*$	$2,85 \pm 0,12^*$	$2,69 \pm 0,17^*$	$3,22 \pm 0,21^*$
Гомокарнозин	$63,73 \pm 4,28$	$100,96 \pm 3,76$	$88,62 \pm 2,50$	$80,69 \pm 3,73^*$	$77,84 \pm 4,96^*$	$5,35 \pm 0,35^*$	$60,67 \pm 2,46^{**}$
Глутамат	$7,79 \pm 0,36$	$7,46 \pm 0,40$	$5,60 \pm 0,21^*$	$5,43 \pm 0,25^*$	$4,88 \pm 0,10^*$	$5,35 \pm 0,35^*$	$6,94 \pm 0,32$
Аспартат	$2,30 \pm 0,13$	$2,13 \pm 0,24$	$2,10 \pm 0,11$	$2,41 \pm 0,25$	$2,63 \pm 0,11$	$2,76 \pm 0,03^*$	$2,35 \pm 0,12^*$

Примечание. *—достоверность различий по отношению к контролю $p < 0,05 \div 0,001$, **—[8].

Таблица 2

Активность ферментов системы ГАМК в мозгу крыс после введения ДСНП ($M \pm m$, $n=6-10$; мкмоль ГАМК/г ткани за 20 мин, мкмоль глутамата/г ткани за 40 мин, мкмоль аспартата/г ткани за 40 мин)

	Контроль	1 ч	2 ч	3 ч	7 ч	1 сутки	3 суток
ГДК	1.83 ± 0.05	1.82 ± 0.02	$1.66 \pm 0.05^*$	2.09 ± 0.12	1.95 ± 0.12	$1.59 \pm 0.10^*$	2.01 ± 0.23
ГАМК-Т-1	2.52 ± 0.10	2.28 ± 0.04	$2.08 \pm 0.12^*$	$2.00 \pm 0.11^*$	$1.89 \pm 0.10^*$	2.90 ± 0.25	2.63 ± 0.30
ГАМК-Т-2	1.99 ± 0.12	1.61 ± 0.35	1.75 ± 0.11	1.82 ± 0.19	1.72 ± 0.16	$1.58 \pm 0.08^*$	1.62 ± 0.13

Примечание. *—достоверность различий по отношению к контролю $p < 0.05$.

шение уровня ГАМК—на 55,6% по сравнению с контролем и на 23,4% по сравнению с сутками после введения. Параллельно повышению уровня ГАМК наблюдается и повышение уровня глутамата: через сутки после введения ДСИП содержание глутаминовой кислоты на 6,1% выше, чем через 7 ч, но на 31,3% ниже контроля; через 3 суток наблюдается дальнейшее повышение уровня глутамата.

Таким образом, после введения ДСИП крысам в мозг создаются условия для развития тормозного процесса. При внутрибрюшинном введении ДСИП уже в первые два часа тормозные процессы поддерживаются высоким содержанием гомокарнозина и значительно сниженным содержанием глутамата. Через 7 ч—тормозные процессы, видимо, усиливаются, так как повышен уровень как ГАМК, так и гомокарнозина, а концентрация глутамата значительно снижена. Полученные результаты хорошо согласуются с данными электрофизиологических исследований. Так, Schoenenberg, Schneider-Helmert [13] при периферическом введении кроликам ДСИП через 1 ч наблюдали увеличение дельта-активности в ЭКГ, которая сохранялась до 7-го ч эксперимента. Максимум достигался через 3—4 ч. Аналогичный эффект наблюдали Kafi и соавт. при периферическом введении ДСИП крысам [14].

Каковы возможные причины изменения содержания нейромедиаторных аминокислот при действии ДСИП? Исследована активность ферментов системы ГАМК—ГДК и двух трансаминаз—ГАМК-Т-I (субстрат оксоглутарат) и ГАМК-Т-II (субстрат оксалоацетат).

Из табл. 2 видно, что активность ферментов синтеза и превращения ГАМК—ГДК и трансаминаз существенно не изменяется. Активность ГАМК-Т-I снижается после 2, 3 и 7 ч после введения ДСИП на 17,5%, 20,6% и 25% соответственно. Такая динамика активности ГАМК-Т-I при практически неизменной активности ГДК имеет прямое отношение к уровню глутамата. Его содержание в мозгу через 2—7 ч после введения ДСИП снижается соответственно на 28,2—37,4%. Можно предположить, что в этот период ДСИП стимулирует использование глутамата путями, несвязанными с синтезом ГАМК. В работе Бондаренко и соавт. показано, что в мозгу после введения ДСИП возрастает содержание белка. Пока ничего не известно о влиянии ДСИП на биоэнергетику мозга и использовании глутамата как предшественника оксоглутарата в ЦТК.

При неизменной активности ГДК содержание ГАМК остается постоянным до 7 ч после введения ДСИП. Через 7 ч ее содержание повышается на 37,8%. Источником ГАМК, кроме глутамата, при стабильной активности ГДК, может быть путресцин. Ранее этот путь синтеза ГАМК был нами изучен [15]. Считают, что ГАМК, синтезированная из путресцина, расходуется на синтез гомокарнозина. Как показано в табл. 1, содержание гомокарнозина через 7 ч после введения ДСИП на 36,3% ниже по сравнению с 1 ч после введения. По данным Крупенинковой, уровень гомокарнозина в мозгу через 3 суток после введения ДСИП не отличается от контроля [8].

Таким образом, на примере системы ГАМК и содержания гомокарнозина показано, что введение ДСИП моделирует во времени развитие состояния торможения, максимум которого выявляется через 7 ч и 3 суток после введения пептида. Вероятно, что этот эффект определяет адаптогенные свойства ДСИП.

CHRONOBIOLOGICAL EFFECT OF δ -SLEEP-INDUCING PEPTIDE AND GABA SYSTEM IN RAT BRAIN

MENDZHERITSKII A. M., *USKOVA N. I., CHORAYAN I. O., **MIKHAILEVA I. I.

Institute of Neurocybernetics, Rostov

*Rostov State University

**N.N. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
USSR Academy of Sciences, Moscow

We studied the effect of intraperitoneally administered δ -sleep-inducing peptide on the level of homocarnosine, GABA, glutamic and aspartic acids at different periods after DSIP administration. DSIP leads to an increased level of the inhibitory transmitters and decreases the level of excitatory transmitters, which is accompanied by alterations in the activity of enzymes of their metabolism. It has been demonstrated that DSIP possesses a distinct chronobiological effect.

ЛИТЕРАТУРА

1. Monnier M., Dabier A., Gaehle R. *Shoenberg S. A.* *Neurosci. Lett.*, v. 6, p. 9-13, 1977.
2. Меерсон Ф. З., Заяц М. Г., Пчельникова М. Г., Божко А. П. *Кардиология*, т. 25, с. 84-88, 1988.
3. Graf M. V., Kastin A. J. *Feeder*, v. 7, p. 1165-1187, 1986.
4. Доведова Е. Л., Лешарин И. П. *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, т. 2, с. 56-58, 1982.
5. Yehuda S., Mostofsky D. *Int. J. Neurosci.*, v. 16, № 3-4, p. 221-224, 1982.
6. Сытинский П. А. Гамма-аминомасляная кислота—медиатор торможения. Л., Наука, 1977.
7. Кричевская А. А., Бондаренко Т. И., Маклецова М. Г. *Нейрохимия*, т. 4, № 3, с. 314-326, 1985.
8. Менджерицкий А. М., Маклецова М. Г., Карпухина И. Ю. *Нейрохимия*, т. 6, № 3, с. 422-425, 1987.
9. Tapia R. *Handbook of Neurochem.* v. 3, p. 423-465, 1983.
10. Joung A. B., Snyder S. H. *J. Neurochem.*, v. 21, № 2, p. 387-396, 1973.
11. Бондаренко Т. И., Маклецова М. Г. *Лаб. дело*, № 2, с. 204-206, 1982.
12. Менджерицкий А. М., Ускова Н. И., Чораян И. О. *Нейрохимия*, т. 7, № 2, с. 312-313, 1988.
13. Shoenberg G. A., Schneider-Helmert A. *Trends Pharm. Sci.*, v. 4, p. 307-310, 1983.
14. Kafi S., Monnier M., Gallard M. *Neurosci. Lett.*, v. 13, 169-172, 1979.
15. Ускова Н. И. Метаболизм гомокарнозина в мозге в онтогенезе и при действии экстремальных факторов на крыс. Автореферат канд. дис., Ростов-на-Дону, 1986 г.

Поступила 2.II.1990



УДК 577.1+577.15

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ МОНОАМИНОКСИДАЗ МОЗГА
ПРЕДРАСПОЛОЖЕННЫХ К КАТАЛЕПСИИ КРЫС
НА УРОВНЕ ТРАНСКРИПЦИИ

ВОЙТЕНКО Н. Н.

Институт цитологии и генетики СО АН СССР, Новосибирск

В основе одной из распространенных психопатологий поведения — шизофрении лежит нарушение метаболизма нейромедиаторов мозга, в частности дофамина и серотонина [1], что вызывает необходимость тщательного изучения молекулярных механизмов регуляции метаболизма нейромедиаторов. Роль генома в регуляции активности МАО [(МАО) амин: кислород оксидоредуктаза (дезаминирующая) (содержащая флаavin)], фермента деградации многих моноаминов, при этой патологии поведения изучена мало. Ранее нами был установлен высокий уровень активности МАО типа Б у крыс, селекционированных на предрасположенность к развитию каталепсии [2], которая является одним из синдромов шизофрении.

В настоящей работе изучали роль генома в вызываемых эмоциональным стрессом изменениях активности МАО мозга у генетически предрасположенных к каталепсии крыс, селекционированных из аутбредной линии *Wistar* [2].

Крыс с генетической каталепсией (ГК) в возрасте 4 месяцев, массой 220—250 г за два дня до эксперимента помещали в индивидуальные клетки для снятия эффекта группового содержания на поведение и метаболизм нейромедиаторов мозга. Корм и воду не ограничивали. Световой режим соответствовал сезону (ноябрь). Эмоциональный стресс вызывали содержанием крыс в тесных проволочных клетках в течение 60 мин. Контролем служили интактные крысы, находившиеся в это время в своих обычных клетках. Актиномицин Д («Fluka», ФРГ) в дозе 10 мкг на 100 г [3] вводили крысам интраперитонеально за 60 мин до помещения крыс в тесную клетку. Контролем служили крысы, получавшие актиномицин Д без последующего ограничения подвижности. Эту группу животных декапитировали в 11 ч. Кроме того, другую группу животных, предрасположенных к каталепсии, и крыс линии *Wistar* декапитировали в 9 ч, поскольку известны суточные колебания активности МАО мозга [4]. Мозг (без мозжечка) выделяли на холоде, гомогенизировали в 0.32 М растворе сахарозы, методом дифференциального центрифугирования выделяли фракцию неразделенных митохондрий P_2 [4], которую хранили при -20° до исследования. Определение активности МАО проводили по Горкину и соавт. [5] в модификации Силаковой и соавт. [6]. Специфическим субстратом МАО типа А служил 1.0 мМ серотонин

креатининсульфат («Reanal», Венгрия), специфическим субстратом МАО типа Б—1,0 мМ бензиламин солянокислый (Харковский ФЗ, СССР). Активность МАО выражали в нмоль аммиака за мин на мг белка. Белок определяли по Lowry.

Полученные нами данные (рис. 1) свидетельствуют о более высокой активности МАО типа Б в мозгу предрасположенных к катаlepsии крыс и согласуются с нашими предыдущими данными [2]. В настоящем исследовании, проведенном на целом мозгу, не обнаружено различий в исходной активности МАО типа А у крыс каталептиков и некаталептиков, хотя ранее нами наблюдалось [2] понижение активности МАО типа А в полушариях мозга крыс каталептиков. Это свидетельствует о возможности локального нарушения метаболизма серотонина, специфического субстрата МАО типа А при катаlepsии.

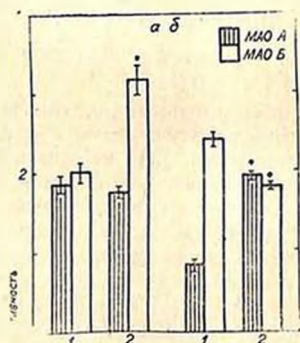


Рис. Активность МАО типа А и типа Б (нмоль NH_3 /мг белка·мин) мозга крыс линии Wistar (1) и предрасположенных к катаlepsии крыс (2) в 11 ч (а) и в 9 ч (б). * $p < 0,05$ по сравнению с крысами линии Wistar (1)

Таблица
Изменение активности МАО мозга крыс, предрасположенных к катаlepsии, под влиянием ограничения подвижности

Серия опытов	Число животных	МАО типа А	МАО типа Б
Контроль (11 ч)	4	$1,78 \pm 0,04$	$3,23 \pm 0,20$
Стресс	5	$1,66 \pm 0,07$	$4,08 \pm 0,18^{**}$
Актопомидин Д	5	$1,81 \pm 0,14$	$3,08 \pm 0,11$
Актопомидин Д + стресс	5	$2,23 \pm 0,16$	$2,03 \pm 0,11^*$

Примечание. * $p < 0,05$ по сравнению с актопомидином Д, ** $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Предрасположенные к каталепсии крысы на эмоциональный стресс, вызванный ограничением подвижности, реагировали повышением активности МАО типа Б при неизменной активности МАО типа А (таблица). Эта реакция существенно отличалась от описанной нами ранее [7] реакции МАО мозга крыс линии *Wistar*, у которых ограничение подвижности вызывало существенное понижение активности МАО типа Б и повышение активности МАО типа А.

Действие стресса на МАО типа Б, характерное для крыс линии *Wistar*, то есть понижение ее активности у предрасположенных к каталепсии крыс проявлялось только после предварительного введения актиномицина Д, ингибитора синтеза ДНК-зависимой РНК-полимеразы (таблица). Это дает основание предположить, что у крыс каталептиков под влиянием стресса синтезируется м-РНК, которая кодирует индуцибельную группу МАО типа Б. Судя по тому, что у крыс каталептиков активность МАО типа Б под влиянием стресса после предварительного введения актиномицина Д была даже ниже, чем при введении актиномицина Д без стресса, следует полагать, что синтез конститутивной группы МАО типа Б у крыс каталептиков также нарушен. Обнаруженная нами устойчивость МАО типа А к воздействию эмоционального стресса и актиномицина Д у предрасположенных к каталепсии крыс может быть связана с изменением структуры этого типа МАО, что предполагается у больных шизофренией [8].

Следует отметить, что были обнаружены существенные изменения в активности МАО мозга в течение утренних часов. Так, в 9 ч активность МАО типа Б (рисунок) у крыс каталептиков была ниже, а активность МАО типа А выше, чем у крыс линии *Wistar*. Наряду с этим, в 11 ч у крыс каталептиков изменялась только активность МАО типа Б (повышалась), активность МАО типа А оставалась на неизменном уровне. У крыс линии *Wistar* к 11 ч изменялась активность обоих типов МАО, но эти изменения отличались от тех, которые наблюдались у каталептиков: у крыс линии *Wistar* повышалась активность МАО типа А и понижалась активность МАО типа Б (рисунок), и эти данные совпадают с полученными нами ранее в 11 ч [2]. Приведенные факты свидетельствуют о неодинаковом колебании активности МАО мозга в зависимости от времени суток у предрасположенных и непредрасположенных к каталепсии крыс. Можно предположить, что неадекватное изменение активности МАО типов А и Б мозга у каталептиков связано с нарушением регуляции активности фермента и ведет к рассогласованию физиологических функций этих двух типов МАО в мозгу, которое может проявиться в разбалансировании процессов освобождения и обратного захвата серотонина и дофамина [9], в нарушении серотониновой и дофаминовой нейротрансмиссии [10], в проявлении патологического поведения, каталепсии.

Таким образом, у предрасположенных к каталепсии крыс ГК при эмоциональном стрессе в 11 ч найдено повышение активности МАО типа Б в мозгу при неизменной активности МАО типа А. Регуляция активности МАО типа Б в это время при эмоциональном стрессе у предрасположенных к каталепсии крыс изменена, по-видимому, на уровне транскрипции. Устойчивость МАО типа А крыс каталептиков к эмоциональному стрессу следует, вероятно, связывать с измененной структурой этого фермента. Найденные нарушения в регуляции активности МАО мозга у предрасположенных к каталепсии крыс, по всей видимости, могут являться причиной рассогласования в работе

МАО мозга, которое проявляется в неадекватном изменении активности МАО в зависимости от времени суток, а также вызывать predisposed к катаlepsии.

CONTROL OF BRAIN MONOAMINE OXIDASE ACTIVITY IN RATS PREDISPOSED TO CATALEPSY AT THE TRANSCRIPTION LEVEL

VOITENKO N. N.

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

The activity of MAO-B increased, whereas that of MAO-A remained unchanged in rats genetically predisposed to catalepsy (GC) under emotional stress. A stress-induced decrease in MAO-B activity observed in control rats, was detected in GC rats only after pretreatment with Actinomycin D. In GC rats, MAO-A proved to be insensitive both to stress and Actinomycin D. It is proposed that MAO-A structure is altered in GC rats and emotional stress induces synthesis of MAO-B molecules.

ЛИТЕРАТУРА

1. Попова Н. К., Науменко Е. В., Колпаков В. Г. Серотонин и поведение, Новосибирск, 1978.
2. Попова Н. К., Войтенко Н. Н., Колпаков В. Г., Алехина Т. А. Нейрохимия, т. 7, № 4, с. 525—531, 1988.
3. Gandhi B. S., Kanungo M. S. Indian J. Biochem. Biophys., v. 11, p. 102—104, 1974.
4. Gray E. G., Whittaker V. P. J. Anat., part. 1, p. 79—87, 1962.
5. Горкин В. З., Гриднева Л. И., Романова Л. А., Сенирина Н. С. Биохимия, т. 27, № 6, с. 1004—1014, 1962.
6. Силакова А. И., Труш Г. П., Являкова А. Вopr. мед. химии, № 8, с. 538—545: 1962.
7. Попова Н. К., Войтенко Н. Н., Маслова Л. Н. Вopr. мед. химии, № 4, с. 114—119, 1989.
8. Москвитина Т. А., Камышанская Н. С., Горкин В. З. Вopr. мед. химии, № 1, с. 98—102. 1986.
9. Liclone J., Azzaro A. J. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., v. 337, № 2 p. 151—159. 1988.
10. Henn F. A. — In: Biological Perspectives of Schizophrenia (eds. H. Helmchen, F. A. Henn), p. 299—309, John Wiley, Sons Limited C S. Bernhard, Dahlem Konferenzen, Rept. Dahlem Workshop Berlin, 1987.

Поступила 12.II.1990



УДК 577.1

ВЛИЯНИЕ НЕЙРОГОРМОНА «С» НА СИНТЕЗ И ЗАХВАТ $[^3\text{H}]$ НОРАДРЕНАЛИНА НАДПОЧЕЧНИКАМИ КРЫС ГАЛОЯН А. А., КАРАПЕТАН Р. О., ПОПОВА Т. В.

Институт биохимии им. Г. Х. Бунятыяна АН Армении, Ереван

Мозговой слой надпочечников, как показано многочисленными эмбриологическими исследованиями, развивается из одного источника с симпатической системой—из нейронального гребня [1]. По общему принципу все органы и ткани организма получают симпатическую иннервацию в виде конечного ее звена—постганглионарных адренергических волокон. Исключение составляет мозговой слой надпочечников, который иннервируется преганглионарными холинергическими волокнами, а сам представляет собой своеобразный аналог постганглионарных адренергических нейронов и имеет в своем составе два типа клеток, один из которых содержит адреналин, другой—норадреналин [2].

Существует определенное сходство между хромоаффинными и ганглионарными клетками надпочечников: и те и другие имеют катехоламинсодержащие гранулы (везикулы), иннервируемые преганглионарными холинергическими волокнами [3, 4]. Н-холиномиметические вещества возбуждают их, а Н-холинолитики тормозят функцию этих клеток. Имеются данные о том, что в надпочечниках существуют и мускариновые рецепторы, участвующие в реализации стимулирующего влияния АХ. Никотин в больших дозах полностью не снимает стимулирующего влияния АХ, остаточный эффект последнего блокируется атропином [3]; высвобождение катехоламинов из мозгового слоя надпочечников достигается также введением мускариноподобных препаратов [5].

В настоящей работе мы поставили задачу выяснить действие нейрого르몬а «С» (нС) на захват $[^3\text{H}]$ норадреналина надпочечниками крысы при предварительном применении или сочетании с нС блокаторов различных рецепторов, а также степень синтеза $[^3\text{H}]$ норадреналина и $[^3\text{H}]$ дофамина из $[^3\text{H}]$ тирозина под влиянием нС, пропранолола и фентоламина.

Опыты проводили на белых крысах линии Vistar массой 180—200 г. Крыс оглушали электрическим током и декапитуировали. Надпочечники инкубировали в растворе Тироде, содержащем (в мМ): NaCl —153,9, KCl —4,5, CaCl_2 —2,5, MgCl_2 —1,0, NaHCO_3 —11,9, NaH_2PO_4 —1,0, глюкозу—5,5, аскорбиновую кислоту—2,8 в камере объемом 10 мл при 37°, насыщенной кислородом. Захват $[^3\text{H}]$ норадреналина определяли по методу Волиной [6, 7]. Синтез катехоламинов из $[^3\text{H}]$ тирозина определяли по методу Волиной, Манухина [8, 9].

Радиоактивность измеряли на жидкостном сцинтилляционном счетчике SL-30 «Intertechnique» (Франция), с внешним стандартом, что позволило выразить захват $[^3\text{H}]$ норадреналина в распадах в мин на 1 г ткани. В опытах был использован $[^3\text{H}]$ норадреналин с У. А. 8,2 Ки/ммоль и $[^3\text{H}]$ тирозин—13,5 Ки/ммоль («Amersham», Англия).

Для того, чтобы выяснить влияние нС на синтез катехоламинов из $[^3\text{H}]$ тирозина в надпочечниках, была поставлена серия параллельных опытов с нС, пропранололом и фентоламином.

Блокада α -адреноблокатором—фентоламином—в концентрации $5 \cdot 10^{-7}$ М приводит к активации синтеза норадреналина на 171%, дофамина—на 250%. Захват норадреналина при этом увеличивается на 246% ($p < 0,001$).

β -Адреноблокатор—пропранолол—в тех же концентрациях усиливает синтез норадреналина на 73%, захват—на 122%, а синтез дофамина—на 105% (таблица). В надпочечниках нС усиливает захват и синтез аминов. Так, например, в значительных меньших концентрациях нС (10^{-10} — 10^{-6} М) захват норадреналина увеличивает на 348% ($p > 0,001$), синтез—230% ($p < 0,01$), а дофамина—на 323% ($p < 0,01$) по сравнению с контролем. В сочетании с нС вызывает снижение захвата аминов (рисунок).

Таблица

Влияние нейrogормона «С», пропранолола и фентоламина на синтез катехоламинов из $[^3\text{H}]$ тирозина в надпочечниках крыс (счет/мин/г; $n=6$)

Соединения	$[^3\text{H}]$ норадреналин	%*	$[^3\text{H}]$ дофамин	%*
Контроль	8717 $\pm$ 1250		15989 $\pm$ 144	
Пропранолол, $5 \cdot 10^{-7}$ М	15112 $\pm$ 2523 $p < 0,05$	73	32634 $\pm$ 1444 $p < 0,01$	105
Фентоламин, $5 \cdot 10^{-7}$ М	23597 $\pm$ 4633 $p < 0,01$	171	56020 $\pm$ 7357 $p < 0,01$	250
Нейрогормон «С» 0,2 ФДЭ. Е	28777 $\pm$ 3070 $p < 0,01$	230	67627 $\pm$ 11046 $p < 0,01$	323

Примечание. % изменения по сравнению с контролем.

Интерес представляют данные, полученные под влиянием ингибиторов нейронального захвата кокаина ($5 \cdot 10^{-5}$ М) и десметилимипрамина (ДМИ; $5 \cdot 10^{-7}$ М), а также в сочетании их с нС. Кокаин и ДМИ как специфические ингибиторы нейронального захвата действуют по-разному. Кокаин активрует захват амина на 254%, а ДМИ ингибирует его. Как видно, нС заметно конкурирует с кокаином. Если кокаин увеличивает захват норадреналина, то в сочетании с нС захват снижается до 86%. Блокадой множественных форм рецепторов (или общего для всех рецепторов звена) можно объяснить небольшую активность нС, увеличивающую захват норадреналина надпочечниками. С одной стороны, нС усиливает захват норадреналина, с другой стороны, увеличивает чувствительность различных медиаторов к рецепторам.

Ингибитор экстранейронального захвата изопропилнорадреналин (ИЗПНА) ($5 \cdot 10^{-7}$ М) вызывает усиление захвата амина на 251% ($p > 0,001$), в сочетании с нС эффект снижается до 47%.

Блокаторы рецепторов морфина палтрексон ($0,3 \cdot 10^{-8}$ М) и на-

локсон ($0,39 \cdot 10^{-8}$ М), влияющие на общее звено, по характеру действия разные. Налоксон стимулирует захват амина на 102% ($p < 0,01$), налтрексон—лишь на 16%. Но в сочетании с нС этот стимулирующий эффект сохраняется с налтрексоном, который захват амина доводит до 200% ($p < 0,001$). По-видимому, нС блокирует общее звено для всех рецепторов ко всем агонистам, тем самым как бы деблокируя эффект блокаторов, создавая условия для экономного расхода медиаторов и выполнения тех или иных физиологических процессов. Эффект сочетания нС с налтрексоном можно, по-видимому, объяснить тем, что налтрексон связывается не теми рецепторами, с которыми связывается налоксон или, что с этими рецепторами не взаимодействует нС.

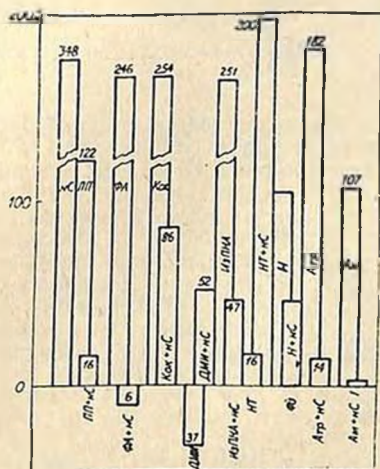


Рис. Захват [^3H]норадреналина в надпочечниках под влиянием нейрогормона «С» и его сочетаний с ингибиторами адreno-, морфо- и холинорецепторов. нС—нейрогормон «С», ПП—пропранолол, ФА—фентоламин, Кок—кокаин, ДМИ—десметилнорэпинефрин, ИЗПНА—изопропил-норадреналин, НТ—налтрексон, Н—наллоксон, Атр—атропин, Ам—амизил. По оси ординат—отклонение от контрольных данных в %

Представляют особый интерес данные, полученные с литиками холинорецепторов: «А», которые вызывают стимулирование захвата норадреналина на 182 и 107% соответственно ($p < 0,001$). В сочетании с нС наблюдается понижение захвата, что позволяет считать, что при сочетании с указанными блокаторами рецепторов, нейрогормон препятствует их

захвату надпочечниками. При захвате норадреналина в различных органах нС действует как бы противоположно, скорее регулируя этот процесс, то есть нС действует подобно блокаторам.

Вероятно, действие нС обусловлено влиянием посредством специфических рецепторов на клеточную мембрану, которое приводит к повышению чувствительности встроенных в нее рецепторов к специфическим медиаторам и, возможно, активации транспортных систем.

THE EFFECT NEUROHORMONE C ON SYNTHESIS AND UPTAKE OF [3 H]NORADRENALINE BY RAT ADRENALS

GALOYAN A. A., KARAPET'YAN R. O., POPOVA T. V.

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Armenia, Yerevan

Neurohormone C (nC) in the concentration of 0.2 PDE E increases the uptake and synthesis of catecholamines. Blockers of various receptors (α - and β -adrenergic receptors, cholinergic receptors and morphine) stimulate the uptake of [3 H]noradrenaline but to a lower extent than nC. When nC is given in combination with various blockers of these receptors, the effect is prevented with the exception of Naltrexone which increases the uptake of amines by 200%. Neurohormone C probably has specific receptors on cell membranes of adrenals and stimulates the sensitivity of these receptors to agonists creating conditions for the economical consumption of the transmitters. The effect of nC+Naltrexone combination can be explained by the circumstance that nC probably does not interact with morphine receptors blocked by Naltrexone.

ЛИТЕРАТУРА

1. Смиттен Н. А. Симпато-адреналовая система в филогенезе и онтогенезе позвоночных, Наука, М., 1972.
2. Parkkinen A. Distribution of adrenaline, noradrenaline, adenylyl phosphatase cholinesterases and non-specific esterases in the adrenal medulla of some mammals, Helsinki, 1962.
3. Feldberg W., Minz B. J. *Physiol.*, v. 81, p. 286—304, 1934.
4. Dale H. H. Acetylcholine as a chemical transmitter of the effects of nerve impulses. The William Henry Welch Lectures. 1939 —Reprinted in Dale H. H. *Advances in physiology*, L3, p. 611, 1965.
5. Douglas W. W., Foinser A. M. *Nature* v. 208 № 5015, p. 1102—1103, 1965.
6. Волина Е. В. Проблемы эндокринологии, т. 23, № 1, с. 87—90, 1977.
7. Волина Е. В. *Физиол. журн. СССР*, т. 64, № 1, с. 118—121, 1978.
8. Волина Е. В., Манухин Б. Н. *Физиол. журн. СССР*, т. 61, № 4, с. 569—574, 1975.
9. Манухин Б. Н., Волина Е. В., Мелентьева А. А. *Физиол. журн. СССР*, т. 63, № 1, с. 79—84, 1977.

Поступила 1.II.1990



УДК 577.1:577.125:620.186:611.8:615.099.091

МЕТАБОЛИЗМ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В ГОЛОВНОМ МОЗГУ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОТЕКЕ

ПОГОСЯН А. Ю., ОВСЕПЯН Л. М., *ОВЕЯН Г. А., **ПАНОСЯН А. Г.,
КАРАГЕЗЯН К. Г., ПЕПОЯН А. З.

Институт экспериментальной биологии АН Армении, Ереван

*Ереванский государственный медицинский институт

**ИТОХ им. Миджояна, Ереван

Из литературы [1, 2] известна губительная роль больших концентраций неэстерифицированной арахидоновой кислоты (C_{22}) в усугублении отека процесса в головном мозгу. Превращения свободной $C_{20:4}$ могут развиваться, по крайней мере, по четырем основным направлениям: путем ферментативного β -окисления, через перекисление по свободнорадикальному механизму с образованием гидроперекисей и перекисей в сторону биосинтеза биологически активных соединений типа простагландинов, лейкотриенов, тромбоксанов и ряда промежуточных веществ и, наконец, посредством реэстерификации их в составе вновь формирующихся молекул фосфолипидов (ФЛ). Эти процессы, очевидно, являются важным звеном в формировании компенсаторно-приспособительной, защитной функции данной биологической системы и организма в целом, что в условиях отека мозга (ОМ), по всей вероятности, имеет особое значение. Оно расценивается как проявление так называемой «биологической нейтрализации» жирных кислот (ЖК), в том числе и $C_{20:4}$, высокие концентрации которых обладают детергентным действием на биологические системы и главным образом клеточные мембраны. В отмеченном контексте и было проведено настоящее исследование.

В молекулярной организации биологических мембран ЖК придается существенное значение как факторам, обуславливающим высокую степень жидкости этих образований, соединениям, создающим соответствующее микроокружение, необходимое для максимального обеспечения функциональной активности мембранных белков-рецепторов и мембраносвязанных ферментов [3]; присутствие свободных ЖК в тканевых системах, в частности в головном мозгу, интенсивно влияет на протекающие в них метаболические процессы.

Целью настоящего исследования явилось изучение состава ЖК ФЛ, а также процессов ПОЛ при экспериментальном ОМ. Ставилась задача проследить за динамикой содержания эстерифицированной $C_{20:4}$ в головном мозгу при его отеке, вызванном тетраэтиловым, что явилось бы показателем приспособительной функции организма, направленной на возможное лимитирование ее свободной формы путем эстерификации в составе ФЛ, синтезирующихся *de novo*.

Исследования проводили на беспородных белых крысах, содержащихся на обычном пищевом рационе. Экспериментальный ОМ вызывали внутрибрюшинным введением 0,2%-ного раствора тетраэтилолова, приготовленного на подсолнечном масле, в дозе 10 мг на 1 кг массы животного. Критерием развивающегося отека служило увеличение в мозговом веществе содержания общей воды и нарушение его микроструктуры. Суждения об увеличении количества воды при формировании ОМ строились по весовым различиям остатков мозговой ткани, тщательно высушенных при температуре 110° до постоянной массы. Экстракцию ФЛ производили из ацетоновых порошков мозговой ткани по методу Folch [4], в модификации Карагезяна [5]. Метиловые эфиры ЖК ФЛ получали по методу Штоффеля [6], их состав определяли методом ГЖХ на хроматографе «Хром-5» (ЧССР) с пламенноионизационным детектором. Идентификацию метиловых эфиров ЖК проводили путем сравнения с хроматограммой смеси их насыщенных и ненасыщенных представителей с длиной углеродной цепи C_{14-22} . Об активности ПОЛ судили по содержанию малонового диальдегида, образующего с тиобарбитуровой кислотой цветное окрашивание, интенсивность которого регистрировали спектрофотометрически при длине волны 535 нм [7]. Количество перекисей пересчитывали на 1 мг белка [8]. Статистическую достоверность полученных результатов рассчитывали по шкале Стьюдента-Рихтера.

Визуально ОМ проявлялся потерей координации, параличом конечностей, потерей аппетита, а также отчетливыми расстройствами микроструктуры коры теменной области головного мозга, отраженными на рисунке (а, б). Микроскопический анализ мозга свидетельствует о том, что при примененной дозе тетраэтилолова и при декарпитации животных на 3-и сутки наблюдается четко выраженный отек в виде характерного диффузного разрыхления белого вещества мозга [9].



Рис. Кора теменной доли: а—контроль ($\times 180$), б—отечное разрыхление белого вещества ($\times 290$); целлондин, гематоксилин-эозин

Как показали результаты проведенных исследований, при экспериментальном ОМ наблюдаются глубокие изменения в ЖК ФЛ (табл. 1). По нашим данным, в составе указанных соединений имеет место уменьшение содержания пальмитиновой ($C_{16:0}$), пальмитоолеиновой ($C_{18:1}$), стеариновой ($C_{18:0}$) ЖК. Значительно возрастает уровень содержания полиеновых ЖК в основном за счет увеличения процента содержания $C_{20:2}$, что заслуживает особого внимания. Сумма насыщенных ЖК уменьшается.

Таблица 1

Жиросекислотный состав фосфолипидов (% от суммы всех жирных кислот) головного мозга белых крыс в норме и при экспериментальном отеке мозга

Жирные кислоты (ЖК)	Контроль	Опыт
C _{11:0} 16:0	следи 28,6±0.3	следи 23,30±0.33 p<0.001
C _{16:1}	1,64±0.02	1,25±0.02 p<0.001
C _{17:0} C _{18:0}	следи 29,70±0.45	следи 26,80±0.17 p<0.001
C _{18:1} C _{19:0}	32,10±0.25 следи	33,10±0.13 следи
C _{20:0} C _{20:1}	4,66±0.6	следи 4,04±0.16 p<0.5
C _{20:4}	2,75±0.01	11,5±0.3 p<1.001
C _{21:0} Сумма насыщенных ЖК	следи 58,30±0.75	следи 50,1±0.5 p<0.001
Сумма моноеновых ЖК	38,40±0.87	38,40±0.49 11,5±0.3
Полиеновые ЖК	2,75±0.01	49,90±0.79 p<0.001
Сумма ненасыщенных ЖК	41,20±0.88	

Zands, Merkl [10] показали существование так называемого цикла деацилирования—реацилирования при активном участии фосфолипазы А₂. Процесс деградации ФЛ сопровождается образованием значительного пула лизопронзводных этих соединений при одновременном активировании ацилтрансфераз, катализирующих реакции ацилирования лизофосфолипидов присоединением новой молекулы ЖК взамен отщепленной. По всей видимости, ацилообменный механизм является особенно важным для контроля качественных изменений полиеновых ЖК во втором положении глицерина в молекуле ФЛ. Изменение гидрофобных областей мембраны при переходе диацильных форм ФЛ в моноацильные и обратно оказывает существенное влияние на степень проницаемости различных веществ, транспорт ионов. При отщеплении полиеновых ЖК наблюдается резкое снижение активности Na⁺ K⁺ АТРазы [11]. Дальнейший ход обмениваемости этих соединений преимущественно протекает в направлении ферментативного окисления с образованием углекислоты и воды. Значительная часть их окисляется также по свободнорадикальному механизму с образованием перекисей и гидроперекисей и, наконец, они служат субстратом в процессах простагландинов синтеза. По нашим данным, экспериментальный ОМ сопровождается активированием процесса ПОЛ (табл. 2) как в аскорбат-, так и в NADPH-зависимых системах окисления липидов. Известно, что микросомы мозга содержат NADPH-специфичный флавопротеид и цитохром В₅, тогда как цитохром Р₄₅₀ в этих мембранах полностью отсутствует. Именно на NADPH-специфичном флавопротеиде происходит активация кислородс с образованием супероксидного анион-радикала или гидроксил-

Таблица 2

Содержание гидроперкисей и перекисей в общем гомогенате и в микросомной фракции при экспериментальном отеке мозга

Условия опыта	Микросомная фракция				Общий гомогенат			
	Контроль		Опыт		Контроль		Опыт	
Тип перекисления	НФП	ФП	НФП	ФП	НФП	ФП	НФП	ФП
Гидроперекиси $E_{480}/\text{мг}$ белка	0.549 ± 0.040	0.308 ± 0.030	0.731 ± 0.030 $p < 0.002$ $n = 10$	0.584 ± 0.020 $p < 0.001$ $n = 10$	0.419 ± 0.060	0.292 ± 0.050	0.648 ± 0.030 $p < 0.001$ $n = 10$	0.492 ± 0.040 $p < 0.001$ $n = 10$
Перекиси	2.07 ± 0.07	1.42 ± 0.08	3.04 ± 0.17 $p < 0.001$ $n = 8$	2.07 ± 0.1 $p < 0.001$ $n = 8$	1.662 ± 0.020	0.810 ± 0.070	1.857 ± 0.020 $p < 0.001$ $n = 7$	1.044 ± 0.020 $p < 0.01$ $n = 7$

Примечание. НФП—неферментативное аскорбатзависимое перекисление, ФП—ферментативное перекисление.

радикала. Не менее вероятной является и версия, допускающая возможность образования синглетного кислорода [12]. Супероксидный анион-радикал, генерируемый ксантиноксидазой при окислении ксантина, может индуцировать в мозгу липопероксидацию $C_{20:1}$ [13].

Окисление $C_{20:1}$ в мозгу катализируется циклооксигеназой и липооксигеназой. В первом случае основными продуктами метаболизма $C_{20:1}$ являются простагландины и тромбоксаны, во втором — гидроокискислоты, лейкотриены и липоксены. Имеются указания о существовании параллелизма между развитием отека-набухания и изменением содержания в мозгу простагландинов [14]. Особого внимания заслуживают продукты липооксигеназного окисления C_{18} . Это, в частности, касается биосинтеза 12/S/-12-гидроксн-5z, 8z, 10E, 14z-эйкозатетраеновой кислоты в мозгу, заметно активирующегося при ишемических состояниях [15], и роли лейкотриена C_4 [16] в обеспечении определенного статуса функционирования ГЭБ. Увеличение концентрации этих соединений в сосудистом сплетении способствует их участию в секреции цереброспинальной жидкости из крови в ЦНС. Лейкотриен C_4 сохраняется неизменным в течение нескольких часов в цереброспинальной жидкости и медленно превращается в лейкотриены D_4 и E_4 .

Приведенные выше данные свидетельствуют о том, что ОМ сопровождается выраженными и достаточно специфичными сдвигами в обмене липидов и ЖК. Нами показано, что многократное увеличение уровня эстерифицированной $C_{20:1}$ в составе ФЛ отечного мозга является отчетливым частным проявлением компенсаторно-приспособительной функции организма. Одним из показателей ее является эффект максимального лимитирования пула неэстерифицированной формы $C_{20:1}$, обладающей в высоких концентрациях способностью усугубить формирование и течение отечного процесса путем включения ее в состав вновь синтезирующихся ФЛ. Изучение функциональной роли продуктов окисления C_{18} является задачей наших дальнейших исследований.

METABOLISM OF FATTY ACIDS IN BRAIN DURING EXPERIMENTAL OEDEMA

POGOSYAN A. YU., OVSEPYAN L. M., OVEYAN G. A., PANOSYAN A. G.,
KARAGEZYAN K. G., PEP. YAN A. Z.

Institute of Experimental Biology, Academy of Sciences of the Armenia,
Yerevan

Using gas-liquid chromatography we have determined that the level of palmitic, palmitic-oleic and stearic acids markedly decreases during the experimental brain oedema. The level of polyunsaturated fatty acids increases markedly, mainly due to the elevation of arachidonic acid, whereas the sum total of saturated fatty acids goes down. Experimental brain oedema is accompanied by a statically significant elevation of hydroperoxides and malonic acid dialdehyde, both in ascorbate- and NADP-dependent systems of lipid oxidation. Our data lead to a hypothesis that the increased level of polyunsaturated fatty acids and activation of LPO play an important role in pathogenesis of brain oedema.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chan P. H., Fishman R. A. J. Fed. Proc., v. 43, № 2, p. 210—213, 1984.
2. Cestaro B., Viani P., Cerwato ., Marchesini S. J. Neurochem., v. 44, suppl., S57 C, 1985
3. Крепс Е. М. — В кн.: Липиды клеточных мембран, с. 225—240, Л., Наука, 1981.
4. Folch I. Biol. Chem., v. 146, p. 35—40, 1942
5. Карагезян К. Г. — В кн.: Фосфолипиды и их роль в жизнедеятельности организма, Ереван, 1972.
6. Методы биохимических исследований (под ред. М. И. Прохоровой) Л., ЛГУ, 1982.
7. Владимиров Н. А., Арчаков А. И. — В кн.: Перекисное окисление липидов в биологических мембранах (под ред. Г. М. Франка), с. 241—243, М., Наука, 1972.
8. Lowry O. H., Rosebrough N. I., Farr A. L., Randall R. I. J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
9. Карагезян К. Г., Квитницкий-Рыжов Ю. Н., Овсепян Л. М., Погосян А. Ю., Степанова Л. В. Вopr. мед. химия, т. 36, № 1, с. 50—51, 1990.
10. Lands W. E. M., Merkl J. J. Biol. Chem., v. 238, p. 838—904, 1963.
11. Sun A. Y., Sun G. V. — In: Function and metabolism of phospholipids in the central and peripheral nervous system, p. 189—197, (eds. G. Porcellati, L. Amaducci, C. Galli) N. J.—L., Plenum. Press., 1976.
12. Pederson T. C., Aust S. D. Biochim. and Biophys. Res. Commun., v. 52, p. 1071—1078, 1973.
13. Chan P. H., Fishman R. A. Federal. Proc., v. 43, № 2, 1984.
14. Квитницкий-Рыжов Ю. Н. — В кн.: Современное учение об отеке и набухании головного мозга, Киев, Здоровье, 1988.
15. Spagnuolo G., Sautebin L., Galli G., Racagni G., Galli C., Mazzari S. Prostaglandins, v. 18, № 1, p. 51—61, 1979.
16. Spektor R., Goetzl E. L. Biochem. Pharmacol., v. 35, № 17, p. 2849—2853, 1986.

Поступила 16.11.1990



Ca^{2+} -КАЛЬМОДУЛИН И СОПРЯЖЕННЫЕ СИСТЕМЫ РЕГУЛЯЦИИ

ГАЛОЯН А. А.

Институт биохимии им. Г. Х. Бунятыан АН Армении, Ереван

В обзоре схематично обобщены основные и, главным образом, новейшие литературные данные о роли Ca^{2+} -кальмодулиновой системы в регуляции активности ряда ферментов, различных физиологических процессов, а также описаны генетически детерминированные участки (E_1 -участки) связывания ионов кальция с различными белками, функциональная роль некоторых из них не совсем ясна. Полученные в нашей лаборатории данные о существовании в мозгу пептидной системы регуляции активности некоторых Ca^{2+} -кальмодулинзависимых ферментов (С-модулины), без участия ионов кальция и кальмодулина в концентрации 10^{-8} – 10^{12} М, а также пептидов мозга с величиной M_r 3,5–7 кД, которые активируют как ФДЭ, так и киназу легкой цепи миозина без участия ионов кальция, свидетельствуют о наличии дополнительных систем регуляции активности этих ферментов. Последние пептиды связываются с кальмодулином подобно ионам кальция и затем активируют указанные ферменты. Допускается, что эти нейропептиды гипоталамуса, вероятно, аналогичны подобным во многих других тканях, являющимся перинервными регуляторами активности ферментов, когда концентрация ионов кальция составляет в клетке 10^{-8} – 10^{-10} М. Другим важным фактором регуляции активности Ca^{2+} -кальмодулинзависимых ферментов являются нейрогормон «С» и подобные соединения, которые, будучи конкурентными ингибиторами ФДЭ cAMP и cGMP, вместе с тем являются транслокаторами ионов кальция. Они из саркоплазматического ретикулула и митохондрий транспортируют ионы кальция во внеклеточное пространство, благодаря чему уровень Ca^{2+} в клетке заметно снижается, что приводит к релаксации клетки. Представленный механизм расширяет наши представления о новых системах регуляции Ca^{2+} -кальмодулинзависимых ферментов и физиологических процессов.

Ионы кальция являются фундаментальным регуляторным фактором различных внутриклеточных процессов и активатором всех актомиозинзависимых сократительных систем, хотя их молекулярные механизмы могут быть разные в зависимости от различных типов мышц. В мышечных клетках при покое содержание свободного Ca^{2+} составляет около 10^{-8} М. Повышение концентрации Ca^{2+} до 10^{-5} М приводит к сокращению мышц. Во всех типах мышечных клеток Ca^{2+} соединяется со специфическими (sensor) участками соответствующего белка, что вызывает сокращение мышц.

Имеется три типа регуляции сокращения, которые включают различные чувствительные молекулы, связывающие ионы кальция:

1) тропонин С— Ca^{2+} -связывающий компонент тропонина, участвующий в регуляции сокращения поперечнополосатых мышц позвоночных;

2) регуляторная легкая цепь миозина, играющая роль в регуляции сокращения мышц моллюсков [1]; следует, однако, заметить, что у моллюсков в отсутствие миозина регуляторная легкая цепь полностью активизируется актином даже в бескальциевой среде, но может быть ингибирована при добавлении легких цепей гладких мышц позвоночных [2];

3) кальмодулин (КМ), который, связываясь с ионами кальция, активирует киназу легкой цепи миозина, что приводит к сокращению гладкой мускулатуры позвоночных [3], то есть сокращение гладких мышц происходит только при наличии Ca^{2+} -кальмодулинового комплекса через фосфорилирование. Ионы кальция имеют многогранную функцию в нервной системе. На поверхности клетки они изменяют мембранную стабильность и проницаемость в отношении различных ионов и включаются в процесс реализации нервного импульса.

При стимуляции увеличивается входение Ca^{2+} в нервную клетку, что способствует выделению нейротрансмиттера в синаптическую щель. Огромную роль ионы кальция и КМ играют в активировании ряда ферментов метаболизма как в нервной, так и в других тканях.

В табл. 1 приведены Ca^{2+} -КМ-регулируемые ферменты. Описано более 30 Ca^{2+} -КМ-активируемых ферментов в различных тканях и количество таких ферментов непрерывно растет. Недавно этот список пополнился еще одним ферментом—5'-нуклеотидазой мозга [4]. Можно заключить, что как фосфорилирование, так и дефосфорилирование белков и ферментов, образование биологически активных пептидов, циклических нуклеотидов, нейротрансмиттеров, в частности катехоламинов, сокращение гладких мышц, генерация кальциймобилизирующих фосфолипидов, процессы мембранного транспорта и др., находятся в зависимости от Ca^{2+} -кальмодулинового комплекса. КМ является ключевым элементом в передаче (количественной) сигналов кальция внутрь клетки [5]. Количественная передача сигнала Ca^{2+} внутрь клетки посредством КМ состоит, по крайней мере, из четырех компонентов [5]:

а) молекулярные механизмы, которые определяют Ca^{2+} -зависимое взаимоотношение КМ с белками-мишенями (кинетическая регуляция);

б) локализация КМ и белков-мишеней в клетке (топологическая регуляция);

в) соотношение между концентрацией КМ и различными белков-мишеней (генная регуляция);

г) посттрансляционная модификация белков-мишеней и КМ.

Имеется ряд кальцийсвязывающих белков, функциональная роль которых еще недостаточно изучена. Кальцийсвязывающими белками являются тропонин С [6], парвальбумин [7, 8], кальсеквестрин [9], белок CBP-1 (Calcium Binding Protein) [10], В-субъединица кальцийнейрина [11], регуляторная цепь миозина [1, 12], кальбиндин D (витамин-Д-зависимое связывание ионов кальция), белок S-100 [13], аккомодулин [14]. Ca^{2+} -кальмодулиновая система играет важную роль не только в активировании различных ферментов (в метаболических процессах), но и в осуществлении самых разных биологических процессов (табл. 2). Установлено, что все Ca^{2+} -связывающие

Таблица 1

Ca²⁺-кальмодулин регулируемые ферменты

Ферменты	Литература		Ферменты	Литература	
ФДЭ сАМР, сGMP	Cheung W. Y. Kakiuchi S. Yamazaki R.	1970 [48] 1970 [49]	5'-нуклеотидаза мозга	Galoyan A. A. Sharova N. P. Gurvitz B. Ja.	1989 [56]
Аденилатциклаза	Cheung W. Y. Klee C. B. Means A. R. Dedman J. R. Walsman D. M. и соавт.	1980 [50] 1980 [51] 1980 [52] 1978 [53]	Киназа тяжелой цепи миозина I. 4, 5-инозитол-фосфат-3-киназа сАМР-зависимая протеникиназа (кальмодулин ингибирует) Ca ²⁺ , Mg ²⁺ -АТРаза (микросомная) Ca ²⁺ , Mg ²⁺ -АТРаза (в эритроцитах)	Rieker J. P. и соавт. Kimura Y. и соавт. Cox D. M. Edstrom R. D. Hageboon G. K. Feden J. Jarrett H. W. Panniston J. Cox D. M.	1987 [57] 1987 [58] 1982 [59] 1981 [60] 1977 [61]
Киназа легкой цепи миозина	Walsman D. M. и соавт. Adelstein R. Klee C. B.	1978 [53] 1981 [24]	Ca ²⁺ , Mg ²⁺ -АТРаза	Vincenzi F. F. и соавт. Coroni P. Carafoli E.	1980 [62] 1981 [63]
Фосфорилза киназа (кальмодулин является субъединицей фермента)	Cohen P. и соавт. Burger E. и соавт.	1978 [54] 1983 [55]	Протенинфосфатаза (кальцийнейрин) Полиаминзависимая протенин-киназа Ангитотсинпревращающий фермент Тубулинкиназа	Klee C. B. и соавт. Steward A. и соавт. Sharma R. K. Wang J. H. Atmaz V. J. Kuehn C. D. Dasarathy Y. Fanburg B. L. Burke B. E.	1979 [73] 1982 [74] 1985 [75] 1983 [76] 1988 [77]
NAD-киназа	Anderson J. Cornier M. J.	1978 [64]	Фосфолипаза тромбоцитов человека	DeLorenzo R. J. Weng P. Y. K. Cheung W. Y. Kennedy M. B.	1981 [78] 1979 [79]
Гликогенсинтетаза киназа	Payne M. E. Soderling T.	1980 [65]	Множественные формы Ca ²⁺ -кальмодулинзависимой протенин-киназы мозга	Pife C. и соавт.	1985 [69] 1984 [80]
Фосфолипаза A ₂	Wang J. H. Walsman D. M.	1979 [66]			
Трипс-факт-5-монооксигеназа	Yamauchi T. Fujisawa H.	1979 [67]			
Тирозин-гидроксилаза	Elmestikawa и соавт.	1983 [68]			
Нейрональная протенинкиназа	Kennedy M. B.	1985 [69]			
Фосфофруктокиназа	Mayer G.	1984 [70]			
Алдолаза	Orosz F. Chistova T. Y. Ovadi J.	1988 [71]			
Аденилатциклаза мозжечка	Malnoe A. и соавт.	1982 [72]			

белки имеют генетически детерминированный участок «EF-Hand» [13] (табл. 3). Наиболее древней (ancestral) молекулой является КМ, основной рецепторный белок ионов кальция, биологическое значение которого хорошо установлено. Исследование первичной структуры КМ [15] показало, что КМ содержит 4 Ca^{2+} -связывающих домена: домен I (9—42), домен II (45—78), домен III (82—105) и домен IV (118—149). Для активирования фермента-мишени необходимо, чтобы связалось с КМ 3—4 атома кальция [16]. КМ—кислый

Таблица 2

Роль Ca^{2+} -кальмодулиновой системы в различных процессах

Процессы	Литература		
Деполаризация микротубул	Marcum J. M. и соавт. Sobue K. и соавт.	1978 1981	[81] [82]
Взаимодействие со спектрином и белком	Glennev J. Weber K.	1980	[83]
Транслкация внутриклеточных оргanelл	Means A. R. и соавт.	1982	[84]
Механизм действия антидиуретического гормона на почечный транспорт	Beauwens R. Rentmeesters M.	1981	[85]
Поглощение кислорода печенью	Kimura V. и соавт.	1987	[86]
1, 3, 5 P_2 -стимулируемая мобилизация Ca^{2+} ингибируется антагонистами кальмодулина	Hill T. D. и соавт.	1988	[87]
Стимуляция АТФ-зависимого транспорта эритроцитов человека	Larsen F. L. Vincenzi F. F.	1979	[87]
Синтез и секреция нейротрансмиттера	DeLorenzo R. J. и соавт. Fujisawa H.	1979 1984	[88] [89]
Фосфорилирование белков мембран	Schulman H. Greenward P.	1979	[90]
Стимуляция АТФ-зависимого транспорта в саркоплазматическом ретикулуме	Katz S. Remtulla M. A.	1978	[91]
Транспорт кальция Ca^{2+} -КМ-зависимое действие кальцитонина на метаболизм липидов у крыс	O'Leary B. B. Nishizawa Y. и соавт.	1985 1988	[92] [93]

Таблица 3

EF-участки кальцийсвязывающих белков
(Gerday, 1988, [13])

Белок	Mr	EF-домены	Связывание Ca^{2+}	Основной источник
Паркальбумин	12.000	3	2	мышца
Тропонин С	18.000	4	4	мышца
Кальмодулин	17.000	4	4	везде (ubiquitous)
Р-легкие цепи (миозин)	10.000	4	1	мышца
Щелочные легкие цепи (миозин)	20.000	4	0	мышца
Калбиндин (Витамин Д)	10.000	3	2	кишечник
Калбиндин (Вит.Д)	28.000	4—6	2	мышечный
S-100	2×10.500	2	2	молг
Онкомодулин	12.000	2	2	опухоль
В-субъединица кальцинефина	19.000	4	4	молг
СВР-18	18.000		1	молг
СВР	20.000	4	1—3	беспоозвоночные

Примечание. СВР-18—кальцийсвязывающий белок-18, СВР—растворимый кальцийсвязывающий белок. Обнаружен ряд новых кальцийсвязывающих белков (Cal retinin, CFag, Calyculin 12 AgIPRA), pE98-белок, MRP-8 и MRP-14, p11, 42С и 42 А белки, белок p9Ka, белок 18A2, Acquorin, белки, связывающие галактозу и восточный II, немиешиный а-актинин [94].

белок с величиной M 16,7 кД, принадлежащий к группе гомологичных белков, связывающих кальций через аналогичные структурные домены. КМ является уникальным членом этого класса белков, так как присутствует во всех эукариотических клетках, осуществляя различные физиологические процессы Ca^{2+} -зависимым способом; КМ содержит одну полипептидную цепь со 148 аминокислотными остатками, включая необычную аминокислоту—триметиллизин [17]. КМ в течение эволюции не подвергался изменению в аминокислотном составе. Связывание Ca^{2+} вызывает заметные конформационные изменения в КМ, которые делают возможным его участие во взаимодействии с ферментами и регуляции их активности. Точная природа фермент-кальмодулинового взаимоотношения не совсем ясна, но выдвинута гипотеза о том, что связывание Ca^{2+} с КМ открывает гидрофобные щели, что может быть важным как для связывания с антагонистами КМ, так и ферментами-мишенями. На каждой молекуле КМ имеется большая гидрофобная щель в каждой половине молекулы. Каждая щель величиной в 10 Å имеет глубину около 9—5 Å. В каждой половине молекулы имеется 5 ароматических остатков: четыре из них находятся на N-концевой половине (Phe 16, Phe 19, Phe 65, Phe 68). Среди 8 лизиновых остатков в КМ млекопитающих наиболее важным для связывания Ca^{2+} является Lis 115, который триметилирован в позиции ϵ -амино группы. Триметилирование лизина в положении 115 обнаружено в КМ из различных источников, функциональное значение этой посттрансляционной модификации неизвестно.

Антагонисты кальмодулина

Ряд фармакологических агентов ингибирует Ca^{2+} -зависимое активирование ферментов КМ. К первому классу веществ, обладающих этими свойствами, относятся фенотиазины [18]. Эти антагонисты, связываясь с КМ, предотвращают его взаимодействие с белками. Имеется и ряд других фармакологических соединений, которые взаимодействуют с кальмодулином в присутствии Ca^{2+} и предотвращают его стимуляторные эффекты.

Исследования показывают, что эти различные соединения имеют структурное сходство. Традиционными системами для измерения антикальмодулиновых свойств фармакологических агентов являются системы КМ—киназа легкой цепи миозина (КЛЦМ) и КМ—ФДЭ.

В гладкой мышце КМ является ответственным для активации КЛЦМ [21]. Антагонист КМ—трифторноразин связывается с КМ и разрушает комплекс КМ—КЛЦМ [22].

Кальмодулинсвязывающие белки

К таким белкам относятся калдесмон [23], КЛЦМ [24], белок с M_r 110 кД [24], спектрин и фодрин [25], кальцийсейрин [26] и др. Калдесмон—щелочной белок с M_r 120 кД [27] связывается с тропомином, тропомином и с филаментами актина в гладкой мышце, а также со многими немембранными клетками (тромбоциты). При связывании с актином калдесмон ингибирует вызванное последним активирование АТФазы. КЛЦМ активируется Ca^{2+} -кальмодулиновым комплексом. Цикл сокращения-релаксации гладкой мышцы зависит

от образования и распада Ca^{2+} -КМ-ферментного комплекса. Этот процесс контролируется ионами кальция. Стимулирование (нервное и гормональное) клеток гладких мышц приводит к повышению концентрации Ca^{2+} в цитозоле, где он связывается с КМ, образуя Ca_i^{2+} -кальмодулиновый комплекс. Это связывание Ca^{2+} с КМ вызывает конформационные изменения в его молекуле [28], после которых КМ может связываться с ферментом.

Блокаторы вхождения кальция в клетки

Концепция об антагонистах кальция развивалась одновременно и независимо при изучении сердечной ткани [29] и гладкой мышцы [30]. Концепция о блокаторах вхождения кальция внутрь клетки открыла новую область в терапии сердечно-сосудистых заболеваний, и блокаторы вхождения кальция находят все большее применение для лечения грудной жабы, гипертонии и т. д. Имеются два пути активирования кальциевых каналов в тканях гладких мышц [31], которые позволяют разделить их на потенциалуправляемые и рецепторуправляемые каналы.

Потенциалуправляемые каналы открываются в ответ на изменение потенциала действия или деполяризацию. Учитывая то, что некоторые агонисты могут способствовать вхождению кальция без деполяризации, можно было полагать, что они могут действовать через соответствующие рецепторы, открывая кальциевые каналы (рецепторуправляемые каналы).

Блокаторы вхождения кальция могут быть классифицированы как вещества, ингибирующие вхождение кальция через кальциевые каналы плазмалеммы [32]. Все они могут быть разделены на две группы: избирательные и неизбирательные блокаторы вхождения кальция. Избирательные блокаторы вхождения кальция первично действуют на кальциевые каналы, открытые деполяризацией или под влиянием стимулов, в то время как неизбирательные блокаторы одинаково эффективны в отношении Ca^{2+} и Na^{+} -каналов.

Среди избирательных блокаторов кальциевых каналов можно выделить две подгруппы. Подгруппа IA включает три химических класса—верапамил, нифедипин и дилтиазем. Эти вещества блокируют медленные кальциевые токи в миокардиальных препаратах без оказания влияния на быстрые натриевые каналы [33]. Подгруппа IB включает в основном циннаризин и флукаризин как избирательные блокаторы вхождения кальция в препаратах артерии [34]. Описаны также некоторые подтипы потенциалуправляемых каналов в различных клеточных типах [35, 36].

Таким образом, приведенные литературные данные свидетельствуют об огромном общебиологическом значении Ca^{2+} , его основного рецепторного блока—КМ, других Ca^{2+} -связывающих белков. Антагонисты КМ, а также блокаторы вхождения ионов кальция внутрь клетки находят широкое применение в медицинской практике. Необходимо, однако, напомнить, что система Ca^{2+} -КМ функционирует тогда, когда концентрация ионов кальция в цитоплазме повышается до 10^{-5} М. К тому же содержание КМ в цитоплазме в 100 раз превышает концентрацию кальция. Почему же в мозгу и сердце в нормальных условиях проявляется высокая активность как ФДЭ циклических нуклеотидов, так и КМЦМ? По-видимому, в мозгу (вероят-

но, и в других органах) существуют вещества (возможно, пептиды), оказывающие регулирующее влияние на активность Ca^{2+} -КМ-активируемых ферментов, когда эта система не в состоянии функционировать [37]. Имется реципрокное взаимоотношение между Ca^{2+} -КМ-зависимыми и независимыми регуляторами активности ферментов. Это взаимоотношение регулируется концентрацией ионов кальция.

Открытие новых полипептидов гипоталамуса—КМ-связывающих, Ca^{2+} -независимых регуляторов ферментативной активности

Из гипоталамуса крупного рогатого скота нам удалось с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-75, ИОХ на Dawex 50×8, а также ВЭЖХ выделить 5 коронаросуживающих полипептидов (ПФ₁—ПФ₅) с величиной M 3, 3,5, 3,5 и 7 кД [38]. Они содержат в большом количестве Ser, Gly, Glu. N-концевыми аминокислотами являются Val, Val, Val, Ala, Pro. После кислотного и ферментативного (трипсин, химотрипсин) гидролиза указанные пептиды полностью теряют биологическую активность. Они вызывают только активирование ФДЭ циклических нуклеотидов и 5'-нуклеотидазы мозга, а также КЛЦМ без участия ионов кальция. Нам ранее было показано наличие нейрорепептидов, активирующих эти ферменты без Ca^{2+} -КМ [39]. Каков механизм действия этих пептидов на активность ферментов и на коронарные сосуды? Исследования, проведенные нами (Бархударян Н. А., Галоян А. А.) совместно с д-ром Ю. Овади (Институт биохимии АН ВНР, Будапешт), были посвящены действию 5-и гипоталамических пептидов на КМ-белок взаимоотношение путем фермент-связанного иммуносорбентного анализа (Enzyme-Zinked Immunosorbent Assay, ELISA) с целью выяснения возможности связывания пептидных фракций с КМ. Этот метод позволяет использовать очень незначительные количества пептидов. Обнаружено, что все 5 полипептидов гипоталамуса (ПФ₁—ПФ₅) ингибируют образование иммунокомплекса КМ-антитело на 90% и более, причем эффект ПФ₁ и ПФ₂ был значительно выше ингибирующего воздействия ПФ₃, ПФ₄ и ПФ₅, а ингибирующая концентрация ПФ₁—ПФ₅ в 600 раз меньше по сравнению с известными антагонистами КМ (трифторпиразин, винбластин и др.). Следует заметить, что трифторпиразин (ТФП) в концентрации 3,9 мМ активирует образование иммунокомплекса более чем на 100% (данные Ю. Овади). По-видимому, на КМ имеются участки низкого и высокого сродства ТФП. Участок с высоким сродством связывания с ТФП локализуется на С-конце домена КМ, расположенного поблизости от антигенного участка. Вероятно, связывание ПФ₁—ПФ₅ с КМ происходит таким же образом (необходимы дополнительные сведения).

С целью исключения связывания ПФ₁—ПФ₅ с антителами КМ вместо КМ на специальных пластинках фиксировали антитела. Обнаружено, что пептиды не связываются с антителами. Таким образом, пептиды связываются именно с КМ ближе к его антигенному участку (вероятно, с аминокислотными остатками—137—143).

Установлено, что ионы кальция не имеют существенного значения в снижении образования иммунокомплекса КМ-антитело при наличии пептидов (ПФ₁—ПФ₅). Таким образом, действие ПФ₁—ПФ₅ на образование иммунокомплекса является Ca^{2+} -независимым процессом [40]. Наши эксперименты показали, что ПФ₁—ПФ₆ активи-

руют КЛЦМ, когда в среде имеется КМ. Сам КМ не оказывает никакого действия на активность фермента. В комбинации с Ca^{2+} КМ активирует фермент на 50%. При сочетании КМ+ЭДТА+пептид (ПФ_1 — ПФ_5) + КЛЦМ пептиды активируют фермент на 80—100%.

Таким образом, обнаружен новый тип активаторов КЛЦМ (вероятно, и других Ca^{2+} -КМ-зависимых ферментов), связывающихся с КМ без участия Ca^{2+} . Комплексы КМ—нейропептиды (ПФ_1 — ПФ_5) являются мощными активаторами КЛЦМ.

Ca^{2+} -КМ-независимые активаторы ФДЭ циклических нуклеотидов

Три термостабильных активатора, стимулирующие высокочищенную Ca^{2+} -КМ-зависимую ФДЭ мозга были обнаружены в препаратах частично очищенного нейрогормона «С» (нС). Эти активаторы увеличивают активность ФДЭ в 6—10 раз в отсутствие ионов кальция [4]. Активаторы были очищены до гомогенного состояния с помощью ВЭЖХ и гель-фильтрации. Молекулярная масса этих соединений составляла 5—14 кД. Обработка очищенных активаторов с трипсином (1 мг/мл, 10 мин при 30°) снимала их активирующее влияние на ФДЭ циклических нуклеотидов. Эти данные свидетельствуют о полипептидной природе активаторов. N-концы С-модулинов ацетилированы.

Активаторы были названы нами С-модулинами, так как они сопровождают нС на многих стадиях очистки и, вероятно, играют роль модулятора нС. Они повышают активность Ca^{2+} -КМ-зависимой ФДЭ в присутствии 0,5 мМ ЭДТА и не оказывают модулирующего действия в присутствии 0,5 мМ CaCl_2 .

Таким образом, обнаружена новая группа нейропептидов-активаторов Ca^{2+} -КМ-зависимых ферментов, действующих без участия Ca^{2+} и КМ. Как Ca^{2+} -независимые, так и Ca^{2+} -КМ-независимые активаторы, на наш взгляд, являются первичными активаторами Ca^{2+} -КМ-активируемых ферментов, так как они активируют эти ферменты в концентрациях ниже 10^{-6} М, в то время как Ca^{2+} -кальмодулиновая система действует, когда в цитоплазме концентрация Ca^{2+} достигает концентрации 10^{-5} М. Установлено идентичность одного из С-модулинов и T_3 [9].

Новый тип регуляции транслокации Ca^{2+} в гладкой мышце в норме и при патологии

Ранее нами была описана новая «семья» коронарорасширяющих нейрогормонов гипоталамуса. Эти гликопептиды были названы веществами «К», «С» и «Г». За последние годы были получены множественные формы этих соединений гипоталамуса [41]; нС и его структурные аналоги являются уникальными регуляторами уровня вторичных посредников клетки—циклических нуклеотидов и ионов кальция. После открытия этой группы регуляторов сердечной активности (коронарорасширяющие и коронаросуживающие соединения гипоталамуса) было установлено, что нС является сложным соединением, не теряющим свою биологическую активность после щелочного, кислотного и щелочного гидролиза [42]. Это вещество не имеет характерного спектра в УФ-области.

Это значит, что в составе иС и его структурных аналогов существует жесткая структура, комплекс циклических соединений неизвестной природы.

Нами проведены масс-спектральные и ЯМР-спектральные анализы для определения структурных особенностей этого нейрого르몬. Механизм действия иС на транслокацию ионов кальция отличается от известных синантических и эндогенных кальциймобилизующих соединений. Важно отметить, что иС и его структурные аналоги выявляют Ca^{2+} -мобилизующие свойства на уровне саркоплазматического ретикулула гладкой мышцы. Эти вещества входят в цитоплазму через липидный бислой сарколеммы, подобно стероидным гормонам. Об этом свидетельствует тот факт, что иС не оказывает влияния на активность аденилат- и гуанилатциклазы сердца и мозга в опытах *in vitro*. Однако в этих условиях классический активатор аденилат- и гуанилатциклаз полностью сохраняя свое активирующее влияние на эти ферменты. Нами было установлено, что иС является мощным ингибитором ФДЭ сАМР и сGMP [43], а также эффективным внутриклеточным Ca^{2+} -модулирующим транслокатором в норме и особенно при некрозе миокарда, когда содержание Ca^{2+} в саркоплазме значительно увеличено. Мы изучали распределение [^{45}Ca] в субклеточных частицах и изменение сродства Ca^{2+} к различным белкам саркоплазматического ретикулула митохондрий сердца и мозга под влиянием иС в норме и при изопроterenоловом некрозе миокарда [44]. Предполагалось, что изменение сродства специфических белков к ионам кальция может быть объяснено фосфорилированием и дефосфорилированием ряда белков под влиянием соответствующих сАМР-зависимых протеникиназ и фосфопротеникиназ. Результаты экспериментов показали, что через 50 мин после введения иС, когда проявляется максимальное коронарорасширяющее влияние иС на кошках в опытах *in situ*, содержание Ca^{2+} в крови увеличивается от 10 до 42,5% по сравнению с контролем. Ясно, что иС регулирует концентрацию Ca^{2+} в клетках гладких мышц. Об этом свидетельствуют результаты исследования влияния иС на КЛЦМ, выделенную из гладких мышц (неопубликованные данные). Ca^{2+} -мобилизующие свойства иС проявляются как в первых клетках [45], так и на поперечнополосатой мускулатуре [46].

Таким образом, Ca^{2+} -мобилизующие и рилизинг-свойства иС не отличаются от других систем транслокации Ca^{2+} . Более того, иС и его структурные аналоги оказывают прямое ингибирующее действие на активность сАМР и сGMP ФДЭ также, как на сАМР-зависимую протеникиназу мозга и сердца [47]. Конкурируя с сАМР и сGMP за регуляторную субъединицу ферментов, иС ингибирует базальную активность этих ферментов и непосредственно (без участия Ca^{2+} и КМ) ингибирует КЛЦМ гладкой мышцы. Он является уникальным регулятором концентрации Ca^{2+} в клетках, изменяя сродства Ca^{2+} -связывающих белков к ионам кальция в саркоплазматическом ретикулуле, митохондриях и удаляя Ca^{2+} из цитоплазмы во внутриклеточное пространство через сарколемму путем активирования Na^+ , Ca^{2+} обмена и Ca^{2+} -насоса посредством Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы.

Механизм действия нС изображен на схеме. Недавно получены результаты (данные не опубликованы) о влиянии нС на активность фосфолипазы «С».

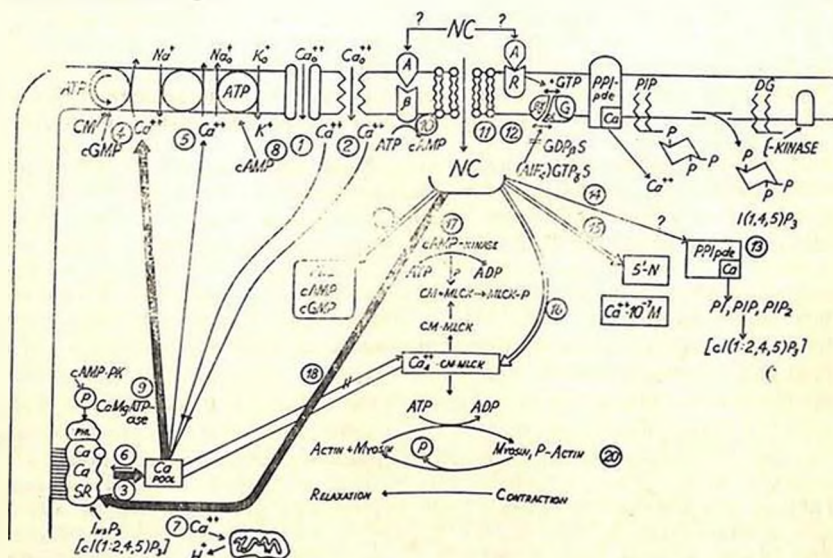


Схема. Молекулярные механизмы транслокации ионов кальция и релаксации гладкой мышцы под влиянием нейрогормона «С».

1, 2—вольтаж и рецепторуправляемые мембранные каналы, 3—выделение Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума (СР). 4—удаление Ca^{2+} из сарколеммы, 5—удаление Ca^{2+} путем Na , Ca —обмена, 6—удаление ионов кальция из миолизмы реализуется кальциевым насосом саркоплазматического ретикулума (через Ca , Mg -АТФазу), 7—выделение Ca^{2+} с митохондриями (не существует при физиологических условиях), 8—сАМР-стимулирование Na , K -АТФазы облегчает обмен внеклеточного натрия на кальций, 9—фосфорилирование фосфоламбана сАМР-зависимой протеинкиназой увеличивает АТФазную активность саркоплазматического ретикулума, 10—аденилатциклазная система, 11—липидный бислой сарколеммы, 12—кальциемобилизующие рецепторы и модель активации клеток по Сосколов (1988), 13—цитозольная полифосфоинозитид фосфодиэстераза (Ca -активируемая фосфолипаза С) (PI , PIP , PIP_2 -субстраты), 14—влияние нейрогормона «С» на цитозольную фосфолипазу «С», 15—ингибирование активности 5'-нуклеотидазы нейрогормоном «С», 16—ингибирование активности киназы легкой цепи миозина (КЛЦМ) нейрогормоном «С», 17—ингибирование КЛЦМ фосфорилированием КЛЦМ-сАМР-зависимой протеинкиназой, 18—влияние нейрогормона «С» на выделение Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума, 19—ингибирование активности сАМР и сГМР фосфодиэстеразы под влиянием нейрогормона «С», 20—цикл сокращения и расслабления гладкой мышцы. Фосфорилирование миозина зависит от активности КЛЦМ и фосфатазы. При активации фосфатазы комплекс кальмодулин—КЛЦМ разрушается. Схема гомеостаза Ca^{2+} и механизмы сокращения—релаксации гладкой мышцы даны по Rieff (1988)

Таким образом, нС и его аналоги являются новым типом регуляторов ферментативной активности, действующих путем удаления ионов из саркоплазматического ретикулума, митохондрий и саркоплазматического ретикулума.

Ca²⁺-CALMODULIN AND COUPLED SYSTEMS OF THE REGULATION

GALOYAN A. A.

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the
Armenia, Yerevan,

This review summarizes data on the role of Ca²⁺-calmodulin system in the control of activity of several enzymes and various physiological processes. We also describe genetically determined regions responsible for the binding of calcium ions with various proteins, whose functional role is not yet completely clear. Data of our laboratory demonstrate presence in the brain of a peptide system responsible for the control of activity of certain Ca²⁺-calmodulin-dependent enzymes (C-modulins) in the absence of calcium ions and calmodulin. These peptides are present in concentrations of 10⁻⁹—10⁻¹²M and probably represent an additional control system for the control of calmodulin-dependent enzymes. The another peptides bind to calmodulin like calcium ions and activate such enzymes as PDE of cAMP, 5'-nucleotidase and myosin L-chain kinase. These hypothalamic neuropeptides probably are similar to those present in various other tissues and serve as primary regulators of the enzyme activity, when calcium concentration in the cell is 10⁻⁸—10⁻⁷ M. Another important factor involved in the activity control of Ca²⁺-calmodulin-dependent enzymes is neurohormone C and other similar compounds which competitively inhibit PDE of cAMP and cGMP and are involved in Ca²⁺ translocation. The mechanism presented in the review extends our views about new systems for the control of Ca²⁺-calmodulin-dependent enzymes in physiological processes.

ЛИТЕРАТУРА

1. Szent-Györgyi A. G., Szentkiralyi E. M. *J. Mol. Biol.*, v. 74, p. 179—203, 1973.
2. Kendrick-Jones J., Scholey J. W., *J. Muscle Res. Cell. Mot.*, v. 2, p. 347—372, 1981.
3. Dabrowska R., Aromatorio D., Sherry J. M. F., Hartshorne D. J. *BBRC*, v. 78, p. 1263—1272, 1977.
4. Galoyan A. A., Sharova N. P., Gurvitz B. J. *Neurochem. Res.*, v. 14, № 12, 1213—1221, 1989.
5. Haich J., Watterson D. M. —In: *Calcium and Calcium Binding Proteins* (eds. Ch. Gerday, L. Bolis, R. Gilles), p. 191—200, Springer Verlag, Berlin, New York, 1988.
6. Herzberg O., James M. N. C. *Nature* (London), v. 313, p. 653—659, 1985.
7. Hamoir G. *Acta Zool. Patrol.* (Antwerpen), v. 46, p. 284—301, 1968.
8. Helzman C. W. *Experientia*, v. 40, p. 910—931, 1984.
9. McLennan D. H., Wang P. T. S. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, v. 68, p. 1231—1235, 1971.
10. Manalan A. S., Klee C. B. *J. Biol. Chem.*, v. 259, p. 2047—2050, 1984.
11. Aitken A., Kee C. B., Cohen P. *Eur. J. Biochem.*, v. 139, p. 663—671, 1984.
12. Lehman W., Szent-Györgyi A. G. *J. Gen. Physiol.*, v. 66, p. 1—30, 1975.
13. Gerday Ch. —In: *Calcium and Calcium Binding Proteins* (eds. Ch. Gerday, L. Bolis, R. Gilles), Springer Verlag, Berlin, p. 23—37, 1989.
14. McManus J. P., Brower L. M. *Methods Enzymol.*, v. 139, p. 156—168, 1987.
15. Watterson D. M., Sharief F., Vanaman T. C. *J. Bio. Chem.*, v. 255, 962—975, 1980.

16. Babu Y. S., Sick J. S., Greenhough T. J., Bugg C. E., Means A. R., Cook W. J. *Nature* (London), v. 315, 37—40, 1985.
17. Babu Y. Y., Sack J. S., Greenhough T. J., Bugg C. E., Means A. R., Cook W. J. *Nature* (London), v. 316, p. 37—40, 1985.
18. Levin A. M., Weiss B. *Mol. Pharmacol.*, v. 12, p. 581—587, 1976.
19. Reufogalis M. D., Minocherhomjal A. M., Al-Jobore A. *Can. J. Biochem. Cell. Biol.*, v. 61, p. 927—933, 1983.
20. Van Belle H. —In: *Advances in Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Research* (eds. P. Greengard, G. Robison, R. Paoletti, S. Nicolsa), v. 17, p. 557—567, 1984.
21. Hartshorne D. J., Slomkowski R. *Ann. Rev. Physiol.*, v. 43, p. 519—530, 1981.
22. Hidaka H., Yamak I., Totsuka T., Asano M. *Mol. Pharmacol.*, v. 15, p. 49—59, 1979.
23. Mosser M. S. *Ann. Rev. Cell Biol.*, v. 1, p. 209—241, 1985.
24. Adelstein R. S., Klee C. B. *J. Biol. Chem.*, v. 256, p. 7501—7509, 1981.
25. Glenney J. R., Glenney P. *Cell Motil.*, v. 3, p. 671—682, 1983.
26. Sharma R. K., Desai R., Waisman D. M., Wang J. H. *J. Biol. Chem.*, v. 254, 4276—4282, 1979.
27. Marston S. B., Lehman M. *Biochem. J.*, v. 231, p. 517—522, 1985.
28. Kuo W. N., Kuo J. F. *J. Biol. Chem.*, v. 251, p. 4283—4286, 1976.
29. Fleckenstein A., Kummermeier H., Döring H. J., Freund H. J. *Z. Kreislaufforsch.*, v. 56, p. 839—853, 1967.
30. Godfraind T., Polster P. *Circ. Res.*, suppl. 1, p. 81—91, 1968.
31. Bolton T. B. *Physiol. Rev.*, v. 59, p. 606—713, 1979.
32. Godfraind T. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, suppl. 11, p. 5—30, 1986.
33. Fleckenstein A. *Calcium Antagonism in Heart and Smooth Muscle*. Wiley, N. Y., 1983.
34. Godfraind T., Dien D. J. *Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 217, p. 510—515, 1981.
35. Nittus B., Hess P., Zansman J. B., Tsien R. W. *Nature* (London), v. 316, p. 443—446, 1985.
36. Нозуку М. С., Фок А. Р., Тсиен Р. В. *Nature* (London), v. 316, p. 440—448, 1985.
37. Галоян А. А., Гуриц Б. Я. *Нейрохимия*, т. 5, № 4, с. 420—422, 1986.
38. Галоян А. А., Бархударян Н. А., Валко К., Закарян Т. *Нейрохимия*, т. 7, № 4, с. 519—524, 1988.
39. Галоян А. А., Бобрускин И. Д., Гуриц Б. Я., Абрамян Г. Э. *Нейрохимия*, т. 8, № 1, с. 78—86, 1989.
40. Галоян А. А. Тезисы докладов III Республиканской конф. «Достижения физико-химической биологии и биотехнологии и пути их внедрения», с. 1, Ереван, 1989.
41. Галоян А. А., Срапионян Р. М., Карапетян Р. О., Абелян Ж. Г., Саакян Ф. М., Саакян С. А., Абрамян С. С., Григорян Л. А., Одабабян А. Б., Бочко И. Ф. *Нейрохимия*, т. 5, № 4, с. 354—364, 1986.
42. Галоян А. А. Некоторые проблемы биохимии гипоталамической регуляции, Ереван, Айастан, 1965.
43. Галоян А. А., Гуриц Б. Я., Погосян М. А. *Вопросы биохимии мозга*, т. 11, с. 89—96, 1976.
44. Galoyan A. A., Kevorkian G. A., Voskantan L. H., Alexanian S. S., Muradian M. Sh. *Neurochem. Res.*, v. 13, № 5, p. 493—498, 1988.
45. Аюпян А. Р., Срапионян Р. М., Карапетян Р. О., Галоян А. А. *Нейрохимия*, т. 6, № 2, с. 227—230, 1987.
46. Галоян А. А., Алексанян С. С., Иванов И. И. *Докл. АН АрмССР*, т. 65, № 4, с. 238—241, 1977.
47. Galoyan A. A., Gurevitz B. Ja., Sirtbekian G. A., Kirakosova A. S. —In: *Cyclic Nucleotides and Therapeutic Perspectives* (eds. G. Cehovic, G. Robison), p. 165—181, N. Y., Pergamon Press, 1979.

48. Cheung W. Y. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 29, p. 478—482, 1970.
49. Kakluht S., Yamazaki R. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 41, № 5, p. 1104—1110, 1970.
50. Cheung W. Y. Science, v. 207, p. 19—27, 1980.
51. Klee C. B., Crouch T. H., Richman P. L. Ann. Rev. Biochem., v. 49, p. 489—515, 1980.
52. Means A. R., Dedman J. R. Nature (London), v. 285, p. 73—77, 1980.
53. Waisman D. M., Singh T. J., Wang J. H. J. Biol. Chem., v. 253, № 10, p. 3337—3390, 1978.
54. Cohen P., Picton C., Klee C. B. FEBS Lett., v. 104, p. 24—29, 1979.
55. Burger D., Stein E. A., Cox J. A. J. Biol. Chem., v. 258, p. 14733—14739, 1983.
56. Galoyan A. A., Sharova N. P., Gurvitz B. Ja. Intern. Symposium on Molecular organization of biological structure, Moscow, p. 139, 1989 Abstract.
57. Riecker J. P. et al. J. Biol. Chem., v. 262, № 31, p. 87, 1987.
58. Kimura Y. et al. Arch. Biochem. Biophys., v. 257, (2), № 87, p. 363, 1987.
59. Cox D. E., Edström R. D. J. Biol. Chem., v. 257, p. 12728—12733, 1982.
60. Hogeboom G. K., Feden J. S. Biochim. Biophys. Res. Commun., v. 95, № 2, 1981.
61. Jarrett H. W., Penntston J. T. Biochim. Biophys. Res. Commun., v. 77, p. 1210—1216, 1977.
62. Vincenzi F. F. et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 355, p. 232—244, 1980.
63. Coront P., Carafoli E. J. Biol. Chem., v. 256, p. 3263—3270, 1981.
64. Anderson I. M., Cormier M. J. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 84, № 3, p. 595—602, 1978.
65. Payne M. E., Soderling T. R. J. Biol. Chem., v. 255, № 17, p. 8054—8056, 1980.
66. Wang J. H., Waisman D. M. Curr. Top. Cell. Regul., v. 15, p. 47—107, 1979.
67. Yamauchi T., Fujisawa H. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 90, № 1, p. 28—35, 1979.
68. El-Mestikawa S., Glowinski J., Haman M. Nature, v. 302, p. 830—832, 1983.
69. Kennedy M. B. J. Neurochem., v. 44, p. 30, 1985.
70. Mayer G. W. Eur. J. Biochem., v. 143, p. 513—520, 1984.
71. Orosz F., Christova T. V., Ovadi J. Mol. Pharmacol., v. 33, p. 678—681, 1988.
72. Malnoe A., Cox J. A., Stein E. A. Biochim. Biophys. Acta, v. 714, p. 84—92, 1982.
73. Klee C. B. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 76, p. 6270—6273, 1979.
74. Stewart A., Ingebristen T. S., Cohen P., Manalan A., Klee C. B. FEBS Lett., v. 137, p. 8—84, 1982.
75. Sharma R. K., Wang J. H. PNAS USA, v. 82, p. 2603—2607, 1985.
76. Atmaz V. J., Kuehn G. D. Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol., v. 42, p. 2249 1983.
77. Da Sarathy Y., Fonburg B. L. J. Cell. Physiol., v. 137, № 1, p. 179, 1988.
78. Burke B. E., DeLorenzo R. J. PNAS USA, v. 78, № 2, p. 991—996, 1981.
79. Wong P. Y. K., Cheung W. Y. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 90, p. 473—480, 1979.
80. Fift C., Plank B., Wyskovsky W., Bertel O., Hellman G., Suko J. Biochim. Biophys. Acta, v. 773, p. 197—206, 1984.
81. Marcum J. M. et al. PNAS USA, v. 75, № 8, p. 3771—3775, 1978.
82. Sobze K., Muramoto Y., Fujita M., Kakluht S. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci., v. 78, p. 5652—5655, 1981.
83. Glenney J. R., Weber K. J. Biol. Chem., v. 255, p. 10551—10554, 1980.
84. Means A. R., Tash J. S., Chafoula S. Physiol. Rev., v. 62, p. 1—39, 1982.
85. Blauwens R., Rentmesters M. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 99, № 2, 491—495, 1981.
86. Hill T. D. et al. J. Biol. Chem., v. 263, p. 16479, 1988.
87. Larsen F. L., Vincenzi F. F. Science, v. 204, p. 306—309, 1979.
88. De Lorenzo R. J. PNAS USA, v. 76, № 10, p. 5402—5406, 1979.

89. *Fujisawa H., Yamauchi Y. T., Nakatsu H., Okuno S.* *Federat. Proc.*, 43. p. 3011—3014, 1984.
90. *Szulman H., Greengard P.* *PNAS USA*, v. 76, № 10, p. 5402—5406. 1979.
91. *Katz S., Rettulla M. A.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 83, p. 1373—1379 1978.
92. *Otwin B. B., Storm D. R.* *Biochemistry*, v. 24. p. 8081—8086, 1985.
93. *Nishizawa Y.* et al. *J. Clin. Invest.*, v. 82, № 4, p. 1165. 1988.
94. *Heizmann C. W., Braun K.* *The role of calcium in biological systems.* ed. L. J. Anghileri Copyright CRC Press, Inc., Boca Raton, FL. p. 21—65, 1990.
95. *Галоян А. А., Гурвиц Б. Я., Ли Т., Шайхали Дж.* *Нейрохимия*, №4, 1990.

Поступила 25.I.1990

ЗАМЕЧЕННЫЕ ОПЕЧАТКИ

гр.	строка	напечатано	должно быть
202	12 сверху	(K)	(Ka)
274	4 снизу	аккомодулин	онкомодулин
280	16 снизу	Установлено идентичность	Установлена идентичность
282	11 снизу	фосфорилирование	фосфорилированием
282	2 снизу	мы и саркоплазматического ретикулула	нов кальция (особенно при патологических состояниях из цитоплазм—

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 5 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.

СО Д Е Р Ж А Н И Е

<i>Таринова Н. П., Маликов У. М.</i> Влияние лишения парадоксальной фазы сна на специфическое связывание [^3H]морфина и [^3H]налоксона с синаптическими мембранами головного мозга крыс	161
<i>Меликсетян М. Б., Корнеев А. Я., Середенин С. Б.</i> Свойства мест специфического связывания этилового эфира β -карболин-3-карболовой кислоты отличных от бензодиазепиновых рецепторов в мозгу крысы	167
<i>Кириаков Г. В., Рожанец В. В., Русаков Д. Ю., Колодкина Н. Г., Кампо-Полевой А. Б., Майский А. И., Лежава Г. Г.</i> Рецепторные системы головного мозга крыс различной типологической принадлежности при стрессе, добровольном потреблении этанола и субхроническом применении мебикара и бефоло	174
<i>Неруш П. А.</i> Фармакологическая коррекция нейрохимических изменений в структурах головного мозга крыс при экспериментальном неврозе	182
<i>Бархударян Н. А., Хорват Л., Галоян А. А., Овади Ю.</i> Аллостерическая регуляция кальмодулина коронаросуживающими нейропептидами гипоталамуса	188
<i>Абримян Г. Э., Бобрускин И. Д., Гуриц Б. Я., Галоян А. А.</i> Влияние антагониста кальмодулина W-7 на регуляцию активности кальмодулинчувствительной ФДЭ из мозга быка С-модулином I	196
<i>Лещина М. В., Васильев А. А.</i> Изучение содержания и состава церебролидов и сульфоперебролидов в опухолях головного мозга человека	202
<i>Саакян С. А., Греки Г., Саакян Ф. М., Срапцион Р. М., Парк Р., Галоян А. А., Маттисс А.</i> Влияние гипоталамических белок-гормональных комплексов на фукозилирование гликопротеинов глишокамп	209
<i>Назарян К. Б., Каранетян Н. Г., Казарян Б. А.</i> Различия в стабильности α и γ изоферментов ендолазы мозга при инкубации с нейтральными солями	215
<i>Амбарцумян В. Г., Вартанян А. Г., Оганесян В. С.</i> Особенности регуляции активности мембраносвязанной фосфатзависимой глутаминазы синапсом и митохондрий коры головного мозга	223
<i>Гайдар Л. И., Литвинова Л. В., Втюрина И. Ю., Соловьев Ю. И., Березин В. А., Василон Р. Г.</i> Получение моноклональных антител к глиальному фибриллярному белку и их использование для характеристики полипептидного состава глиоспецифического белка в онтогенезе мозга человека	230
<i>Чехоник В. П., Диджиева Р. Ц., Коротева Е. А., Рябухин И. А., Лебедева А. С., Буркина А. Ю., Беляева Н. Ю.</i> Иммунохимическое изучение механизмов аутоиммунной агрессии антител к нейроспецифическим белкам у крыс с экспериментальным прорывом ГЭБ	239
<i>Опарина Т. И., Блюдзин Ю. А., Путилина Ф. Е.</i> Влияние гипердоз витамина А на метаболизм неэстерифицированных жирных кислот нервной ткани	245
Краткие сообщения	
<i>Менджерский А. М., Ускова И. И., Чораян И. О., Михалева Н. И.</i> Хронобиологический эффект дельта-сон индуцирующего пептида и система ГАМК в мозгу крыс	251

Войтенко Н. П. Регуляция активности моноаминоксидазы мозга предраспо- ложенных к катаракте крыс на уровне транскрипции	257
Галазин А. А., Карапетян Р. О., Попова Т. В. Влияние негормонального фактора синаптического захвата [H]норадреналина на дофенинами крыс	261
Павлов А. Ю., Овсенин Т. М., Овелян Г. А., Паносян А. Г., Кариссели К. Г., Петров А. З. Метаболизм жирных кислот в головном мозгу при экс- периментальном отеке	265

О б з о р ы

Галазин А. А. Са ²⁺ -каналы и сопряженные системы регуляции	271
--	-----

CONTENTS

<i>Taranova N. P., Malikov U. M.</i> The effect of REM-sleep deprivation on binding of [3 H] morphine and [3 H] naloxone with synaptic membranes in rat brain	161
<i>Meliksetyan M. B., Korneev A. Ya., Seredenin S. B.</i> Properties of specific binding sites for β -carboline-3-carboxylic acid ethyl ester different from the diazepam receptors in rat brain	167
<i>Kirtakov G. V., Rozhanets V. V., Rusakov D. Yu., Koloakina N. G., Kampov-Polevoi A. B., Matsky A. I., Lezhava G. G.</i> Brain receptor systems in rats with different typological taxonomy during stress: voluntary ethyl alcohol consumption and subchronic treatment with biefol and mebicar	174
<i>Nerush P. A.</i> Pharmacological correction of neurochemical changes in rat cerebral structures in experimental neurosis	182
<i>Barkhudaryan N. A., Horvath L., Galoyan A. A., Ovadi J.</i> About calmodulin binding coronarconstrictory hypothalamic peptides	188
<i>Abramyan G. E., Bobrskii I. D., Gurvits B. Ya., Galoyan A. A.</i> The effect of W-7, a calmodulin antagonist, on the regulation of activity of CM-sensitive PDE from bovine brain by C-modulin	196
<i>Levitina M. V., Vasil'ev A. A.</i> Studies of the level and composition of cerebroside and sulfocerebroside in human brain tumors	202
<i>Sahakian S. A., Greekish G., Sahakian F. M., Srapionian R. M., Jork R., Galoyan A. A., Matthies H.</i> Influence of hypothalamic protein-hormone complexes on hippocampal glycoprotein fucosylation	209
<i>Nazaryan K. B., Karapetyan N. G., Kazaryan B. A.</i> Differences in stability of α - and β -enolase isozymes of the brain during incubation with neutral salts	215
<i>Ambartsumyan V. G., Vartanyan A. G., Oganesyan V. S.</i> Aspects of the activity control of membrane-bound phosphate glutaminase of synaptosomes and mitochondria of the cerebral cortex	223
<i>Qaidar L. I., Litvinova L. V., Vtyurina I. Yu., Solovyev Yu. N., Berezin V. A., Vasilov R. G.</i> Raising of monoclonal antibodies against glial fibrillar acidic protein and their use for characterization of polypeptide composition of glial-specific proteins during human brain ontogenesis	230
<i>Chekhonin V. P., Lidzhieva K. Ts., Koroteeva E. A., Ryabukhin I. A., Lebedeva A. C., Burkina A. Yu., Belyaeva N. Yu.</i> Immunochemical study of mechanisms of autoimmune aggression of antibodies towards neurospecific proteins in rats with experimental rupture of the blood-brain barrier	239
<i>Oparina T. I., Blyudzin Yu. A., Putillina F. F.</i> The effect of vitamin A overdoses on metabolism of non-esterified fatty acids of nervous tissues	245
Short communications	
<i>Mendzheritskii A. M., Uskova N. I., Chorayan I. O., Mikhilova I. I.</i> Chronobiological effect of δ -sleep-inducing peptide and GABA system in rat brain	251
<i>Voitenko N. N.</i> Control of brain monoamine oxidase activity in rats predisposed to catalepsy at the transcription level	257
<i>Galoyan A. A., Karapetyan R. O., Popova T. V.</i> The effect of neurohormone	

Con synthesis and uptake of [^3H] noradrenaline by rat adrenals.	261
<i>Pogosyan A. Yu., Osepyan L. M., Overyan G. A., Panosyan A. G., Karagez- yan K. G., Pepoyan A. Z.</i> Metabolism of fatty acids in brain during experi- mental oedema	265

Reviews

<i>Galoyan A. A.</i> Ca^{2+} -calmodulin and coupled systems of the control	271
--	-----

Ст. редактор Э. А. Хачатурова
Лит. сотрудник Г. Р. Григорян

Сдано в набор 11.06.90 г. Подписано в печать 11.02.91 г.

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

Печ. л. 8.0, усл. печ. л. 11.2, учет. изд. л. 9.58. Тираж 715 экз.

Заказ № 708. Издат. 7854. Цена 1 р. 65 к.

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

Типография АН Армения, г. Ечмиадзин.