т. 9, № 3, 1990

ISSN 0203—393X

НЕЙРОХИМИЯ

ՆԵՅՐՈՔԻՄԻԱ

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЕНИИ

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЕНИИ

НЕЙРОХИМИЯ
ՆԵՅՐՈՔԻՄԻԱ

ТОМ 9, ВЫП. 3
ИЮЛЬ—СЕНТЯБРЬ

Журнал основан в 1982 году
Выходит 4 раза в год

ИЗДАТЕЛЬСТВО АН АРМЕНИИ
ЕРЕВАН 1990

Ст. редактор Э. А. Хачатурова

Лит. сотрудник Е. Р. Григорян

Сдано в набор 7.06.1991 г. Подписано в печать 20.08.91 г.
Формат 70×108 1/16. Бумага № 1. Печать высокая
Печ. л. 7,25, усл. печ.л. 10,15, учет. изд. л. 9,7. Тираж 715 экз.
Заказ № 170. Издат. 7902. Цена 1 р. 65 к.
Издательство АН РА, 375019, Ереван, пр. Маршала Баграмяна, 24 г.

Редакционная коллегия

А. А. ГАЛОЯН—главный редактор
А. ЛАЙТА (США)—соредактор

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

Издательство АН Армении, Нейрохимия, 1990

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, глии и нейронов, хромаффинных гранул и т. д.

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

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

Подписку на журнал «Нейрохимия» можно осуществить во всех отделениях «Союзпечати» (индекс для подписки—70637), а за границей через агентство «Международная книга». «Журнал выходит 4 раз в год.

РЕДКОЛЛЕГИЯ

НЕЙРОХИМИЯ
т. 9, № 3, 1990

УДК 577.175.62:612.822:1:577.175.823

ВЛИЯНИЕ АНДРОГЕНОВ НА СЕРОТОНИНОВЫЕ РЕЦЕПТОРЫ МОЗГА КРЫС

МАСЛОВА Г. Б., АВГУСТИНОВИЧ Д. Ф., ПОПОВА Н. К.
Институт цитологии и генетики СО АН СССР, Новосибирск

Изучено влияние пола, односторонней и двухсторонней кастрации на С1 и С2 серотониновое рецепторное связывание (определявшееся по связыванию [^{3}H]серотонина и [^{3}H]спиперона) и концентрацию серотонина в мозгу крыс. Обнаружены половые различия в содержании серотонина во фронтальной коре и по С1 рецепторному связыванию в гипоталамусе и гиппокампе: у самцов наблюдался сниженный уровень серотонина и более высокое С1 рецепторное связывание. Двухсторонняя кастрация самцов крыс приводила к повышению С1 и С2 рецепторного связывания во фронтальной коре через десять дней после операции, не изменяя уровня серотонина и его метаболита. Односторонняя кастрация вызывает значительное повышение С1 рецепторного связывания в гипоталамусе через 24 ч и снижение через 72 ч. В гиппокампе С1 рецепторное связывание было сниженным как через 24, так и через 72 ч. Наряду с этим гемикастрация не повлияла на уровень серотонина и С1 и С2 рецепторное связывание во фронтальной коре. Таким образом, изменение баланса андрогенов влияет на серотониновые рецепторы первого и второго типов. Предположено, что на С1 рецепторы гипоталамуса андрогены оказывают ингибирующее действие, что может отражать участие этого типа рецепторов гипоталамуса в регуляции уровня тестостерона по механизму обратной связи.

Несмотря на успехи, достигнутые за последние годы в изучении серотониновых рецепторов [1, 2], проблема их эндогенной регуляции остается одной из наименее разработанных. В особенности это относится к роли половых гормонов. В то же время хорошо известно, что существуют тесные взаимодействия между серотониновой системой мозга и гипоталамо-гипофизарно-половой системой. Имеются данные, свидетельствующие об участии серотонина головного мозга в регуляции гипоталамо-гипофизарно-семенникового комплекса механизмом обратной связи [3]. Можно предположить, что серотониновая передача, в свою очередь, контролируется половыми гормонами, по крайней мере, в некоторых структурах мозга. Однако сравнительно немногочисленные данные о влиянии нарушенного гормонального баланса на уровень серотонина в мозгу очень противоречивы [3]. В то же время, на самках крыс обнаружено, что эстрогены способны изменять рецепторное связывание меченого серотонина в некоторых областях мозга [4, 5]. Влияние андрогенов на серотониновую рецепцию пока не изучено, поэтому в данной работе мы попытались оценить эффекты

андрогенов на серотониновые рецепторы различных областей мозга крыс и выяснить: 1) имеются ли половые различия в С1 и С2 рецепторном связывании; 2) влияет ли на серотониновые рецепторы в мозгу двухсторонняя кастрация и колебания концентрации андрогенов после односторонней кастрации животных, применяемой в качестве модели для изучения механизмов обратной связи в гипоталамо-гипофизарно-семенниковой системе [6].

Материалы и методы

В опыте были использованы самцы и самки крыс линий *Wistar* и *Sprag-Dawley* массой 180—200 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария при естественном освещении, корм и воду они получали без ограничений.

При изучении половых различий в опытах были использованы самки, находящиеся в стадии диэструса, что определялось по влагалищным мазкам.

В серии экспериментов с двухсторонней кастрацией животные были разделены на 3 группы: 1—ложнооперированные; 2—кастрированные, которым в течение 10 дней вводили подкожно тестостерон пропионат (500 мкг в день); 3—кастрированные с введением такого же объема (0,2 мл) растворителя (оливковое масло). Животных декапитировали на 11-й день после операции.

Для исследования участия серотониновых рецепторов мозга в механизмах регуляции секреции гормонов по принципу обратной связи использовали модель односторонней кастрации животных, при которой вслед за двукратным снижением (через 24 ч) происходит компенсаторное увеличение концентрации тестостерона в плазме крови, через 72 ч превышающее исходный уровень [6]. Гемикастрированных животных декапитировали через 24 или 74 ч; контролем служили соответствующие группы ложнооперированных животных.

Для определения С1 и С2 рецепторного связывания животных декапитировали, быстро на льду выделяли фронтальную кору, гиппокамп и гипоталамус, которые хранили в жидком азоте до опыта. Радиолигандным методом [7] с некоторыми модификациями [8] было определено связывание [^{3}H] серотонина (18 Ки/ммоль, „Amersham", Англия) и [^{3}H] спиперона (17 Ки/ммоль, „Amersham", Англия) в присутствии и в отсутствие избытка соответствующих немеченых вытеснителей—буфотенина („Serva", ФРГ) или кетансерина („Janssen Pharmaceutica", Бельгия)*.

Концентрацию серотонина и его метаболитов в структурах мозга определяли флуорометрически [9]. Концентрацию белка в пробе—по методу Lowry [10]. При статистической обработке результатов использовали метод Иогансена-Ламри [11] для оценки параметров рецепторного связывания и t-критерий Стьюдента для сравнения выборочных средних.

* Авторы благодарны фирме за предоставленный кетансерин.

Результаты и обсуждение

Половые различия по С1 рецепторному связыванию в мозгу были обнаружены у обеих изученных линий крыс— *Wistar* и *Spraig-Dowley*. В гипоталамусе самцов крыс линии *Spraig-Dowley* наблюдались более высокие, чем у самок значения С1 рецепторного связывания, измеренного при фиксированной концентрации метки (94,1 ± 6,2 фмоль/мг белка у самцов и 72,3 ± 7,9 фмоль/мг белка у самок, $p<0,05$). Такие же различия были обнаружены и в гипоталамусе крыс линии *Wistar* (табл. 1). При оценке параметров рецепторного связывания наблюдалась тенденция к более высокому значению K_d у самок, значения B_{max} у животных разного пола не различались. Таким образом, остается неясным, отличаются ли С1 рецепторы в гипоталамусе самок крыс более низким сродством, чем у самцов, или меньшим количеством. Другие исследователи [4] также обнаружили более высокое связывание [^{3}H] серотонина у самцов в области мозга, включавшей гипоталамус, преоптическую область и перегородку, хотя половые различия наблюдались только в том случае, если самки были в стадии эструса.

Сравнение С1 рецепторного связывания в гиппокампе крыс линии *Wistar* разного пола показало, что при одинаковой K_d максимальное число мест рецепторного связывания достоверно выше у самцов, однако связывание, определяемое при фиксированной концентрации метки, практически не различалось (табл. 1).

Таблица 1

Половые различия по С1 рецепторному связыванию в мозгу крыс линии *Wistar*.

	Фронтальная кора		Гипоталамус		Гиппокамп	
Исследуемые показатели	Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки
B_{max} (фмоль/мг белка), n=10	207,3 ±19,2	173,4 ±18,1	164,1 ±5,9	137,6* ±8,4	316,0 ±15,8	281,8 ±21,9
B_{max} (фмоль/мг белка)	64,8 ±29	583,5 ±40	320,5 ±14,9	347,5 ±85,9	641,8 ± 0.7	450,7* ±30,0
K_d (10^{-9} М)	13,8±1,3	15,2±1,8	7,8±0,8	18,7±7,5	11,0±1.6	12,3±1,5

Примечание. Здесь и в табл. 2, 4 *$p<0,05$.

Во фронтальной коре не было обнаружено половых различий по С1 рецепторам ни у крыс линии *Spraig-Dowley* (164,1±11,7 фмоль/мг белка—у самцов; 180,9±7,0 фмоль/мг белка—у самок), ни у крыс линии *Wistar* (табл. 1). С2 рецепторное связывание, измеренное во фронтальной коре крыс обеих линий, тоже не различалось у животных разного пола (рис. 1).

При определении концентрации серотонина и его основного метаболита во фронтальной коре у самок выявлено более высокое содержание серотонина, чем у самцов (табл. 2). В среднем мозгу, гипо-

таламусе и гиппокампе половых различий по уровню серотонина и его метаболита обнаружено не было (данные по уровню 5-оксииндолилуксусной кислоты не приведены).

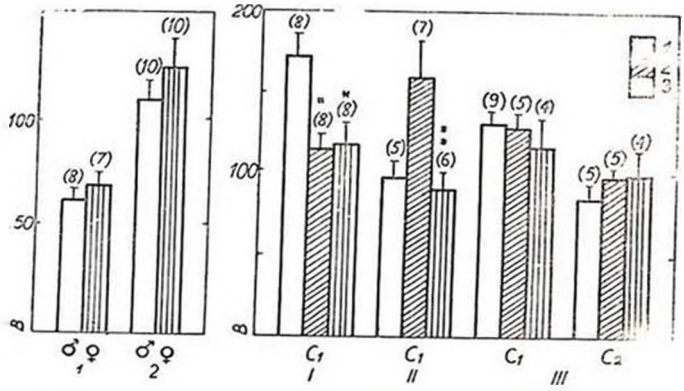

Рис. 1. Половые различия по С2 рецепторному связыванию во фронтальной коре мозга крыс линий Sprague-Dowley (1) и Wistar (2). Здесь и на рис. 2 указано число животных. По оси ординат—коэффициент связывания (В, фмоль/мг белка).

Рис. 2. С1 и С2 рецепторное связывание в мозгу крыс линии Sprague-Dowley после односторонней кастрации. I—гиппокамп, II—гипоталамус, III—фронтальная кора. *1*—контроль (ложнооперированные животные), *2*—через 24 ч после кастрации, *3*—через 72 ч после кастрации. *$p<0.05$ по сравнению с контролем, **$p<0.05$ по сравнению с группой 2.

Таким образом, половые различия в серотониновом рецепторном связывании и в уровне серотонина наблюдаются не в одних и тех же областях мозга. Животные разного пола различались по концентрации серотонина во фронтальной коре, а по С1 рецепторам—в гипоталамусе и гиппокампе.

Таблица 2

Половые различия в концентрации серотонина (мкг/г) в мозгу крыс линии *Wistar*

Животные	Фронтальная кора	Средний мозг	Гипоталамус	Гиппокамп
Самки	0,67±0,02* n=10	0,65±0,07 n=10	0,98±0,05 n=10	0,48±0,03 n=9
Самцы	0,8 ±0,04 n=8	1,0 ±0,07 n=10	0,90±0,05 n=10	0,43±0,03 n=10

Если тестостерон влияет на активность серотониновой системы мозга крыс, то можно было ожидать, что удаление семенников отразится на метаболизме серотонина или на его рецепторном связывании в мозгу. Однако, после двухсторонней кастрации уровни серотонина и 5-оксииндолилуксусной кислоты, измеренные в среднем мозгу и коре крыс линии *Wistar*, существенно не отличались от контроля (табл. 3). В то же время, через десять дней после кастрации у крыс

обеих линий увеличилось С1 рецепторное связывание во фронтальной коре мозга (табл. 4). В гипоталамусе изменений рецепторного связывания не обнаружено. С2 рецепторное связывание во фронтальной коре достоверно увеличилось у крыс линии Spraig-Dowley (табл. 4). Возможно, именно изменения серотониновых рецепторов, обнаруженные во фронтальной коре мозга, и отвечают за наблюдаемые после кастрации животных изменения в тех формах поведения (половое, агрессивное поведение), в регуляции которых принимает участие серотониновая система мозга [12, 13].

Таблица 3

Концентрация серотонина и оксииндолилуксусной кислоты (мкг/г) в мозгу крыс линии *Wistar* после двухсторонней кастрации

Определяемые вещества	Кора		Средний мозг	
	контроль	кастрация	контроль	кастрация
Серотонин	0,66±0,05 (6)	0,69±0,05 (8)	0,89±0,05 (7)	1,02±0,09 (10)
5-ОИУК	0,50±0,03 (8)	0,42±0,04 (10)	1,33±0,13 (8)	1,41±0,07 (10)
5 ОИУК серотонин	0,73±0,05 (6)	0,68±0,12 (7)	1,38±0,09 (7)	1,42±0,08 (10)

Введение тестостерона кастрированным крысам линии *Wistar* лишь незначительно снизило С1 и С2 рецепторное связывание во фронтальной коре, возросшее после кастрации (табл. 4). По-видимому, экзогенный тестостерон не обеспечивал адекватного уровня гормона

Таблица 4

Влияние двухсторонней кастрации на С1 и С2 рецепторное связывание (фмоль/мг белка) во фронтальной коре самцов крыс двух линий.

	С1	С2
Spraing-Dowley контроль	44,3±6,1 (9)	69,8±4,9 (9)
кастрация	73,5±5,7* (6)	99,3±7,1* (5)
Wistar контроль	102,9±10,2 (7)	107,1±5,6 (10)
кастрация	131,9±7,7* (10)	114,5±10,2 (10)
кастрация + тестостерон	126,2±15,5 (10)	104,7±5,4 (10)

в крови. Кроме того, возможно, что введение даже больших доз одного тестостерона не может компенсировать весь спектр нейрохимических изменений, развивающихся после полного удаления половых желез.

Эффективной моделью для изучения влияний снижения и повышения уровня андрогенов в крови является односторонняя кастрация крыс, при которой через 24 ч происходит резкое падение уровня тестостерона в крови до минимальной концентрации, а затем повышение до исходного уровня (через 72 ч) и даже превышение его за счет компенсаторного усиления работы второго семенника [6].

На модели односторонней кастрации самцов крыс линии *Spraig-Dowley* было исследовано рецепторное связывание [^{3}H] серотонина в трех отделах мозга: фронтальной коре, гипоталамусе и гиппокампе.

Четкие изменения, противоположные изменениям концентрации тестостерона, проявляли С1 рецепторы гипоталамуса (рис. 2). В моменты времени, соответствующие минимальному (24 ч) и максимальному (72 ч) уровню гормона [6], значения С1 рецепторного связывания различались почти в два раза. Тестостерон, по-видимому, оказывает ингибирующее действие на С1 рецепторы гипоталамуса, что может быть одним из элементов ранее показанного [3] участия серотонина в механизмах обратной связи.

В гиппокампе С1 рецепторное связывание, измеренное через сутки после операции, было значительно меньше контрольного и оставалось на том же уровне через трое суток. Во фронтальной коре мозга ни через сутки, ни через трое суток после односторонней кастрации С1 и С2 рецепторное связывание не отличалось от контроля (рис. 2). Не изменялся и уровень серотонина.

Разный характер изменений серотониновых рецепторов после двух- и односторонней кастрации животных, по-видимому, свидетельствует о различии путей, через которые реализуются влияния андрогенов на рецепторы серотонина, находящиеся в разных областях мозга, а неодинаковая реакция С1 рецепторов гипоталамуса и гиппокампа на снижение концентрации андрогенов дает основание заключить, что в норме, возможно, андрогены могут оказывать как ингибирующее, так и стимулирующее действие на активность рецепторного звена серотониновой системы мозга.

Таким образом, показано существование гормональной регуляции андрогенами серотониновых рецепторов. Как известно, большая часть эффектов половых гормонов осуществляется через влияние на экспрессию генов и белковый синтез [14]. Поскольку серотониновые рецепторы—это мембранные белки, вероятно, андрогены могут регулировать их синтез или деградацию, хотя нельзя исключить и возможность конформационных изменений серотониновых рецепторов под влиянием андрогенов.

Гормональная регуляция проявляется в гипоталамусе в виде обнаруженных половых различий в С1 рецепторах и быстро возникающих изменениях С1 рецепторного связывания при резких колебаниях уровня тестостерона в крови, вызванных односторонней кастрацией. Учитывая, что гипоталамус характеризуется высокой концентрацией чувствительных к андрогенам рецепторов [15], и, в то же время, в нем локализуются серотонинергические структуры, ре-

гулирующие выделение люлиберина [3], можно предположить, что обнаруженное нами влияние андрогенов на С1 рецепторное связывание в этой структуре отражает участие этого типа серотониновых рецепторов в механизмах обратной связи системы гипоталамус-гипофиз-половые железы. Однако более высокое С1 рецепторное связывание в гипоталамусе самцов по сравнению с самками не согласуется с предполагаемым угнетающим эффектом тестостерона, но, учитывая имеющиеся в литературе данные о значительном ингибирующем действии эстрогена на С1 рецепторы гипоталамуса, обнаруженные на самках крыс [4, 5], можно предположить, что половые различия по С1 рецепторам обусловлены еще более выраженным угнетающим влиянием женских половых гормонов на серотониновые рецепторы гипоталамуса.

Таким образом, большинство обнаруженных изменений касалось С1 рецепторов: это изменения в гипоталамусе, увеличение связывания во фронтальной коре после двухсторонней кастрации и снижение связывания в гиппокампе после односторонней кастрации.

В меньшей степени колебания уровня андрогенов в крови влияли на С2 рецепторы. Существенное повышение С2 рецепторного связывания во фронтальной коре было обнаружено лишь у одной из изученных линий крыс после двухсторонней кастрации. По-видимому, С1 рецепторы коры более чувствительны к действию андрогенов, чем С2 рецепторы.

THE EFFECT OF ANDROGENS ON SEROTONIN RECEPTORS OF THE RAT BRAIN

MASLOVA G. B., AVGUSTINOVICH D. F., POPOVA N. K.

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

The effect of sex, castration and hemicastration on serotonin level and serotonin receptors of the rat brain was assayed by radioligand binding using [^{3}H] serotonin and [^{3}H] spiperone. We detected sexual dimorphism in terms of serotonin level in the frontal cortex and of 5-HT$_1$ binding in hypothalamus and hippocampus: in males the serotonin concentration was lower and the level of 5-HT$_1$ binding higher than in female rats. Castration of males resulted in a significant increase in 5-HT$_2$ and 5-HT$_2$ binding in the frontal cortex. 5-HT$_1$ binding in hypothalamus significantly increased 23 h after hemicastration and then decreased 72 h post-operation. 5-HT$_1$ binding in hippocampus was decreased either 24 h or 72 h after hemicastration. At the same time, serotonin level and 5-HT binding in the frontal cortex after hemicastration remained unchanged.

Thus, disturbances of androgen level affect 5-HT$_1$ and 5-HT$_2$ serotonin receptors. Our results suggest that androgens have the inhibitory effect on hypothalamic 5-HT$_1$ receptors, witch can be involved in feed back regulation of testosterone.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Hartig P. R.* TIPS Reviews, v. 10, p. 63—69, 1989.
2. *Peroutka S. J.* Ann. Rev. Neurosci., v. 11, p. 45—60, 1988.
3. *Науменко Е. В., Осадчук А. В., Серова Л. И., Шишкина Г. Т.* Генетико-физиологические механизмы регуляции функций семенников. Новосибирск, Наука, 1983.
4. *Biegon A., Bercovitz H., Ssmuel D.* Brain Res., v. 187, p. 221—225, 1980.
5. *Biegon A., McEwen B. S.* J. Neuroscience, v. 2, № 2, p. 199—205, 1982.
6. *Шишкина Г. Т., Науменко Е. В.* Изв. СО АН СССР, серия биол. наук, вып. 1, № 5, с. 131—133, 1977.
7. *Peroutka S. J., Snyder S. H.* Mol. Pharmacol., v. 16, p. 687—699, 1979.
8. *Пак Д. Ф., Маслова Г. Б., Куликов А. В., Бормотов В. В.* Вопр. мед. химии, № 4, с. 17—21, 1988.
9. *Atack C.* Acta Physyologica Scandinavica. Suppl., v. 451, p. 2—99. 1977.
10. *Lowry O. H., Rosenbrought M. J., Farr A., Randall R. J.* J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
11. *Корниш-Боуден Э.* Основы ферментативной кинетики, М., с. 232—266, 1979.
12. *Попова Н. К., Науменко Е. В., Колпаков В. Г.* Серотонин и поведение, 1978.
13. *Soderstøn P., Larsson K., Ahlenius S., Engel J.* Pharm. Bioch. Behav., v. 5, p. 319—327, 1975.
14. *Мейнуоринг У.* Механизмы действия андрогенов, М.: Мир, 1979.
15. *Sar M., Stumpf W. E.* Endocrinology, v. 92, № 1, p. 251—256, 1973.

Поступила 10. VII. 1990

НЕЙРОХИМИЯ
т. 9, № 3, 1990

УДК 577.153.4:612.815.1

СВЯЗЫВАНИЕ [^{3}H] ДОФАМИНА $ДА_2$-РЕЦЕПТОРАМИ СИНАПТИЧЕСКИХ МЕМБРАН РАЗЛИЧНЫХ ЗОН МОЗГА КРЫС ПОСЛЕ ОБУЧЕНИЯ УСЛОВНОЙ РЕАКЦИИ ПАССИВНОГО ИЗБЕГАНИЯ

ПОДГОРНАЯ Е. К., ГАЛКИНА О. В., ИЛЬЮЧЕНОК Р. Ю.

Институт физиологии СО АМН СССР, Новосибирск*

Установлено, что у животных, обученных условной реакции пассивного избегания (тестирование через 24 ч), наблюдается значительное увеличение рецепторной плотности дофаминовых рецепторов в четырех областях мозга (фронтальной коре, миндалине, гипоталамусе, стриатуме) в сравнении с интактными. Этот феномен сопровождался появлением в мозговой ткани значительных количеств *п*-тирамина (*п*-ТА).

Содержание дофамина (ДА) при этом заметно снижалось в стриатуме и увеличивалось в коре, миндалине и гипоталамусе. Полученные результаты позволяют предположить непосредственное участие постсинаптических $ДА_2$-рецепторов в механизмах обучения.

Известно, что наибольшим сродством к природному медиатору—ДА обладают $ДА_2$-рецепторы с $K_d \sim 1$ нМ. Точная классификация этого типа рецепторов долгое время оставалась затруднительной. Одни авторы относили его к пресинаптическим высокоаффинным ДА-рецепторам на том основании, что они не связаны с ферментом аденилатциклазой и обладают наномолярным сродством к ДА [1]. Другие полагали, что $ДА_2$-рецепторы являются подтипом $ДА_1$-рецепторов, поскольку они связываются бромкриптином [2]. В настоящее время экспериментально доказано, что этот тип рецепторов локализован на постсинаптической мембране, обладает наномолярным сродством к ДА и микромолярным—к нейролептикам [3, 4] и связывает [^{3}H] ДА в присутствии аскорбиновой кислоты и паргилина [5, 6]. Его классифицируют или как постсинаптические $ДА_2$-рецепторы [3], или выделяют в отдельный $ДА_3$-рецепторный тип [4].

Биологическая роль как $ДА_2$-, так и $ДА_3$-рецепторов до конца не выяснена, хотя показано участие дофаминовых рецепторов в процессах памяти [7—9]. Так, введение крысам галоперидола—специфического блокатора $ДА_2$-рецепторов нарушает воспроизведение условной

* Данная статья подверглась серьезному разбору компетентными рецензентами. Поскольку некоторые из положений статьи так и не нашли удовлетворительного объяснения со стороны авторов, статья печатается в дискуссионном порядке.

реакции пассивного избегания (УРПИ), несмотря на компенсаторное ускорение синтеза и кругооборота ДА [9—11].

Что касается тирамина, то он является минорным симпатомиметическим амином, который может функционировать как альтернативный трансмиттер, либо как котрансмиттер [12—13]. По современным данным, эндогенный тирамин содержится в нигростриатных дофаминергических нервных терминалях, уровень этого амина контролируется тирозингидроксилазой, ферментом-маркером для катехолергических нейронов [12]. Известно, что хотя основное количество ДА в мозгу синтезируется из ДОФА, небольшое его количество может образовываться из *n*-ТА при реализации побочного пути образования норадреналина и адреналина через тирамин и октопамин. До сих пор в литературе не рассматривался вопрос взаимосвязи содержания тирамина с функционированием дофаминовых рецепторов. Не известны также работы по исследованию изменений параметров [^{3}H] дофаминового связывания в процессах обучения [14].

В настоящей статье предпринята попытка оценить вклад постсинаптических $ДА_2$-рецепторов в нейрохимические механизмы обучения.

Материалы и методы

Исследования проводили на крысах-самцах линии *Wistar* массой 160—180 г, интактных и после физиологического воздействия. Животных обучали УРПИ при однократном электрокожном раздражении в течение 6 с и силою тока I=1 мА [15]. Тестирование проводили через 24 ч; обученными считались крысы, показавшие латентный период «перехода» из светлой камеры в темную, равный 180 с. Сразу после тестирования животных декапитировали.

Фронтальную кору, гипоталамус, миндалину и стриатум от 3—5 контрольных и обученных крыс выделяли, гомогенизировали на льду в 9 объемах 0,32 М сахарозы в 10 мМ трис-HCl, 2 мМ ЭДТА, pH 7,4. [^{3}H] ДА-связывание проводили по методу Morrol, Hsu [6] с некоторыми модификациями. Гомогенат отмывали от эндогенного ДА центрифугированием при 4° 50 000 g в течение 20 мин. В полученном таким образом супернатанте определяли содержание катехолов методом ВЭЖХ с электрохимической детекцией. Осадок ресуспендировали в 0,2 М K^+-фосфатном буфере, содержащем 1 мМ ЭДТА, 1 мМ дитиотритола, 0,2% аскорбиновой кислоты и 1 мкМ паргилина, pH 7,4. Аликвоты гомогената, содержащие 0,5 мг белка инкубировали с различными концентрациями [^{3}H] ДА при 3° в течение 17 ч [3]. Конечный объем пробы при этом составлял 0,5 мл. Радиоактивность измеряли на жидкостном β-сцинтилляционном счетчике «Delta-30». Эффективность счета составляла 55%. Специфическое связывание определяли как разницу между радиоактивностью при наличии и отсутствии 1 мМ нерадиоактивного ДА. Концентрацию белка в пробах определяли по методу Лоури. K_d и B_{max} определяли по методу Скэтчарда [16]. Кривую насыщения строили по связыванию [^{3}H] ДА в

области концентраций от 0,2 до 2,4 нМ (не менее 10 точек; рис. 1). Связывание проводили в триплетах. Обработку полученных данных проводили по t-критерию Стьюдента.

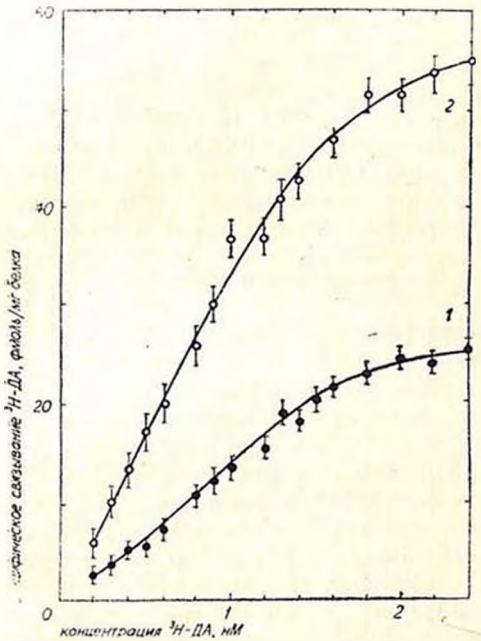

Рис. 1. Специфическое связывание [³H]дофамина синаптическими мембранами гомогената фронтальной коры мозга: *1*—интактные крысы, *2*—после обучения условной реакции пассивного избегания. Специфическое связывание определяли как разницу между радиоактивностью в присутствии и в отсутствие 1 мМ нерадиоактивного дофамина. По оси абсцисс—концентрация [³H]дофамина, нМ, по оси ординат—величина специфического связывания [³H]дофамина, фмоль/мг белка.

Катехолы (ДА, *n*-ТА, ДОФУК—3,4-диоксифенилуксусная кислота, ДОФА—3,4-диоксифенилаланин, НА—норадреналин) определяли в супернатанте методом ВЭЖХ с электрохимической детекцией на приборе фирмы «LKB» (Швеция). Условия хроматографии были следующие: колонка из нержавеющей стали размером 250×4 мм, упакованная сорбентом для обращенно-фазовой хроматографии «Lichrosorb RP-18» с размером частиц 5 мкм («LKB», Швеция); подвижная фаза приготовленная на бидистиллированной воде, содержащая 0,1 М NaH_2PO_4, 1 мМ ЭДТА, 10 мкМ NaCl, 5 мг/л октилсульфоната натрия и 10% (по объему) метилового спирта, pH 4,0. Скорость элюции составляла 1 мл/мин. Потенциал стеклоуглеродного электрода устанавливали равным ±0,65 в. Катехолы адсорбировали на микроколонке с Al_2O_3 (27—30 мг), промывали микроколонку водой и элюировали : кате-

холы 100—500 мкл 0,1 н. HCl [17]. Элюат (50—200 мкл) вводили микрошприцем («Rheodyne» Inc., США) в колонку для ВЭЖХ. Для расчета содержания ДА и *n*-ТА в тканях мозга в пробы супернатанта добавляли 50—70 нг стандарта ДОБА (3,4-диоксибензиламин) и Ин (Изопротеренол) [17, 18]. Статистическую обработку полученных данных проводили по t-критерию Стьюдента.

В работе использовали реактивы ДА, ДОФУК, НА, ДОБА, ЭДТА, SOS (октилсульфат натрия), ДТТ («Sigma», США), *n*-ТА, 3-МТ (3-метокси-4-оксифенилэтиламин), ГВК (4-окси-3-метоксифенилуксусная кислота; «Merck», ФРГ), ДОФА («Reanal» ВНР), 7,8 [^{3}H] ДА (51 Ки/ммоль), «Amersham» (Англия). Все остальные реактивы отечественного производства марки осч или перекристаллизованные.

Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлены параметры связывания [^{3}H] ДА постсинаптическими $ДА_2$-рецепторами из четырех областей мозга интактных крыс и после обучения УРПИ. Во всех указанных областях мозга обучившихся крыс зафиксировано значительное увеличение рецепторной плотности этого типа рецепторов в сравнении с интактными. Этот феномен для дофаминовых рецепторов обнаружен впервые, и сам подход рассмотрения роли $ДА_2$-рецепторов в нейрохимических механизмах обучения в литературе не обсуждался. Описано только участие дофаминовых рецепторов в регуляции психической деятельности человека в норме и патологии [5, 20], а феномен изменения рецепторной плотности $ДА_2$-рецепторов отдельные авторы связывают исключительно с патогенезом психических и неврологических заболеваний, таких как болезнь Паркинсона и шизофрения.

Зарегистрированное нами изменение рецепторной плотности $ДА_2$-рецепторов в указанных областях мозга обученных крыс сопровождалось изменением содержания катехолов, измеренных одновременно с параметрами связывания [^{3}H] ДА. Так, во фронтальной коре, миндалине и гипоталамусе зарегистрировано появление больших количеств *n*-ТА (рис. 2, табл. 2), а в стриатуме—значительное увеличение его в сравнении с интактными животными (табл. 2). Вопрос взаимосвязи содержания *n*-ТА с функционированием ДА-рецепторов в литературе до сих пор не обсуждался. Обычно *n*-ТА относят к минорным симпатомиметическим биогенным аминам; его максимальное количество в тканях мозга крыс составляет не более 50 нг/г ткани [12]. Приведенные нами значения концентрации *n*-ТА в коре, миндалине, гипоталамусе и стриатуме сравнимы с содержанием ДА—основного биогенного амина. Это позволило нам предположить, что значительные количества *n*-ТА, появляющиеся в мозгу обученных крыс, могут быть связаны с функционированием дофаминовых рецепторов.

Принципиальная возможность нетрадиционного пути превращения ДА в *n*-ТА была показана нами в экспериментальной системе, где экзогенный ДА, предварительно инкубированный с мембранной фракцией ткани

Таблица 1

Параметры связывания [^{3}H] дофамина постсинаптическими $ДА_2$-рецепторами синаптических мембран различных зон мозга крыс интактных и после обучения условной реакции пассивного избегания (M±m, тестирование через 24 ч)

Область / параметры связывания	Кора n=30		Миндалина n=35		Гипоталамус n=30		Стриатум n=25	
	интактные	обучившиеся	интактные	обучившиеся	интактные	обучившиеся	интактные	обучившиеся
B_{max} фмоль/мг белка	25±1	56±2*	27±1	43±1,2*	21±0,8	40±1*	30±1	52±1,3*
K_i нМ	1,0±0,1	0,9±0,1	0,9±0,08	0,8±0,1	0,9±0,08	0,8±0,09	1,0±0,09	0,8±0,07

Примечание. *p<0,01 в сравнении с интактными животными, n-число животных.

Таблица 2

Содержание катехолов во фронтальной коре, миндалине, гипоталамусе, стриатуме мозга интактных крыс и при обучении условной реакции пассивного избегания (нг/г ткани, M±m)

Область / катехолы нг/г	Фронтальная кора		Миндалина		Гипоталамус		Стриатум	
	интактные n=12	обученные n=12	интактные n=9	обученные n=12	интактные n=12	обученные n=15	интактные n= 2	обученные n=15
ДОФА	1939±600	405±162*	—	—	3359±212	531±150*	4998±1000	836±205*
ДА	274±72	824±250*	244± 0	725±93	364±4·	624±87*	8000±930	1419±339*
n-ТА	н. д.	738±351	н. д.	565±158	н. д.	260±81	1024±300	4827±1239*
ДОФУК	72±30	65±33	167±96	1.6±74	143±35	142±35	840±150	70±7*
NA	1512±140	869±369	1134±330	966±288	2596±637	2083±512	503±140	523±156

Примечание. н. д.—нет детекции,— · не определяли; *p<0,05 по сравнению с интактными, n—число животных.

мозга обучившихся крыс, подвергался воздействию активных частиц (валентно-несвязанных электронов и радикалов ОН), генерируемых при микроразрядном электрорадиолизе раствора электролита. В продуктах воздействия детектировался *n*-ТА в значительном соотношении к введенному в систему 1 мМ ДА. В контрольных растворах ДА и ДА, преинкубированного с мембранами мозга интактных и необучавшихся крыс, в этих же условиях воздействия *n*-ТА не образовывался [22].

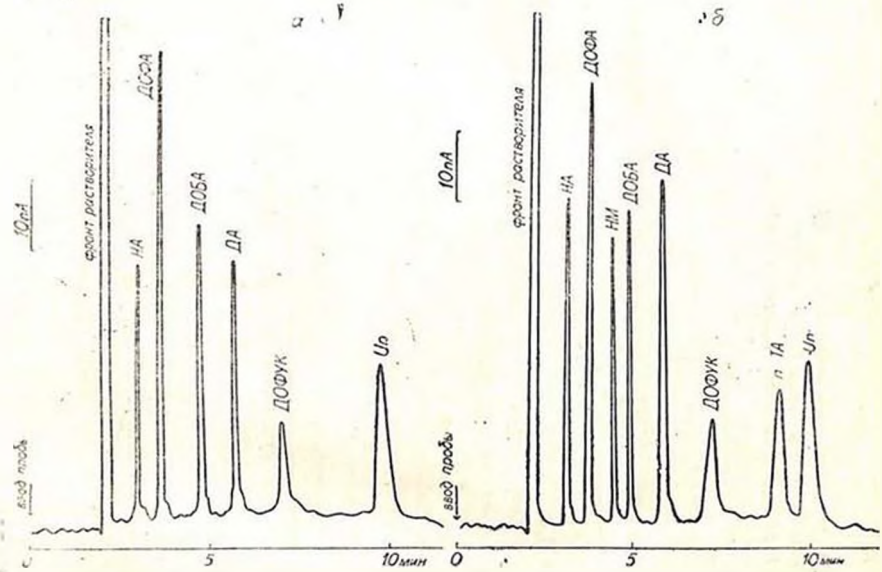

Рис. 2. Хроматограммы катехолов супернатантов гомогенатов фронтальной коры мозга: *а*—интактной крысы, *б*—после обучения условной реакции пассивного избегания.

Одновременно с появлением *n*-ТА в мозгу обученных животных были обнаружены изменения уровня ДА: достоверное увеличение его количества во фронтальной коре, миндалине и гипоталамусе и значительное снижение в стриатуме (табл. 2). Характер полученных изменений содержания ДА согласуется с литературными данными. Так, Gold и Welch обнаружили снижение уровня ДА в неостриатуме и повышение его в неокортексе при изучении регионарного содержания катехоламинов в мозгу крыс через 10 мин после выработки УРПИ [23]. Herman и соавт. показали возрастание уровня ДА в миндалевидном комплексе после обучения крыс УРПИ [24].

Следует добавить, что отсутствие тестирования через 24 ч после выработки УРПИ в наших экспериментах не изменяло содержания катехолов и параметров специфического связывания [^{3}H] ДА ДА-рецепторами во фронтальной коре, миндалине, гипоталамусе, стриатуме мозга крыс по сравнению с данными, полученными при тестировании.

Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что увеличение рецепторной плотности постсинаптических $ДА_2$-рецепторов, феномен появления *п*-ТА, изменение содержания ДА и достоверное снижение уровня ДОФА у обученных животных, связаны между собой и обуславливают процесс формирования следа памяти. Следовательно, участие постсинаптических $ДА_2$-рецепторов в нейрохимических механизмах обучения может приводить к изменению пути обычного метаболизма.

PARAMETERS OF [^{3}H] DOPAMINE BINDING BY DA_2-RECEPTORS OF SYNAPTIC MEMBRANES OF VARIOUS REGIONS OF THE RAT BRAIN AFTER CRPA LEARNING

PODGORNAYA E. K., GALKINA O. V., ILYUCHENOK R. Yu.

Institute of Physiology, Siberian Branch, USSR Academy of Medical Sciences, Novosibirsk

We have established that in animals subjected to training for the conditioned reflex of passive avoidance, CRPA (testing after 24 h) there was a marked increase in the receptor density of dopamine receptors in several brain regions including frontal cortex, amygdala, hypothalamus and striatum, as compared with naive animals. This phenomenon was accompanied by the appearance in brain tissue of marked levels of p-tyramine (p-TA). The level of dopamine (DA) markedly diminished in striatum and increased in the cortex, amygdala and hypothalamus. These data lead to a hypothesis about the direct involvement of postsynaptic DA_2-receptors in mechanisms of learning.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Kelly M. J.* Arch. Int. Pharmacodyn. Ther., v. 250, p. 18—29, 1981.
2. *Creese J.*—In: Proc. Amer. Coll. Neuropsychopharmacol., San Diego, p. 34, 1981.
3. *Nichicori K., Noshiro O., Sano K., Maeno H.* J. Biol. Chem., v. 255, № 22, p. 10909—10915.
4. *Leff S. E., Creese I.* Nature, v. 306, № 5943, p. 586—589, 1983.
5. *Seeman P., Titeler M., Tedesco J.* et al. Adv. in Biochem. Psychopharmacol, v. 19 p. 167—176, 1978.
6. *Morrol K., Hsu L. L.* J. of Neurosci. Res., v. 12, № 3, p. 113—128, 1984.
7. *Кругликов Р. И.*—В кн.: Нейрохимические механизмы обучения и памяти, с. 210, М., Наука, 1981.
8. *Ильюченок Р. Ю., Дубровина Н. И., Винницкий И. М.* Ж. В. Н. Д., т. 37, № 6, с. 1148—1153, 1987.
9. *Quartermain D.*—In The physiological basic of memory, p. 357—413. Acad. Press., 1983.
10. *Beatty W. W., Rush J. R.* Pharmacol. Behav., v. 18, № 3, p. 7—12, 1983
11. *Antsman H., Zacharko R. M.* Pharmacol. Biochem. and Behav., v. 17, № 2, p. 263—269, 1982.
12. *Lacer G. B., Dyck L. E.*—In: Neuromethods N. Y. The Humana Press, v. 2, p. 477—478, 1985.

13. *Phillips S. R., Davis P. A., Durden D. A., Boulton A. A.* Can. J. Biochem., v. 53, p. 65—69, 1975.
14. *Seeman P.* Pharmacol. Rev., v. 32, p. 229—287, v. 5, 1975.
15. *Jarvic M. E., Kopp R.* Psychol. Rev., v. 21, p. 221—224, 1967.
16. *Scatchard G.* Ann. N. Y. Sci., v. 51, p. 660, 1949.
17. *Sundberg D. K., Bennet B. A., Morris M.* Physiol. Rev., v. 58, № 905, p. 493—511, 1978.
18. *Handfield H. G., Crane P.* et al. J. of Liq. Chromatography, v. 8, p. 2689—2697, 1985.
19. *Sardar A., Juorio A. V., Boulton A. A.* Brain Res., v. 412, p. 370—374, 1987.
20. *Kaiser C., Jain T.* Medicinal Research Reviews, v. 5, p. 145—229, 1985.
21. *Ilyutchenok R. Yu. Dubrovina N. I., Podgornaja E. K., Galkina O. V.* The first Polish-Swedish symposium „Structure and Function in neuropharmacology", p 123, 1988.
22. *Подгорная Е. К., Галкина О. В., Поляков О. В.* Укр. биох. журн., т. 61, № 6, с. 27—31, 1989.
23. *Gold P. E., Welch K. A.* Behav. and Neural Biol., v. 47, № 2, p. 116—119, 1987.
24. *Herman J. P., Guillonneau D., Dantzer R. R.* et al. Life Sci., v. 30, p. 2207—2214, 1982.

Поступила 9. XI. 1989

C. U. M. SMITH. Elements of Molecular Neurobiology. J. Wiley and Sons, Battins Lane, Chichester, 538, 1989.

Элементы молекулярной нейробиологии

В восьмидесятые годы достигли очевидных успехов в понимании молекулярных основ нейробиологии. Молекулярный подход использован при изучении биологических мембран, белков, ионных каналов, элементов цитоскелета и нейроактивных пептидов. В настоящей книге сделана попытка свести воедино новые знания и показать, что молекулярный уровень исследований способствует выявлению процессов, происходящих в нервной системе в норме и патологии. Книга заинтересует специалистов, работающих в области фундаментальных и клинических нейронаук.

НЕЙРОХИМИЯ
т. 9, № 3, 1990

УДК 577.45:577.24

КИНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВЫСОКОАФФИННОГО ЗАХВАТА L-АСПАРАГИНОВОЙ КИСЛОТЫ СИНАПТОСОМАМИ ГОЛОВНОГО МОЗГА БЕЛЫХ КРЫС ПРИ СТАРЕНИИ

КНАРЯН В. А., АПРИКЯН Г. В.

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

Изучены возрастные изменения кинетических параметров высокоаффинного захвата L-аспарагиновой кислоты (Асп) синаптосомами головного мозга белых крыс. Показано, что величина K_m уменьшается при старении на 33%, а величина V—на 44,5%. Предполагается, что повышение сродства Асп к гипотетическому переносчику при относительно низкой скорости захвата носит компенсаторный характер, направленный на повышение синаптической активности Асп в старости. Изучение роли Na^+ в синаптосомном захвате Асп при старении показало, что при концентрациях Na^+ ниже физиологической скорость захвата Асп уменьшается у животных обеих возрастов. Установлено, что N-ацетил-L-аспарагиновая кислота (NAAсп) ингибирует синаптосомный захват Асп и L-глутаминовой кислоты (Глу) у молодых и старых животных в одинаковой степени, что позволяет рассматривать NAAсп в качестве перспективного регулятора синаптической активности Асп и Глу, особенно в старческом возрасте.

Одной из важнейших задач современной нейробиологии, и в частности нейрохимии, является изучение особенностей процесса передачи нервного импульса при старении и возможностей его регуляции физиологически активными веществами. За последние годы значительно возрос интерес к изучению различных сторон синаптической активности нейромедиаторных аминокислот (НМА)—их высвобождению из нервных окончаний, взаимодействию с соответствующими рецепторами и обезвреживанию посредством высокоаффинного захвата.

Известно, что Глу и Асп выполняют функцию возбуждающих медиаторов в ЦНС, а ГАМК—тормозящего [1]. Вслед за высвобождением медиаторов из нервных окончаний в синаптическую щель и их взаимодействием с соответствующими постсинаптическими рецепторами происходит инактивация медиаторов. Наиболее эффективным средством терминации синаптического действия НМА является их высокоаффинный Na^+-зависимый захват [2]. Высокоаффинная система захвата НМА показана для срезов, клеточных популяций и синаптосом головного мозга [3].

В предыдущих наших работах было показано, что интенсивность захвата НМА срезами и синаптосомами головного мозга значительно снижается при старении [4]. В литературе имеются подробные сведе-

ния относительно изменений кинетических параметров синаптосомного захвата Глу и ГАМК при старении [5, 6].

Целью настоящего исследования явился кинетический анализ синаптосомного захвата Асп при старении. Проведено также сравнительное изучение влияния Na^+ и нейроспецифического соединения NAAсп на захват Асп синаптосомами головного мозга молодых и старых белых крыс.

Материалы и методы

Исследования проводили на белых крысах (самках) популяции *Wistar* двух возрастных групп: молодые (3—6-месячные) и старые (24—26-месячные). Животных декапитировали, извлекали головной мозг, на холоде освобождали большие полушария от мозжечка и ствола и помещали в холодный раствор 0,32 М сахарозы. Синаптосомы получали по методу Hajos [7]. Конечный осадок синаптосом суспендировали в 0,32 М сахарозе.

Для определения захвата [^{14}C] Асп 0,1 мл синаптосомной суспензии (эквивалентной 100 мкг белка) инкубировали в 0,9 мл смеси, содержащей модифицированный буфер Кребса-Генселайта, [^{14}C] Асп в концентрациях $0{,}5 \cdot 10^{-6}$, 10^{-6}, $2 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-6}$ и $2 \cdot 10^{-5}$ М и АОУК (10^{-5} М) в качестве ингибитора трансаминирования. Состав модифицированного буфера Кребса-Генселайта (в мМ): трис-HCl буфер, pH 7,4—25, NaCl—127,2, KCl—5, $CaCl_2$—2,7, $MgSO_4$—1,3, глюкоза—11,1 [8].

Пробы инкубировали в атмосфере воздуха при постоянном встряхивании и температуре 37° в течение 5 мин. Реакцию останавливали добавлением 1 мл холодного буфера. Фракции осаждали центрифугированием при 4000 об/мин на К-23 (ГДР) в течение 15 мин при 4°, надосадочную жидкость отделяли, осадок промывали 3 мл холодного буфера, высушивали, растворяли диметилсульфоксидом и добавляли 10 мл сцинтилляционной жидкости Брея. Для определения радиоактивности в среде поглощения из каждой пробы брали 0,025 мл надосадочной жидкости. Радиоактивность измеряли на жидкостном спектрометре Intertechnique SL-4221 (Франция). Скорость захвата аминокислоты выражали в нмоль [^{14}C] Асп/мг белка фракции/5 мин.

При приготовлении Na-дефицитной среды NaCl замещали эквимолярным количеством трис-HCl буфера. Использовали NaCl в концентрациях 19; 27; 43; 80 и 127,2 мМ и [^{14}C] Асп в концентрации $5 \cdot 10^{-6}$ М.

При изучении влияния NAAсп на захват Асп и Глу инкубационная среда содержала [^{14}C] Асп ($0{,}35 \cdot 10^{-6}$ М) или [^{14}C] Глу ($0{,}5 \cdot 10^{-6}$ М), немеченую аминокислоту (10^{-5} М) и NAAсп (10^{-3} М). Степень захвата аминокислот выражали отношением числа распадов/мин/мг осадка фракции к числу распадов/мин/мкл среды поглощения.

Белок определяли по методу Lowry и соавт. [9] в модификации

Hess, Lewin [10]. Обработку полученных результатов проводили методом вариационной статистики Фишер-Стьюдента [11].

В работе использованы Трис (гидроксиаминометан), Асп, Глу, NAAcп (чистота 99,82%) и АОУК («Sigma», США). Использованы L-[U-[^{14}C] Асп] с удельной радиоактивностью 140 мКи/ммоль) (Чехословакия) и L-[U[^{14}C]Глу] с удельной радиоактивностью 200 мКи/ммоль (Чехословакия).

Результаты и обсуждение

Изучение захвата [^{14}C] Асп синаптосомами при старении показало, что скорость его при всех выбранных нами концентрациях субстрата заметно отстает у старых животных (рис. 1). Разница в скорости захвата [^{14}C] Асп у молодых и старых животных увеличивается

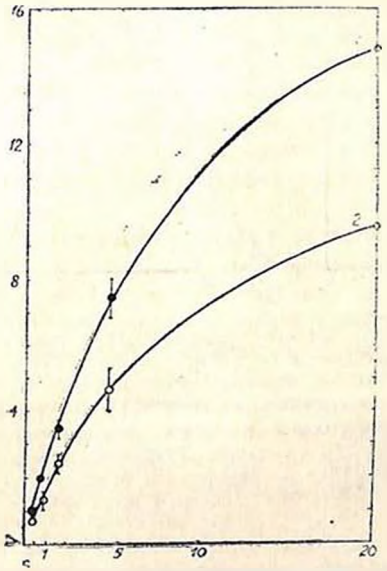

Рис. 1. Зависимость скорости захвата [^{14}C]Асп (V, имоль [^{14}C]Асп/мг белка/5 мин) синаптосомами головного мозга от концентрации субстрата (S, мкМ) у молодых (*1*) и старых (*2*) белых крыс. По оси абсцисс— концентрация [^{14}C]Асп (0,5, 1, 2, 5 и 20) в мкМ.

по мере увеличения концентрации субстрата в инкубационной среде. Так, при концентрации [^{14}C] Асп $0{,}5\times10^{-6}$ М скорость захвата у старых животных меньше, чем у молодых на 22,9%, а при концентрации $2\cdot10^{-5}$ М—на 35,3%.

Определение кажущихся величин K_m и V захвата [^{14}C]Асп синаптосомами при старении методом двойных обратных величин (рис. 2) показало, что с возрастом кинетические параметры захвата [^{14}C] Асп изменяются. Величина V захвата [^{14}C] Асп синаптосомами у молодых

животных составляет 20, а у старых—11,1 нмоль/мг белка/мин, т. е. величина V снижается с возрастом на 44,5%. Полученные нами результаты можно сравнить с данными, полученными Wheeler [6], согласно которым величины V захвата Глу и ГАМК синаптосомами головного мозга 30-месячных крыс меньше, чем 2-месячных соответственно на 28 и 14%.

Величина K_m синаптосомного захвата [^{14}C] Асп изменяется с возрастом, составляя у молодых животных 10, а у старых—6,7 мкМ, то

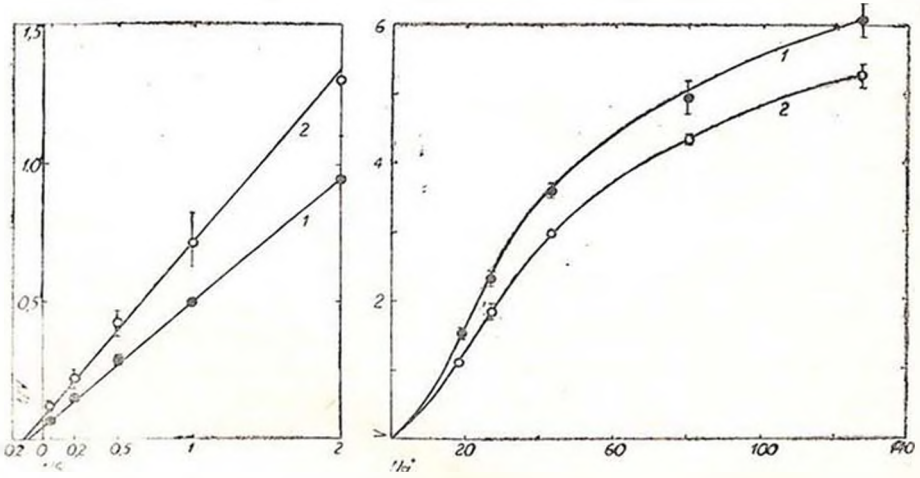

Рис. 2. Зависимость скорости захвата [^{14}C]Асп синаптосомами головного мозга от концентрации субстрата у молодых *(1)* и старых *(2)* белых крыс в двойных обратных координатах Лайнуивера-Берка

Рис. 3. Зависимость скорости захвата [^{14}C]Асп (V, нмоль[^{14}C]Асп/мг белка/5 мин) синаптосомами головного мозга от концентрации Na^+ (мМ) у молодых *(1)* и старых *(2)* белых крыс. Инкубационная среда содержала [^{14}C]Асп в концентрации 5 мкМ и Na^+ в концентрациях 19, 27, 43, 80 и 127,2 мМ.

есть величина K_m с возрастом уменьшается на 33%. Таким образом, при старении возрастает сродство субстрата к гипотетическому переносчику при относительно низкой скорости захвата. Для сравнения отметим, что величины K_m захвата ГК и ГАМК синаптосомами головного мозга крыс уменьшаются при старении соответственно на 10 и 8% [5, 6].

Таким образом, полученные нами данные об изменении кинетических параметров захвата Асп аналогичны результатам исследований Wheeler относительно захвата Глу и ГАМК и позволяют предположить, что при старении повышение сродства НМА к гипотетическому переносчику при относительно низкой скорости захвата носит компенсаторный характер, направленный на продление постсинаптического действия НМА на фоне их низкого уровня в старости.

Высокоаффинный захват НМА является энергозависимым процессом. Энергия, утилизируемая при транспорте НМА обеспечивается комбинированием натриевого ($[Na^+]_o > [Na^+]_i$) и калиевого ($[K^+]_i > [K^+]_o$) концентрационных градиентов [12]. Показано, что с каждой молекулой Асп, Глу или ГАМК, поступающей из синаптической щели в нервные окончания транспортируются два Na^+ [5, 6, 12, 13, 14]. Изучена роль Na^+ в синаптосомном захвате Глу и ГАМК как у молодых, так и у старых животных и показано, что при концентрациях Na^+ ниже физиологической, скорость захвата Глу и ГАМК уменьшается у животных обеих возрастных групп [5, 6].

В связи с вышеизложенным нам представлялось интересным изучить зависимость скорости захвата [^{14}C] Асп от Na^+ синаптосомами головного мозга белых крыс при старении. Результаты этих исследований представлены на рис. 3. Из рисунка видно, что скорость захвата [^{14}C] Асп синаптосомами головного мозга молодых животных падает по мере уменьшения концентрации Na^+ в инкубационной среде. Аналогичная зависимость наблюдается и в случае захвата [^{14}C] Асп синаптосомами головного мозга старых животных.

Зависимость захвата [^{14}C] Асп от концентрации Na^+ у обеих возрастных групп описывается одинаковыми кривыми сигмоидного характера.

Скорость захвата [^{14}C] Асп у старых животных отстает от скорости захвата у молодых при всех выбранных концентрациях Na^+, хотя по мере увеличения Na^+ в среде разница эта уменьшается.

Ранее нами было показано, что нейроспецифическое соединение NAAсп ингибирует нейронный, глиальный и синаптосомный захват Асп, а также синаптосомный захват Глу у животных молодого возраста [15]. Синаптосомный захват тормозящего медиатора ГАМК под влиянием NAAсп существенных изменений не претерпевал. Эти данные позволили сделать вывод об участии NAAсп в процессе синаптической передачи, осуществляемой возбуждающими НМА Асп и Глу на стадии терминации их действия в условиях *in vitro*.

Об участии NAAсп в синаптических процессах свидетельствуют также литературные данные. Так, показано, что NAAсп связывается с гидрофобной протеолипидной фракцией из коры мозга крыс, специфически связывающей Асп и Глу, а также ингибирует связывание Асп той же фракцией [16]. Гекчян и Априкяном [17] установлено, что NAAсп заметно стимулирует высвобождение Асп и Глу из синаптосом головного мозга как молодых, так и старых белых крыс, но не влияет на высвобождение ГАМК.

С целью изучения возможностей регуляции высокоаффинного захвата НМА в старческом возрасте нами было проведено сравнительное исследование влияния NAAсп на захват Асп и Глу синаптосомами головного мозга при старении. Проведенные исследования показали, что NAAсп подавляет захват Асп синаптосомами у молодых и старых животных соответственно на 54,7 и 54,8%, а захват Глу—соответствен-

но на 34,1 и 30,6% (таблица). Из полученных данных видно, что ингибирующее действие NAAcn на захват Асп и Глу синаптосомами проявляется одинаково у животных обеих возрастных групп.

Таблица

Захват L-аспарагиновой и L-глутаминовой кислот синаптосомами головного мозга белых крыс при старении (распад/мин/мг фракции на распад/мин/мкл среды). Влияние N-ацетил-L-аспарагиновой кислоты

Возраст животных	Асп		Глу	
	контроль	NAAcn	контроль	NAAcn
Молодые	38,63±5,24 (20)	4[illegible],15±2,87* (20)	98,9±3,9 (16)	65,2±3,2* (16)
Старые	60,21±4,66 (20)	27,2±2,3* (20)	74,4±4,2 (16)	52,4±3,5* (16)

Примечание. *$p<0{,}001$ по отношению к контролю.

Следует отметить, что полученные в этих экспериментах данные о снижении интенсивности синаптосомного захвата Асп и Глу при старении, составляющие соответственно 32,2 и 24,7%, согласуются с результатами, полученными ранее в нашей лаборатории [4].

Таким образом, как показали наши исследования, NAAcn является перспективным соединением для направленного регулирования синаптического действия возбуждающих НМА, особенно в старческом возрасте.

KINETIC ANALYSIS OF HIGH AFFINITY L-ASPARTIC ACID UPTAKE BY RAT BRAIN SYNAPTOSOMES DURING AGING

KNARYAN V. A., APRIKYAN G. V.

Buniatian Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Armenian Republic, Yerevan

We studied the high-affinity uptake of L-aspartic acid (Asp) by synaptosomes from aged (24—36 months old) rats as compared with synaptosomes isolated from young (3—6 months old) animals. K_m decreased by 33% and V_{max} by 44.5% with aging. We suggest that the increased affinity of Asp to a hypothetical carrier at a relatively low uptake rate is a compensatory response of the nervous system leading to stabilization of the synaptic function in old animals. Both in young and old rats the uptake of Asp by brain synaptosomes was dependent on the presence of Na^+ in the medium. N-acetyl-L-aspartic acid inhibited the high-affinity uptake of Asp and Glutamate by brain synaptosomes from either young or old rats.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Curtis D. R., Johnston G. A. R.* Ergebn. Physiol., v. 69, p. 94—188, 1974.
2. *Iversen L. L.* Brit. J. Pharmacol., v. 41, № 4, p. 571—591, 1971.
3. *Fagg G. F., Foster A. C.* Neuroscience, v. 9, № 4, p. 701—719, 1983.
4. *Априкян Г. В., Шагинян В. А., Мкртчян Г. А., Паронян Ж. А., Кнарян В. А., Ахвердян Э. С.* Физиол. журн. СССР, т. 30, № 1, с. 69—73, 1984.
5. *Wheeler D. D.* Exp. Gerontol., v. 15, № 4, p. 269—284, 1980.
6. *Wheeler D. D.* Exp. Gerontol., v. 17, № 1, p. 71—85, 1982.
7. *Hajos F.* Brain Res., v. 93, № 3, p. 485—489, 1975.
8. *Wheeler D. D.* J. Neurochem., v. 33, № 4, p. 883—894, 1979.
9. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* J. Biol. Chem., v. 193, № 2, p. 265—275, 1951.
10. *Hess H. H., Lewin E. J.* Neurochem., v. 12, № 3, p. 205—211, 1965.
11. *Одвин И. А.* Патол. физиология и эксперим. терапия, т. 4, с. 76—85, 1960.
12. *Erecinska M., Wantorsky D., Wilson D. F.* J. Biol., Chem., v. 258, № 15, p. 9069—9077, 1983.
13. *Stallcup W. B., Bulloch K., Baetge E. E.* J. Neurochem., v. 32, № 1, p. 57—65, 1979.
14. *Martin D. L., Smith A. A.* J. Neurochem., v. 19, № 3, p. 841—855, 1972.
15. *Априкян Г. В., Кнарян В. А., Шагинян В. А., Ахвердян Э. С.* Нейрохимия, т. 6, № 1, с. 71—76, 1987.
16. *Burgal M., Lisondo J., Jordá A., Grisolia S.* Neurochem. Res., v. 9, № 2, p. 219—224, 1984.
17. *Гекчян К. Г., Априкян Г. В.* Тезисы докл. 10-й всесоюзн. конф. по биохимии нервной системы: «Фундаментальные достижения нейрохимии—медицине», с. 179—180, Горький, 1987.

Поступила 29. VI. 1990

НЕЙРОХИМИЯ
т. 9, № 3, 1990

УДК 577.17.08

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ ГИПОТАЛАМИЧЕСКИХ КАРДИОАКТИВНЫХ БЕЛОК-ГОРМОНАЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ В МИКРОСТРУКТУРАХ МОЗГА КРЫС

АБРАМЯН С. С., *ЧИЛАГ А., СРАПИОНЯН Р. М.,
**МЕСРОПЯН Н. Г., ГАЛОЯН А. А.
Институт биохимии им. Г. Х. Буниятяна АН Армении, Ереван
* I Институт анатомии Земмельвейсского университета, Будапешт
** Институт экспериментальной биологии АН Армении, Ереван

Локализация белка-носителя гипоталамического коронарорасширяющего гликопептида—нейрогормона Г (БНГ), изолированного и характеризованного ранее, была обнаружена в мозгу крыс по иммуноцитохимическому методу. В наших экспериментах обнаружены два типа иммуноокрашенных структур. К первому типу относятся глиальные элементы, вероятнее всего соответствующие астроцитам; бергмановская глия и клетки в перивентрикулярных органах. Меченые глиоциты широко распространены в мозгу, но клетки Pyriform cortex окрашиваются сильнее, чем клетки других корковых отделов. Перивентрикулярная и супраоптическая части гипоталамуса содержат БНГ—иммунопозитивные клетки, которые, вероятнее всего, являются глиальными, но их характеристика пока нами не уточнена. Второй тип—это варикозные и извилистые отростки чисто нейронального характера часто связаны с телами мультиполярных клеток. Этот тип мечения ограничен двумя ядрами вентрального миндалевидного тела, кортикального ядра и ядра бокового обонятельного тракта. Иммуноокраска против БНГ не давала перекрестную реакцию с глиальным фибриллярным кислым белком (ГФКБ) и отчетливо отличалась от иммунометки, наблюдаемой с антисывороткой против предсердно-натрийуретического пептида (ПНП). Остается выяснить, представляют ли эти два типа иммуноокраски отдельные антигены.

Возможно, глиальный компонент указывает на роль этих клеток в захвате нейрогормона Г из (или в высвобождении в) общей циркуляции. Также обсуждается возможная связь между БНГ и другими кардиоактивными пептидами, обнаруженными ранее в миндалевидном теле (нейротензин, FMRF-amide—кардиоактивный пептид моллюска).

В 1964 г. в магноцеллюлярных ядрах гипоталамуса быка был обнаружен специфический белок, обладающий коронарорасширяющим

свойством [1]. В дальнейшем указанный белок был дифференцирован на три белка (гликопротеина), с аналогичным направлением действия [2—4]. Эти белки были не только носителями [5] ранее открытых Галояном коронарорасширяющих гипоталамических гликопептидов К, С и Г [6], но и предшественниками указанных соединений [7, 8].

По принципу сродства с соответствующими нейрогормонами К, С и Г они были названы БНК, БНС и БНГ. Как было установлено, белки-носители являются N-гликозидносвязывающими, маннозобогатыми гликопротеинами с M_r от 20 до 39 кД [7]. В предыдущих работах [9, 10] удалось продемонстрировать радионммунологическим методом преимущественное их содержание в синаптосомах (70%) и в нейросекреторных гранулах магноцеллюлярных ядер гипоталамуса (30%). Однако гистологическая локализация этих комплексов не установлена.

Учитывая вышесказанное, представлялось интересным проведение иммуногистохимических исследований для выяснения распределения одного из этих комплексов (БНГ) в различных микроструктурах мозга, что и явилось целью настоящей работы.

Материалы и методы

Выделение и очистка антигена. Из гипоталамуса крупного рогатого скота путем рефракционирования высаливанием сернокислым аммонием в пределах насыщения 0,3—0,4 выделили кардиотропные водорастворимые белки. Смеси высоленных белков подвергали диализу против дистиллированной воды, затем против веронал-мединалового буфера, pH 7,8, и лиофилизировали. Дальнейшее фракционирование и очистку полученного лиофилизата проводили по общепринятой в нашей лаборатории схеме [6]: 1—гель-фильтрация на колонке (3×50 см) с сефадексом G-100, уравновешенным борно-боратным буфером (pH 8,0) со скоростью 50 мл/ч; 2—ИОХ на колонке (3×50 см) с ДЕАЕ-ц, уравновешенная 0,005 М фосфатным буфером (pH 6,5), с помощью градиентной элюции (0,02—0,5 М NaCl) со скоростью 40 мл/ч с небольшим понижением pH (6,5—5,0); 3—рехроматография на колонке (1,5×30 см) с ДЕАЕ-ц со скоростью 30 мл/ч.

Спектры поглощения снимали в УФ-области 280 нм на спектрофотометре «Unicum SP-800» и «СФ-26А».

Биологическую активность определяли измерением объемной емкости крови, оттекающей из коронарного синуса кошки за единицу времени под уретановым наркозом [11].

Получение антитела. Антисыворотку против БНГ получили по следующей схеме [12]: лиофилизированный БНГ (1 мг/0,2 мл буфера) смешивали до получения гомогенной эмульсии с 0,2 мл полного адъюванта Фрейнда и вводили равными порциями в область обоих подколенных лимфоузлов задних конечностей кроликов. Повторную иммунизацию проводили через месяц после первого ввода по

0,4 мл свежеприготовленной эмульсии (1 мг/мл буфера) в область левого подколенного лимфоузла и внутримышечно с правой стороны, а также 0,2 мл—в ушную вену. Отбор крови после иммунизации проводили из ушной вены на 7-, 9-, 11-й дни.

Специфичность антисыворотки проверяли иммунодиффузией, в результате которой иммунопреципитация против БНГ-антигена имела место при разбавлении 1 : 16, но при замещении БНГ-антигена БНК и БНС антигенами преципитацию не обнаружили. В очищенном БНГ-антигене по процедуре RIA [13] не возникала активность предсердно-натрийуретического фактора, основанного на определении 28 АА предсердно-натрийуретического пептида крыс (K. Racz, Земмельвейсский университет медицины, личное сообщение).

Иммуногистохимия. Взрослые крысы линии Альбино обоих полов умерщвлялись перфузией через левый желудочек сердца фиксатором Замбони (содержащий 4%-ный параформальдегид и 0,4%-ную пикриновую кислоту в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7.4), что следовало сразу же за промывкой физиологическим раствором. Мозги извлекались из черепа с последующей фиксацией в том же фиксаторе в течение ночи и промывали несколько раз 0,1 М фосфатным буфером Изготовлены свободноплавающие 50—60 мкм срезы: фронтальные—из выбранных областей мозга на вибротоме и поперечные—из предсердий сердца на фригомате и криостате. Для иммуногистохимии был применен немеченый антитело-ферментный метод [14]. Фоновая пероксидазная активность подавлялась инкубацией срезов в 1%-ной перекиси водорода 5—10 мин. Неспецифическое связывание антител блокировалось 20%-ной нормальной козьей сывороткой. В различных экспериментах были использованы следующие первичные антитела: анти-БНГ(полученный по вышеописанному методу 1 : 1000 и 1 : 20000; анти—ГФКБ 1 : 1600; анти-вазопрессин (полученный по G. Trani, INSERM 156 Lille, любезно предоставленный доктором T. Wenger) 1 : 5000; антисыворотка против предсердно-натрийуретического фактора сердца крыс—ПНФ (Gutkowska et al. 1984, любезно предоставленная доктором K. Rácz) 1 : 1000. Инкубация срезов в первичных антителах длилась 48 ч. Контрольные срезы инкубировали в присутствии нормальной кроличьей сыворотки (1 : 1000 разбавление) без первичного антитела. В качестве вторичного антитела использовался козий анти-кроличий Ig („Human" Serological Company, Венгрия, 1 : 30 разбавление) 1,5 ч, после чего срезы подвергались воздействию кроличьего пероксидаз-антипероксидазного комплекса (DAKOPATTS, 1 : 80 и 1 : 100) 1 ч и проявлялись 2,4-диаминобензидином („Sigma" США,) в качестве хромогена (0,05%) в присутствии 0,03% H_2O_2.

Результаты исследования

В наших экспериментах были обнаружены две формы иммуноокраски против БНГ. Первая форма соответствует общей окраске в астроцитах. При высоких титрах антисыворотки против БНГ выявля-

ются в основном глиальные клетки (астроциты) во всех исследованных областях мозга, включая кортикальные области (рис. 1), бергмановскую глию в мозжечке (рис. 2), перивентрикулярные органы (рис 4) и гипоталамические области (рис. 5). Из кортикальных областей самая сильная окраска в pyriform cortex-е. При низкой концентрации антисыворотки БНГ-подобная иммунореактивность, вероятно, ограничивается глиальными клетками гипоталамической области, преимущественно в перивентрикулярной зоне и вентрамедиальных областях (рис. 5), а глиальные волокна и несколько тел клеток всегда проявляют иммунореактивность также в супраоптическом ядре (рис. 7) и субфорникальном органе (рис. 4).

При преабсорбции БНГ-антисыворотки с БНГ-антигеном (100 мкг на мл антисыворотки) или при замещении БНГ-антисыворотки нормальной кроличьей сывороткой перикарион астроцитов не выявлялся.

Выявление и распределение астроцитов БНГ-антисывороткой имеет сходство с таковыми в присутствии антисыворотки глиального фибриллярного кислого белка, но, в отличие от БНГ-иммунореактивности окраска с ГФКБ не исчезала при преабсорбции антисыворотки к ГФКБ с БНГ-антигеном. Также интересно отметить, что в то время как обычно ГФКБ хорошо окрашивает радиально расположенные отростки бергмановской глии без какой-либо значительной окраски перикариона этих клеток, иммунопероксидазный конечный продукт окраски БНГ выявляется в основном в перикарионе бергмановской глии (рис. 2).

В соответствии с различиями между астроглиальными формами различных областей мы наблюдали перикапиллярные формы с типичными окончаниями (рис. 3), протоплазматические или волокнистые астроциты с хорошо развитой системой отростков (рис. 1). В супраоптическом ядре можно ясно различить маленькие БНГ-позитивные клетки, в ряде случаев наделенные длинными и прямыми отростками, которые едва заметны среди слабых контуров крупных неокрашенных, но вазопрессин-позитивных клеток (рис. 6, 7). В участках наиболее устойчивого БНГ-мечения (вентральные и перивентрикулярные гипоталамические области) размер и распределение иммунопозитивных клеток напоминает типичную астроглию. Однако точная характеристика этих клеток остается необъяснимой. Глиальные клетки, напоминающие астроциты, часто давали иммунометку с БНГ также в белом веществе.

БНГ-подобная иммунореактивность обнаруживалась также в тонких и извилистых волокнах с объемистой варикозностью и в нескольких маленьких полигональных или веретенообразных перикарионах (рис. 8, 9). Иногда мы наблюдали тела клеток в явном контакте с этими варикозными волокнами (рис. 9). Эта форма, чисто нейрональная, наблюдалась нами в ядре бокового обонятельного тракта (ОТ) и по краям кортикального амигдалоидного ядра (КАЯ). Подобно глиальному компоненту, этот тип иммуноокрашивания также исчезает при преабсорбции антисыворотки против БНГ со своим ан-

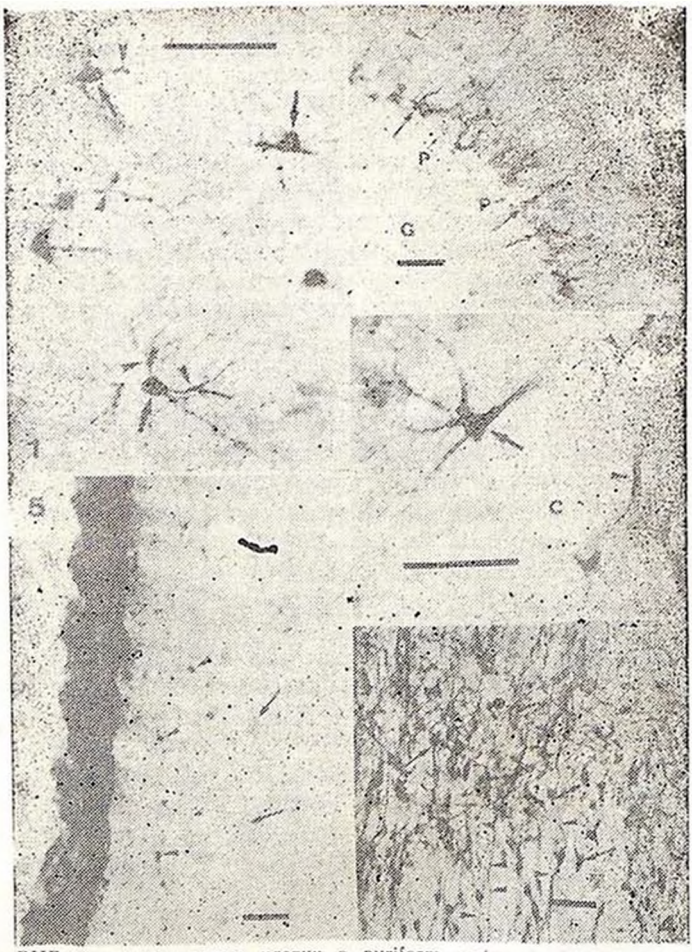

Рис. 1. БНГ-иммунопозитивные клетки в pyriform cortex с перикарионом овальной или неправильной формы (стрелки). Тонкие отростки без определенной пространственной ориентации с множественными разветвлениями (головки стрелок). Эти клетки напоминают астроциты. Масштаб: 50 мкм

Рис. 2. БНГ-иммунопозитивные структуры в мозжечке. Слабо окрашенные тела клеток в местах, соответствующих бергмановской глии (стрелки), с сильно окрашенными длинными и прямыми радиально направленными волокнами, которые заполняют всю ширину молекулярного слоя (головки стрелок). Клетки Пуркинье (P) и зернистый слой (G) лишены иммунопреципитации. Масштаб: 100 мкм

Рис. 3. БНГ-иммунопозитивная клетка с множеством отростков вокруг сосуда (стрелка). Видны также тонкие волокна, напоминающие отростки астроцитов (головки стрелок) вблизи капилляра (C). Масштаб: 50 мкм

Рис. 4. Субфорникальный орган содержит густую сеть БНГ-иммунопозитивных тел клеток и волокон. Тела клеток (стрелки) веретенообразной формы, с длинными и тонкими, параллельно расположенными отростками (головки стрелок). Масштаб: 100 мкм

Рис. 5. БНГ-иммуноокраска в перивентрикулярной области третьего желудочка. Среди слабых контуров иммуноотрицательных тел клеток (стрелки) проявляются темноокрашенные БНГ-иммунопозитивные, напоминающие глию клетки неправильной формы со множеством отростков (головки стрелок). Отмечается сильная окраска субэпендимальной зоны. Масштаб: 100 мкм

тигеном. В вышеуказанных областях варикозные волокна были обнаружены даже при использовании наиболее низкой концентрации антисыворотки.

В срезах ЦНС нам не удалось выявить окрашенные глиальные или нейрональные структуры с использованием анти- ПНФ, примененного в условиях, подобных иммуноокраске с анти-БНГ. Это же антитело проявило специфичную гранулярную окраску в кардиомиоцитах предсердия на срезах, полученных из сердца крыс (не демонстрировано).

Обсуждение результатов

Наличие БНГ-подобной иммунореактивности во множестве глиальных клеток свидетельствует о том, что это вещество довольно широко распространено в ЦНС. Гипоталамическая перивентрикулярная локализация БНГ (наиболее похожая на глиальную, хотя природа типов этих клеток точно не установлена) соответствует предыдущим данным, полученным радиоиммунным способом [9]. Наличие БНГ-иммунопозитивных клеток в одном из магноцеллюлярных гипоталамических ядер (супраоптическое ядро) также было подтверждено в данной работе. Здесь также клетки напоминают глию, но их тип не уточнен, и не исключено, что они являются мелкими нейронами.

Преабсорбция антисыворотки с БНГ-антигеном показывает, что наблюдаемая иммуноокраска соответствует очищенному БНГ-антигену и не дает перекрестной реакции с глиальным фибриллярным кислым белком (хорошо известный астроглиальный маркер) [15, 16], несмотря на то, что большинство БНГ-иммунопозитивных глиальных клеток имеет четкий вид астроцитов. По представленным данным связь с другими компонентами, описанными ранее [17—19] как маркеры глии (S-100, 14-3-2) также не может быть установлена. БНГ может быть представлен как интегральный состав нейроглии (вероятно, астроглии) во многих областях мозга.

Наше внимание привлекает возможная роль БНГ в глиальных клетках. Другая интересующая нас проблема следующая: синтезируется ли это вещество в глиальных клетках или первоначально аккумулируется ими? В последнем случае глиоциты, которые контактируют с перикапиллярной средой, способны всасывать белок-гормональные комплексы, в частности БНГ, из циркулирующей крови. Наличие БНГ-подобной иммунореактивности в циркумвентрикулярных органах, как показано в данной работе, свидетельствует о возможности высвобождения БНГ из мозга в общую циркуляцию [9].

БНГ-антиген явно лишен иммуногистохимически определенной ПНФ активности, хотя из-за существования множества различных атриопептинов, этот вывод должен быть интерпретирован с осторожностью. ПНФ представлен во многих структурах ЦНС, включая гипоталамические перивентрикулярные области [20] но он большей частью находится в нейронах, а не в глии. При использовании при-

Рис. 6. Вазопрессин-иммунопозитивные клетки в супраоптическом ядре. Выделяются сильно окрашенный перикарион с толстыми проксимальными дендритами (стрелки) и густое сплетение варикозных волокон (головки стрелок). Масштаб: 50 мкм

Рис. 7. БНГ-иммунопозитивные структуры в супраоптическом ядре. На фоне крупных иммуноотрицательных клеток (звездочки) видны интенсивно окрашенные мелкие клетки с отдельными длинными и тонкими отростками (головки стрелок). Масштаб: 50 мкм

Рис. 8. БНГ-иммунопозитивные варикозные волокна в ядре бокового обонятельного тракта. Некоторые из этих волокон представлены в виде извилистых петель (стрелки). Масштаб: 100 мкм

Рис. 9. Увеличение микрофотографии БНГ-иммунопозитивных волокон и тел клеток в ядре бокового обонятельного тракта. Показаны мультиполярные тела клеток (стрелки) с тонкими окончаниями, некоторые из которых явно контактируют со сравнительно крупными варикозностями (головки стрелок). Масштаб: 50 мкм

меняемой нами антисывороткой против ПНФ иммунопозитивные к ПНФ структуры в ЦНС не обнаружены, но с этой же антисывороткой обнаружена характерная окраска кардиомиоцитов предсердия. Таким образом, БНГ-подобная иммунореактивность в ЦНС отличается от ПНФ.

БНГ-иммунопозитивные тела клеток и отростки в ОТ и КАЯ миндалевидного тела представляют чисто нейрональный компонент распределения БНГ. Окраска кажется совершенно специфичной для этих ядер, и вид извилистых варикозных волокон подобен другим пептидсодержащим структурам. Мы полагаем, что еще рано приписывать какие-либо специфические функции БНГ в миндалевидном комплексе, но интересно отметить, что возможная функциональная связь между этой областью и сердцем описана в литературе [21]. Более того, наличие других различных нейропептидов продемонстрировано в вышеуказанных миндалевидных ядрах [22]. В частности, обнаружены нейропептиды с известным кардиоваскулярным эффектом, такие как нейротензинсодержащие волокна в ОТ и КАЯ, нейротензинпозитивные клетки только в КАЯ и FMRF-amide-позитивные волокна в КАЯ [23—27]. Предположение о возможной связи между этими кардиоактивными пептидами и БНГ требует дальнейших исследований.

Хотя БНГ-антиген первоначально получен из гипоталамуса, анатомическая близость центрального миндалевидного тела наводит на мысль, что возможную часть этого ядерного комплекса могли препарировать с тканями, взятыми для приготовления антигена. В данном случае пептидный компонент, узнаваемый антисывороткой БНГ, вероятно, первоначально образуется в миндалевидном теле, представляющем или сам БНГ, или, возможно, родственный пептид, не идентичный с БНГ.

Авторы признательны др. T. Wenger (II Институт анатомии Земмельвейсского университета медицины, Будапешт) за любезное предоставление антисыворотки к вазопрессину, K. Rácz (Клиника терапии внутренних органов, Земмельвейсский университет) за предоставление анти-ПНФ, проф. M. Palkovits и д-ру M. Kálman (I Институт анатомии, Земмельвейсский университет) за ценные обсуждения, M. Szász за проявленную техническую помощь.

IMMUNOHISTOCHEMICAL LOCALIZATION OF HYPOTHALAMIC CARDIOACTIVE PROTEIN-HORMONAL COMPLEXES IN RAT BRAIN MICROSTRUCTURES

ABRAMYAN S. S., *CSILLAG A., SRAPIONYAN R. M., **MESROPYAN N. G., GALOYAN A. A.

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Armenian Republic, Yerevan,
*First Department of Anatomy, Zemmelweis University of Medicine, Budapest, Hungary
**Institute of Experimental Biology, Academy of Sciences of the Armenian Republic, Yerevan

Localization of the protein carrier of a coronarydilating hypothalamic glycopeptide, „neurohormone G" (PCG)isolated and characterized previously, was described in rat brain by immunochemical method. Two types of structures were immunostained in our material: (1) glial elements most probably corresponding to astrocytes, Bergmann glia and cells of circumventricular organs. Glial labeling was widespread in the brain, although cells of pyroform cortex appeared to be more affected than those of other cortical regions. Periventricular and supraoptic regions of hypothalamus contain PCG immunopositive cells, which are most probably glial but their characterization is as yet ambiguous. (2) Varicose and tortuous fibres of clearly neuronal character, often in association with multipolar cell bodies. This type of labeling was confined to two nuclei of ventral amygdala, the cortical nucleus and the nucleus of the lateral olfactory tract. Immunostaining against PCG did not cross-react with glial fibrillary acidic protein and it differed distinctly from the immunolabeling observed with an antiserum against atrial natriuretic peptide. It remains to be elucidated whether the two types of immunostaining represent a single antigenic epitope. The glial component may be indicative of a role of these cells in the uptake from (or release into) general circulation of neurohormone G. The possible connection between PCG and other cardioactive peptides found previously in amygdala (neurotensin, FMRFamide) is also discussed.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Галоян А. А.* Докл. АН АрмССР, т. 38, № 5, с. 305—307, 1964.
2. *Галоян А. А., Срапионян Р. М.* Докл. АН АрмССР, т. 32, № 4, с. 210—213, 1966.
3. *Галоян А. А., Срапионян Р. М., Геворкян Г. Г.* Биол. журн. Армении, т. 20, № 4, с. 3—8, 1967.
4. *Галоян А. А., Срапионян Р. М., Алексанян Р. А.* Докл. АН АрмССР, т. 51, № 2, с. 125—128, 1970.
5. *Срапионян Р. М., Джамбазян Т. А., Галоян А. А.* Вопр. биохимии мозга. Изд. АН АрмССР, т. 6, с. 157—160, 1970.
6. *Галоян А. А.* Изв. АН АрмССР, т. 16, № 4, с. 3—18, 1963.
7. *Срапионян Р. М.* Нейрохимия, т. 6, № 1, с. 109—116, 1987.
8. *Срапионян Р. М., Саакян С. А., Галоян А. А.* Вопр. биохимии мозга, Изд. АН АрмССР, т. 11, № 17, с. 97—104, 1976.

9. *Срапионян Р. М., Абелян Ж. Г., Галоян А. А.* Вопр. мед. химии, т. 31, № 2, с. 20—24, 1985.
10. *Срапионян Р. М., Саакян С. А., Саакян Ф. М., Галоян А. А.* Вопр. биохимии мозга, т. 13, с. 67—68, 1979.
11. *Morawitz P. Z., Zahn A.* Deutsch. Arch. Klin. Med., v. 116, p. 364—367, 1914.
12. *Амброзиус Х.*—В кн.: Иммунологические методы (под ред. Г. Фримеля), М., Медицина, с. 14—15, 1987.
13. *Gudkowska J., Horky K., Thibault G., Januszewicz P., Cantin M., Genest J.* Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 125, p. 315—325, 1964.
14. *Sternberger L. A., Hardy P. H. Jr., Cuculis J. J. Meyer H. G.* J. Histochem. Cytochem., v. 18, p. 315—333, 1970.
15. *Bignami A., Dahl D., Rueger D. C.*—In: Adv. Cell. Neurology, (eds. S. Feodoroff, L. Hertz), v. 1, p. 286—313, New York, Akad. Press, 1980.
16. *Eng L. F., Vanderhaegen J. J., Bignami A., Gerstl B.* Brain Res., v. 28, p. 351—354, 1971.
17. *Hyden H., Mcewen B. S.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci., v. 2, p. 354—358, 1966
18. *Moore B. W., Perez V. J., Gehring M.* J. Neurochem., v. 15, p. 265—272, 1968.
19. *Rende M., Zucco M., Cocciha D., Michetti F.* Proc. 8th Meeting Int. Soc. Neurochem., Nottingham, UK, p. 70, 1981.
20. *Standaert D. G., Needleman P., Saper C. B.* J. Comp. Neurol., v. 253, p. 315—341, 1986.
21. *Савенко Л. Д.* Журн. эксперим. и клин. мед., т. 26, № 2, с. 119—123, 1986.
22. *Palkovits M.*—In: Frontiers in Neuroendocrinology, (eds. L. Martini, W. F. Ganong), v. 10, p. 1—44, New York, Raven Press, 1988.
23. *Emson P. C., Goedert M., Horsfield P., Rioux F., Pierre S. St.* J. Neurochem., v. 38, p. 992—999, 1982.
24. *Jennes L., Stumpf W. E., Kalivas P. W.* J. Comp. Neurol., v. 210, p. 211—224, 1982.
25. *Roberts G. W., Woodhams P. L., Polak m J. M., Crow T. J.* Neuroscience, v. 7, p. 99—131, 1982.
26. *Weber E., Evans C. J., Samuelsson S. J., Barchas J. D.* Science, v. 214, p. 1248—1251, 1981.
27. *Williams R. G., Dockray G. J.* Brain Res., v. 276, p. 213—229, 1983.

Поступила 16. IV. 1990

НЕЙРОХИМИЯ
т. 9, № 3, 1990

УДК 616.895

О ВЗАИМОДЕЙСТВИИ ФОСФОГЛИЦЕРАТМУТАЗЫ И ЕНОЛАЗЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА

НАЗАРЯН К. Б., ЕГОРЯН Р. У., КАЗАРЯН Б. А.

Институт экспериментальной биологии АН Армении, Ереван

Изучено взаимодействие фосфоглицератмутазы (ФГМ) и енолазы головного мозга быка в условиях, приближенных к физиологическим. Показано, что енолазная активность экстракта водорастворимых белков подавляется в присутствии очищенной ФГМ. При добавлении других гликолитических ферментов вместо ФГМ такой эффект не наблюдался.

Полученные результаты подтверждают предыдущие данные о комплексообразовании нейроспецифической енолазы и ФГМ.

В настоящее время накоплено большое количество экспериментальных данных, свидетельствующих о взаимодействии и взаиморегуляции гликолитических ферментов *in vitro* [1—3]. Для выявления подобных взаимодействий разработан ряд следующих подходов: определение флуоресценции анизотропии, аналитическое ультрацентрифугирование, кинетические методы и т. д. [4—7]. В результате этого выявлена способность к образованию надмолекулярных комплексов с новыми свойствами для пар: глицеральдегидфосфатдегидрогеназа—альдолаза, фосфоглицерат киназа—глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа и других, очищенных из скелетных мышц и дрожжевых клеток [1, 8, 9]. Кроме того, в литературе имеются предположения об организации гликолитических ферментов в надмолекулярные структуры более высокого порядка, включающих кроме ферментов и другие элементы (мембраны, структуры цитоскелета) [10]. Способность к взаимодействию гликолитических ферментов головного мозга практически не изучена. Однако они, на наш взгляд, представляют в этом отношении значительный интерес, во-первых, потому, что мозговая ткань сильно зависит от аэробного гликолиза, который является практически единственным источником энергии. Следовательно, образование надмолекулярных комплексов с новыми свойствами регуляции гликолиза может иметь первостепенное значение для всего энергетического метаболизма ЦНС. Вторая причина заключается в том, что ряд гликолитических ферментов нервной ткани имеет специализированные, мозгоспецифические изоферменты, например, альдолаза C_4, нейроспецифическая енолаза (НСЕ), которые, вероятно, отражают особенности этого метаболического пути в ЦНС [11, 12]. Поэтому

сравнительное изучение нейроспецифических форм и изоферментов, представленных в остальных тканях на возможность образования фермент-ферментных комплексов представляется нам весьма перспективным для понимания функциональной значимости обнаруженных *in vitro* взаимодействий. В настоящей работе, которая является продолжением недавно опубликованного сообщения об образовании комплексов между ФГМ и НСЕ [13], предпринята попытка изучить специфичность взаимодействия указанных ферментов в условиях, приближенных к физиологическим.

Материалы и методы

В работе использованы НСЕ, ФГМ из мозга быка, очищенные по методикам, описанным ранее [14, 15]. Экстракт водорастворимых белков получали гомогенизацией тканей головного мозга быка в соотношении 2 : 1 (объем/масса) в 10 мМ трис-HCl, pH 7,5 с 0,14 М NaCl (буфер «А» и центрифугированием при 100000 g 30 мин. Использовали БСА, альдолазу и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (обе из мышц кролика) фирмы «Serva» (ФРГ), дрожжевую гексокиназу фирмы «Ferak» (ФРГ), 2-фосфоглицерат фирмы «Bochringer» (ФРГ). Енолазную активность в прямой реакции определяли на спектрофотометре М-40 («Carl Zeiss», ГДР) при 240 нм по приросту содержания продукта—фосфоенолпирувата [16]. Активность определяли в термостатированных при 37° кюветах объемом 0,6 мл. При тестировании проб, содержащих ФГМ или другие белки, до запуска реакции субстратом в течение 5 мин проводили инкубацию при 37°. Препараты ФГМ, альбумина, альдолазы и гексокиназы обладали менее 0,1% от енолазной У.А. Белок определяли по Bradford [17].

Результаты и обсуждение

В предыдущей работе нами показано, что НСЕ и ФГМ образуют комплекс, в результате чего енолазная активность подавляется по типу смешанного ингибирования [13]. Определение величины K_d, равной 10^{-5} М, показало, что подобное комплексообразование можно отнести к слабым взаимодействиям. Однако, учитывая высокую концентрацию гликолитических ферментов в клетке, примерно равную K_d комплекса НСЕ—ФГМ, весьма вероятно его существование *in vivo* [18]. Неактивный *in vitro* комплекс практически полностью восстанавливает енолазную активность в присутствии физиологических концентраций 2,3-бисфосфоглицерата—кофактора ФГМ.

Мы предположили, что и в условиях, приближенных к ситуации *in vivo* описанный эффект может иметь место, то есть подавление енолазной активности при инкубации экстракта водорастворимых белков с ФГМ является следствием образования комплекса НСЕ—ФГМ, а активность восстанавливается в присутствии 2,3-бисфосфоглицерата.

Величина У.А. енолазы в экстракте водорастворимых белков

равна 0,47 мкм $мг^{-1}$ $мин^{-1}$. Согласно литературным данным, НСЕ и нейронеспецифическая енолаза (ННЕ) содержатся в мозгу млекопитающих примерно в равных пропорциях, а общее количество енолазы составляет 3% от водорастворимых белков [12]. Поэтому нетрудно рассчитать, что в экстракте с содержанием белка 5 мг/мл суммарная концентрация НСЕ—ННЕ равна $2 \cdot 10^{-6}$ М. Как видно из рис. 1, *а*, енолазная активность экстракта подавляется в присутствии $2 \cdot 10^{-5}$, $4 \cdot 10^{-5}$ и $1{,}2 \cdot 10^{-4}$ М очищенной ФГМ на 5, 32 и 35% соответственно. После пропускания экстракта через колонку с сефадексом G-25, то есть отделения от него фракции низкомолекулярных соединений степень ингибирования почти не меняется и составляет 8, 28 и 35% (рис. 1, *б*), а при добавлении в среду 2,3-бисфосфоглицерата—кофактора фосфоглицератмутазной реакции 5, 9 и 39% (рис. 1 *в*).

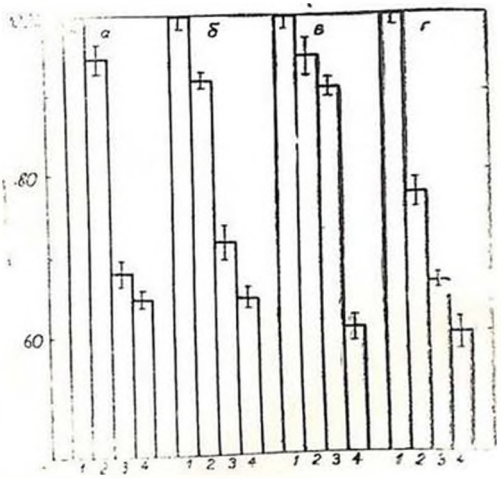

Рис. 1. Енолазная активность после инкубации с различными количествами очищенной фосфоглицератмутазы. У.А. без фосфоглицератмутазы принята за 100%. *а*—экстракт водорастворимых белков (5 мг/мл), *б*—экстракт водорастворимых белков после пропускания через колонку с сефадексом G-25, *в*—экстракт водорастворимых белков с добавлением 0,5 мМ 2,3-бисфосфоглицерата, *г*—0,1 мкМ нейроспецифической енолазы в буфере «А». *1*—гомогенат, *2*—*4*—гомогенат с добавлением $2 \cdot 10^{-5}$, $4 \cdot 10^{-5}$, $1{,}2 \cdot 10^{-4}$ М соответственно, *5*—нейроспецифическая енолаза, *6*—*8*—нейроспецифическая енолаза с добавлением 10^{-5}, $2 \cdot 10^{-5}$, $6 \cdot 10^{-5}$ М фосфоглицератмутазы соответственно

Как показано ранее, в присутствии ФГМ подавляется активность только НСЕ, но не ННЕ [13]. Следовательно, концентрация енолазы, взаимодействующей с ФГМ в экстракте, равна приблизительно 10^{-6} М. Поэтому, инкубируя 10^{-6} М очищенной НСЕ с ФГМ, мы моделируем примерно аналогичные предыдущему эксперименту условия. При концентрациях ФГМ 10^{-5}, $2 \cdot 10^{-5}$ и $6 \cdot 10^{-5}$ М наблюдается подав-

ление начальной активности на 22, 33 и 40% соответственно (рис. 1 *г*). Из рисунка видно, что характер подавления активности для очищенной НСЕ отличается от вариантов, где в качестве источника енолазной активности использовался экстракт водорастворимых белков. В случае очищенной НСЕ активность заметно подавлялась уже при использовании 5-кратного избытка ФГМ, а в остальных случаях такое ингибирование наблюдалось лишь при 20-кратном добавлении ФГМ. Однако при применении больших избытков ФГМ процент подавления активности во всех случаях нивелируется. Это, вероятно, можно объяснить тем, что ФГМ обладает способностью связываться

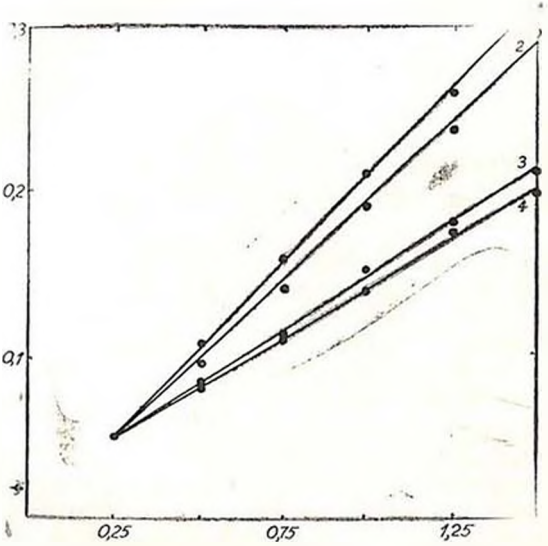

Рис. 2. Енолазная активность при разбавлениях экстрактов водорастворимых белков, содержащих различные количества фосфоглицератмутазы. По оси абсцисс—концентрация белка в кювете (в мг/600 мкл), по оси ординат—енолазная активность (в ΔD/мин). *1*—гомогенат, *2*—*4*—гомогенат с добавлением $2 \cdot 10^{-5}$, $4 \cdot 10^{-5}$, $1{,}2 \cdot 10^{-4}$ М фосфоглицератмутазы соответственно

не только с НСЕ, но и с другими соединениями, присутствующими в экстракте. Поскольку использование водорастворимых белков, не содержащих низкомолекулярных соединений, существенно не меняет описанную картину, можно предположить, что ФГМ связывается с высокомолекулярными соединениями предположительно белковой природы. Добавление в среду 2,3-бисфосфоглицерата, который активирует ФГМ при первых двух использованных концентрациях снижает ее ингибирующее действие, но при большом избытке также наблюдается подавление енолазной активности.

Для проверки предположения о том, отражает ли образование комплекса НСЕ-ФГМ подавление активности НСЕ необходимо было исследовать и действие других гликолитических ферментов, а также БСА, имеющего величины ИЭТ и M_r, близкие к значениям таковых для ФГМ. Поэтому было изучено действие альдолазы, глицеральдегидфосфатдегидрогеназы, гексоназы и БСА на енолазную активность водорастворимых белков.

Таблица

Удельная активность енолазы в экстракте водорастворимых белков в присутствии различных концентраций гликолитических ферментов и БСА

Гомогенат (У. А. 0,47 · км мг$^{-1}$ мин$^{-1}$)	Концентрации ферментов М			
	0	2·10^{-5}	6·10^{-5}	10^{-4}
БСА	0,51	0,54	0,51	0,51
альдолаза	0,55	0,54	0,44	0,47
гексокиназа	0,49	0,51	0,42	0,49
глицеральдегид-фосфат-дегидрогеназа	0,44	0,44	0,47	0,47
фосфоглицератмутаза	0,39	0,23	0,18	0,004

Как видно из таблицы, только внесение в среду ФГМ приводит к значительному подавлению енолазной активности. БСА и другие гликолитические ферменты—гексокиназа, альдолаза, глицеральдегидфосфатдегидрогеназа, близкие к ФГМ либо метаболически, либо по значениям ИЭТ и M_r, таким эффектом не обладают, то есть ингибирующее действие ФГМ на енолазную активность проявляет довольно узкую специфичность.

Необходимо указать, что данные по подавлению енолазной активности гомогената ФГМ и отсутствие каких-либо воздействий на активность енолазы при использовании других ферментов подтверждается и при применении в качестве источника енолазы очищенного препарата НСЕ, но не ННЕ.

Если полученные эффекты подавления активности обеспечиваются за счет образования слабых комплексов, то они должны диссоциировать уже при небольших разбавлениях. На рис. 2 представлены графики изменения активности енолазы при разбавлении экстрактов водорастворимых белков, содержащих различные количества ФГМ. Енолазная активность экстрактов, содержащих различные количества ФГМ, становится одинаковой уже при 6-кратном их разбавлении. Вероятно, это происходит потому, что при разбавлении образовавшийся комплекс диссоциирует с восстановлением подавленной енолазной активности и при 6-кратном разбавлении процент НСЕ, входящий в комплекс, настолько мал, что суммарная енолазная активность не отличается от таковой в экстракте, не содержащем ФГМ.

A RELATIONSHIP BETWEEN BRAIN PHOSPHOGLYCEROMUTASE AND ENOLASE

NAZARYAN-K. B., EGORYAN R. U., KAZARYAN B. A.

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

We have studied the interaction between phosphoglyceromutase (PGM) and enolase of bovine brain under conditions close to the physiological ones. The enolase activity decreased in water-soluble protein extracts in the presence of purified PGM. This effect has not been observed when other glycolytic enzymes were used instead of PGM. Our results confirm earlier data about the formation of complexes between neurospecific enolase and PGM.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Tompa P., Bar J., Batke J.* Eur. J. Biochem., v. 159, p. 117—124, 1986.
2. *Friedrich P., Hajdu J.* Biochem. Soc. Trans, v. 15 (5), p. 973—977, 1987.
3. *Bernhard S. A., Srivastuva D. K.* Biochem. Soc. Trans, v. 15 (5), p. 977—982 . 1987.
4. *Hess B., Wurster B.* FEBS Lett., v. 9, p. 73, 1970.
5. *Ovadi J., Keleti T.* Eur. J. Biochem., v. 85, p. 157—161, 1978.
6. *Batke J., Asboth G., Lakatos S., Schmitt B., Cohen R.* Eur. J. Biochem., v. 107, p. 389—394, 1980.
7. *Harris S., Winzor D.* Biochem. et biophys. acta, v. 911, p. 121—126, 1987.
8. *Ovadi J.*—In Dynamics of Biochemical Systems (eds. S. Damjanovich, T. Keleti, L. Tron) v. 30, p. 247—264, Elsevier, Amsterdam; Akad. Kiado Budapest Symp. Biol. Hung., 1986.
9. *Batke J., Tompa P.*—In Dynamics of Biochemical Systems (eds. S. Damjanovich, T. Keleti, L. Tron), v. 30, p. 247—264), Elsevier, Amsterdam; Akad. Kiado Budapest Symp. Biol. Hung. 1986.
10. *Карасев В. А., Стефанов В. Е., Курганов Б. И.* Итоги науки и техники, Биол. химия. М., ВИНИТИ, с. 198, 1989.
11. *Thompson R. J.*, Biochem. Soc. Trans., v. 8 (5), p. 494—496, 1980.
12. *Zomzely-Neurath C. E.* Handbook of Neurochem. (ed. A. Lajtha), v. 4, p. 403—433, N. Y., Acad. Press, 1983.
13. *Batke J., Nazaryan K. B., Karapetian N. H.* Arch. Biochem. and Biophys., v. 264 (2), p. 510—518, 1988.
14. *Назарян К. Б., Казарян Б. А., Карапетян Н. Г.* Нейрохимия, т. 4, № 4, с. 410—414, 1985.
15. *Назарян К. Б., Егорян Р. У., Казарян Б. А.* Нейрохимия, т. 7, № 4, с. 566—573, 1988.
16. *Baranovski T., Wolna E.* Meth. in Enzymology, v. 42, p. 335—338, N. Y., Acad. Press, 1975.
17. *Bradford M. E.* Anal. Biochem., v. 72, p. 248—254, 1976.
18. *Ottaway J., Mowbray J.*—In Current Topics in Cell Regulation (eds. B. L. Horecker, R. Stadtman), v. 12, p. 107—208, Academic Press, New York, 1977.

Поступила 14. V. 1990

НЕЙРОХИМИЯ
т. 9, № 3, 1990

УДК 616.853—07:616.831—008.931:577.152.24

РЕГУЛЯЦИЯ ГЛИКОЛИЗА В ГОЛОВНОМ МОЗГУ КРЫС ЭСТРАДИОЛОМ-17β И ПРОГЕСТЕРОНОМ

КОСТАНЯН А. А., КАЗАРЯН Б. А., НАЗАРЯН К. Б.
Институт экспериментальной биологии АН Армении, Ереван

Изучено влияние эстрадиола-17β и прогестерона на активность восьми гликолитических ферментов головного мозга самок крыс. Обнаружена гормональная регуляция трех ключевых ферментов гликолиза—гексокиназы, фосфофруктокиназы и пируваткиназы и выявлены их гормончувствительные изоферменты. Актиномицин D полностью снимает повышение активности этих ферментов, что свидетельствует в пользу их синтеза *de novo*.

Как известно, головной мозг является тканью-мишенью для ряда гормонов, в том числе женских половых стероидных гормонов—эстрадиола и прогестерона, рецепторы которых локализованы в нервных клетках различных областей головного мозга [1]. Одним из доказательств этому служит большое количество клинических и экспериментальных данных о взаимосвязи между уровнем половых стероидных гормонов и высшей нервной деятельностью человека и животных. Так, например, достоверно установлено, что частота и длительность припадков у женщин-эпилептиков меняется в зависимости от циклических изменений соотношения эстрадиола и прогестерона [2]. С другой стороны, вспышкообразная электрическая активность нейронов в эпилептическом очаге сопряжена с большими энергетическими затратами, и, вероятно, при этом повышается активность ферментов, участвующих в энергетическом обмене. Такая активация была показана для регуляторных ферментов гликолиза при судорогах, вызванных бикукуллином [3]. В то же время именно гликолитический путь является главным в регуляции энергетического обмена нейронов, так как через аэробный гликолиз метаболизируется более 90% основного источника энергии в ЦНС—глюкозы. Механизм подобной активации, которая может иметь место как при ферментативной индукции на уровне генома, так и при активации конститутивных ферментов, например, по типу аллостерической регуляции, пока не выяснен. Показано, что в различных регионах головного мозга крыс эстрадиол-17β вызывает индукцию таких ферментов, как АХЭ, холинацетилтрансфераза, МАО, глюкоза-6-фосфат-дегидрогеназа, малатдегидрогеназа, изоцитратдегидрогеназа, креатинкиназа и др. [4—7], причем для некоторых из них изучены изменения и на уровне изоферментов. Отно-

сительно влияния эстрадиола и прогестерона на гликолитические ферменты головного мозга в литературе нам не удалось обнаружить каких-либо упоминаний о систематических исследованиях, посвященных этому вопросу. Существуют лишь отдельные работы Luin и соавт. и Kaye и соавт. [6, 8], в которых выявлена эстрадиоловая индукция лактатдегидрогеназы и показано отсутствие таковой для енолазы.

Целью настоящей работы являлось исследование гормональной регуляции гликолиза в головном мозгу самок крыс. Было изучено влияние эстрадиола-17β и прогестерона на активность гексокиназы (КФ 2.7.1.1), фосфофруктокиназы (КФ 2.7.1.11), альдолазы (КФ 4.1.2.13), глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы (КФ 1.2.1.12), фосфоглицераткиназы (КФ 2.7.2.3), фосфоглицератмутазы (КФ 2.7.5.3), енолазы (КФ 4.2.1.11) и пируваткиназы (КФ 2.7.1.40), а также изменение изоферментного спектра индуцибельных ферментов при действии эстрадиола-17β.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на самках белых беспородных крыс массой 150—200 г, которым внутрибрюшинно вводили эстрадиол-17β («Sigma», США) в концентрации 0,3 мг/кг массы и прогестерон (Ростовское химическое производственное объединение) в концентрации 30 мг/кг массы. Актиномицин Д («Serva», ФРГ) в концентрации 0,3 мг/кг массы вводили за 1 ч до инъекции эстрадиола-17β. Животных декапитировали через 4 ч после введения гормонов. Ткани головного мозга гомогенизировали в соотношении 1 : 10 в 50 мМ Na-фосфатном буфере, pH 8,0 для фосфофруктокиназы и в трис-HCl, pH 7,5 для остальных ферментов. Затем гомогенат центрифугировали при 17000 g в течение 30 мин и надосадочную жидкость использовали в качестве источника ферментов. Цитозольную и мембраносвязанную фракции гексокиназы получали по методу Kellag и соавт. [9]. Белок определяли по Bradford [10]. Определение активности гексокиназы, фосфофруктокиназы, пируваткиназы и фосфоглицератмутазы проводили по методам, описанным Костанян, Манукян [11] и Назаряном и соавт. [12], енолазы—по методу Baranowski, Wolna [13], а фосфоглицераткиназы, альдолазы и глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы—по методам, предложенным Bergmeyer [14]. Активность ферментов выражали в мкмоль/мг белка·мин. Аналитическое ИЭФ в 5%-ном ПААГ с амфолинами диапазона 3,5—10 («LKB», Швеция) проводили по методу Winter и соавт. [15]. Гель разрезали на полосы шириной 5 мм и инкубировали в буфере для определения активности каждого фермента при измерении ферментативной активности и в бидистиллированной воде при определении pH элюатов.

Результаты и обсуждение

Как видно из табл. 1, через 4 ч после введения эстрадиола-17β достоверно повышается активность гексокиназы, фосфофруктокиназы

и пируваткиназы, в то время как активность альдолазы, глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы, фосфоглицераткиназы, фосфоглицератмутазы и енолазы остается неизменной (табл. 2). Причем, максимальные изменения претерпевает активность фосфофруктокиназы, и относительно небольшие сдвиги в активности наблюдаются в мембраносвязанной фракции гексокиназы. Известно, что гексокиназа ин-

Таблица 1

Активность гексокиназы, фосфофруктокиназы и пируваткиназы в головном мозгу крыс через 4 ч после введения гормонов

Серии опыта	Гексокиназа		Фосфофруктокиназа	Пируваткиназа
	цитозольная	мембраносвязанная		
Контроль	0,054±0,009	0,174±0,002	1,32±0,02	1,88±0,07
Эстрадиол-17β	0,064±0,005*	0,191±0,006*	2,45±0,09*	3,10±0,26*
Актиномицин D + эстрадиол-17β	0,053±0,007	0,174±0,001	1,31±0,05	1,96±0,24
Прогестерон	0,046±0,007*	0,121±0,005*	0,79±0,03*	1,51±0,19*

Примечание. Активность ферментов выражена в мкмоль/мг белка·мин. Статистическая обработка по Стьюденту, *$p<0,05$.

Таблица 2

Активность альдолазы, глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы, фосфоглицераткиназы, фосфоглицератмутазы и енолазы в головном мозгу крыс через 4 ч после введения гормонов

Серии опыта	Альдолаза	Глицеральдегид 3-фосфат-дегидрогеназа	Фосфоглицераткиназа	Фосфоглицератмутаза	Енолаза
Контроль	0,73±0,02	0,139±0,04	0,72±0,03	1,86±0,07	1,01±0,03
Эстрадиол-17β	0,75±0,02	0,146±0,01	0,80±0,09	1,88±0,07	1,04±0,01
Прогестерон	0,70±0,05	0,130±0,03	0,71±0,07	1,85±0,07	1,02±0,02

гибируется глюкозо-6-фосфатом и в головном мозгу она преимущественно находится в ингибированном состоянии. При этом K_i для мембраносвязанной гексокиназы на порядок выше, чем для ее цитоплазматической формы. Поэтому повышение уровня мембраносвязанной гексокиназы даже на несколько процентов достаточно для значительного увеличения скорости фосфорилирования глюкозы [16]. Учитывая тот факт, что основные контрольные механизмы гликолиза осуществляются на трех стадиях, катализируемых гексокиназой, фосфофруктокиназой и пируваткиназой, можно предположить, что повышение активности этих ферментов при воздействии эстрадиола приводит к активации гликолиза в целом. Для механизма действия стероидных гормонов в тканях-мишенях на уровне генома существует классическая модель, по которой на 4-м ч действия эстрадиола наблюдается максимальное усиление тотального биосинтеза белков [17, 8]. Как видно из рис. 1, активность регуляторных ферментов гликолиза достигает максимального повышения именно к 4-му ч после вве-

дения эстрадиола-17β. К тому же ингибитор белкового синтеза на уровне транскрипции—актиномицин Д полностью снимает это повышение активности гексокиназы, фосфофруктокиназы и пируваткиназы, что свидетельствует в пользу их синтеза *de novo* (табл. 1).

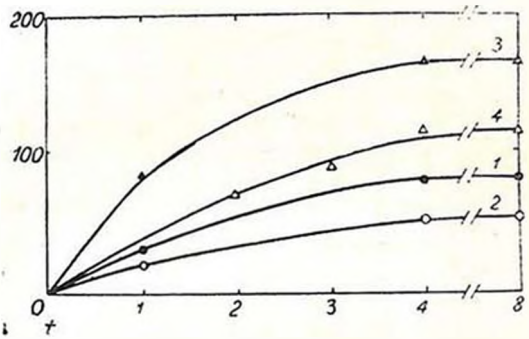

Рис. 1. Активность ключевых ферментов гликолиза головного мозга крыс в зависимости от времени после введения эстрадиола—17β: 1—цитозольная фракция гексокиназы, 2—мембраносвязанная фракция гексокиназы, 3—фосфофруктокиназа, 4—пируваткиназа. По оси абсцисс—время после введения эстрадиола; по оси ординат—активность ферментов выражена в %. За 100% принимали активность ферментов в контроле

Прогестерон оказывает противоположное эстрадиолу действие—вызывает подавление активности индуцибельных ферментов (табл. 1) и не оказывает влияния на активность остальных ферментов (табл. 2). При этом прогестерон и здесь выступает в роли антагониста эстрадиола, как это имеет место в механизмах обратной связи между эндокринной системой и ЦНС, и, в частности, при модифицирующем действии этих гормонов на эпилептическую активность клеток головного мозга. Однако в рамках вышеупомянутой модели механизма действия стероидов трудно интерпретировать полученные данные.

На рис. 2, *а* показано, что при помощи ИЭФ в 5%-ном ПААГ с амфолинами диапазона 3,5—10 для цитозольной фракции гексокиназы получено 2 пика активности с ИЭТ при pH 4,9 (1) и 6,1 (2). Поскольку известно, что в головном мозгу содержится ГК I и ГК II в соотношении 10 : 1 и ИЭТ для ГК I находится при pH 6,2 [18], то полученные пики 1 и 2 можно идентифицировать, как ГК II и ГК I соответственно. Причем гормончувствительным является изофермент ГК II (пик 1 на рис. 2, *б*), который более резко реагирует и на гипогликемию, вызванную введением инсулина [19]. При этом неудивительно, что не обнаружено никаких различий изоферментных спектров в цитозольной и мембраносвязанной фракциях гексокиназы как в контроле, так и при введении эстрадиола-17β (рис. 2, *а—г*), так как в последнее время ряд авторов склоняется в пользу идентичности фермента в этих фракциях [20].

Для фосфофруктокиназы обнаружено 3 пика активности с ИЭТ

при pH 4,5 (1), 5,7 (2) и 8,9 (3) (рис. 3, *а*). Вероятно, изоэлектрическое разделение изоферментов дает возможность получать только гомотетрамерные формы, хотя вероятность образования гибридных гетеротетрамеров в экстракте тканей головного мозга очень велика. Можно предположить, что пики 1, 2 и 3 соответствуют изоферментам M_4, B_4 и L_4 фосфофруктокиназы в головном мозгу [21]. Интересно, что чувствительным к действию эстрадиола-17β оказался именно изофермент B_4 (пик 2 на рис. 3, *б*), преобладающий в головном мозгу и являющийся наиболее чувствительным к действию ингибиторов и активаторов [22]. По всей видимости, в головном мозгу регуляция фосфофруктокиназы как аллостерическая, так и на уровне генома осуществляется через мозговой изофермент B_4.

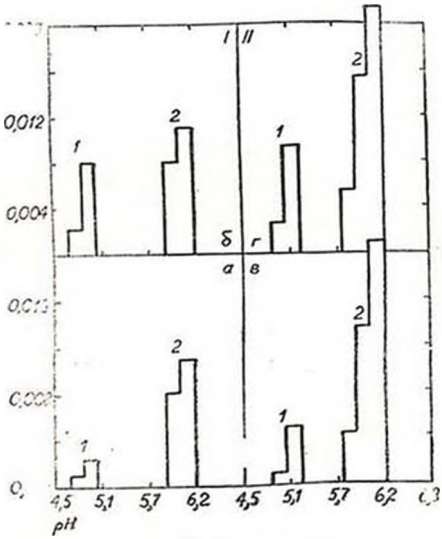

Рис. 2. Активность цитозольной (I) и мембраносвязанной (II) фракций гексокиназы головного мозга крыс после ИЭФ в ПААГ с амфолинами диапазона pH 3,5—10 в контроле *(а, в)* и при действии эстрадиола-17β *(б, г)*. Здесь и на рис. 3 по оси ординат—активность ферментов выражали в мкмоль·мин

Пируваткиназная активность представлена двумя пиками активности и ИЭТ при pH 5,7 (1) и 6,5 (2) (рис. 3, *в*). Для идентификации полученных данных был использован очищенный препарат пируваткиназы из мышц кролика («Reanal», Венгрия). Сравнив наши результаты с литературными данными [23], можно сделать вывод о соответствии полученных пиков 1 и 2 с изоферментами пируваткиназы M_4 и K_4. Как видно из рис. 3, *г* гормончувствительным является только изофермент K_4 (пик 2), что совпадает с данными литературы об эстрадиоловой индукции этого изофермента в матке [24]. До недавнего времени считалось, что чувствительным к гормональному воздейст-

вию может быть только печеночный L-изофермент пируваткиназы, причем для него показана индукция на уровне генома [25]. Полученные нами данные подтверждают возможность эстрадиоловой индукции изофермента K_4 и в других тканях животных.

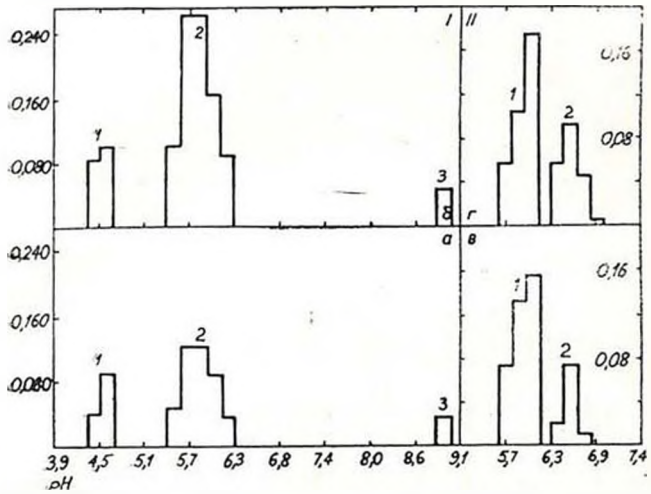

Рис. 3. Активность фосфофруктокиназы (I) и пируваткиназы (II) головного мозга крыс после ИЭФ в ПААГ с амфолинами диапазона pH 3,5—10 в контроле *(а, в)* и при действии эстрадиола-17β *(б, г)*

Таким образом, нами была обнаружена регуляция трех ключевых ферментов гликолиза, а значит и всего гликолиза в целом, которая, по всей видимости, осуществляется через геном нервных клеток. Причем она затрагивает лишь определенные изоферменты индуцибельных ферментов. Очевидно, в нервной ткани целесообразнее существование отдельных изоферментов, чувствительных к действию различного рода регуляторов, в том числе и гормонов. Вполне вероятно, что подобная гормональная регуляция энергетического обмена и служит одним из механизмов модифицирующего действия половых стероидных гормонов на эпилептическую активность клеток головного мозга.

CONTROL OF GLYCOLYSIS BY ESTRADIOL—17β AND PROGESTERONE IN RAT BRAIN

KOSTANYAN A. A., KAZARYAN B. A., NAZARYAN K. B.

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

The effect of estradiol—17-beta and progesterone on brain glycolytic enzymes of female rats has been studied. The hormonal regulation of three key glycolytic enzymes (hexokinase, phosphofructokinase and

pyruvate kinase) and differences in their sensitivity to studied hormones have been discovered. Actinomycin D had the inhibitory action. This suggests that the regulation of energy metabolism is accomplished by steroid hormones at the genome level of nerve cells.

ЛИТЕРАТУРА

1. *McEwen B. S.* Biol. Regul. Develop., v. 3A, p. 203—216, 1982.
2. *Maggi A., Perez J.* Life Sci., v. 37, № 10, p. 893—906, 1985.
3. *Siesjö B. K.*—In: Brain Energy Metabolism, (ed. J. Willey), p. 345—377. Chichester—N.-Y., Brisbane-Toronto, 1978.
4. *Moudgil V. K., Kanungo M. S.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 52, № 3, p. 725—730, 1973.
5. *Luine M. N., Khylchevskaya R. I., McEwen B. S.* Brain Res., v. 86, p. 293—306, 1975.
6. *Luine M. N., Khylchevskaya R. I., McEwen B. S.* Brain Res., v. 86, p. 283—292, 1975.
7. *Kaye A. M.* J. Steroid Biochem., v. 19, № 1, p. 33—40, 1983.
8. *Kaye A. M., Reiss N.*—In: Steroid Induced Uterine Proteins N.-Y., 1980.
9. *Kellog E. W., Knull H. R., Wilson J. E.* J. Neurochem., v. 22, № 3, p. 461—463, 1974.
10. *Bradford M. E.* Anal. Biochem., v. 72, p. 248—254, 1976.
11. *Костанян А. А., Манукян К. Л.* Журн. эксперим. и клин. мед., т. 28, № 1, с. 41—45, 1988.
12. *Назарян К. Б., Егорян Р. У., Казарян Б. А.* Нейрохимия, т. 7, № 4, с. 566—573, 1988.
13. *Baranowski T., Wolna E.*—In: Methods in Enzymology, v. 42, p. 335—338, N.-Y., Acad. Press, 1975.
14. *Bergmeyer H. U.*—In: Methods Enzyme Analysis (eds. H. U. Bergmeyer), 2nd Engl. Edition, v. 1, p. 134—140, 1974.
15. *Winter A., Ek K., Anderson U.*—In Application Note 250, LKB Producter AB, Sweden, 1977.
16. *Lowry O. H.*—В кн.: Нейрохимия (под ред. М. И. Прохоровой), с. 42, Л., ЛГУ, 1979.
17. *Розен В. Б.* Основы эндокринологии, М., Высшая школа, 1980.
18. *Needels D. L., Wilson J. E.* J. Neurochem., v. 40, № 4, p. 1104—1113, 1983.
19. *Magnani M., Serafini G., Stocchi V., Dacha M., Farnaini G.* The Ital. J. Biochem., v. 33, № 6, p. 392—401, 1984.
20. *Kaur G., Singh R., Baquer N. Z.* J. Neurochem., v. 41, № 2, p. 594—596, 1983.
21. *Foe L. G., Kemp R. G.* ABB, v. 228, № 2, p. 503—511, 1984.
22. *Vora S., Os Kam R., Staal E. I.* Biochem J., v. 219, № 2, p. 333—341, 1985.
23. *Totle S. W., Dyson R. D., Newburgh R. W.* J. Neurochem., v. 27, p. 1355—1360, 1976.
24. *Strandholm J. J., Dyson R. D., Cardenas J. M.* ABB, v. 173, p. 125—131, 1976.
25. *Inoue H., Toguchi T., Tanaka T.* J. Biochem. (Tokyo), v. 96, p. 1457—1462, 1984.

Поступила 26. VI. 1990

НЕЙРОХИМИЯ
т. 9, № 3, 1990

УДК 547.963.3

МОЛЕКУЛЯРНОЕ КЛОНИРОВАНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ГЕНА NSE ИЗ МОЗГА КРЫСЫ

СКОБЕЛЕВА Н. А., ЗАХАРЯН Р. А., БУХМАН В. Л.,
КИСЕЛЕВ С. Л., МИХАЙЛОВ С. А.

Институт экспериментальной биологии АН Армении, Ереван

Из коры головного мозга крысы выделена поли (А)+РНК, по которой синтезированы двуспиральные ДНК. На основе ДНК фага λgt10 получена клонотека структурных генов. Проведен скрининг клонотеки на наличие в банке мозга генов ДНК, несущих последовательности, специфичные γ-енолазному гену крысы. Анализ первичной структуры полученных генов показал их полную гомологию со структурой гена NSE крысы.

В тканях животных обнаружены три изоформы гликолитического белка енолазы (2-фосфо-Д-глицерат гидролиаза, КФ 4.2.1.11)—α, β и γ. Енолаза является димерным белком с величиной M_r субъединиц 46 кД. α-Енолаза (NNE) находится во всех тканях организма, β—только в мышечной ткани, γ-енолаза (NSE)—в нейронах и нейроэндокринных клетках. Специфичность NSE позволяет использовать его в качестве молекулярного маркера при дифференциации нейронов [1]. Изучение молекулярных механизмов, контролирующих экспрессию генов NSE и NNE, может дать важную информацию о клеточной и тканевой специфичности экспрессии этих генов.

Успехи генетической инженерии позволили синтезировать различные структурные гены, вводить их в соответствующие векторы и размножить в составе рекомбинантных молекул ДНК. Ферментативный синтез генов *in vitro* является большим достижением современной биологии, позволяющим перейти к новому этапу в изучении структуры генома эукариот. Молекулярное клонирование структурных генов в составе рекомбинантных молекул обеспечивает получение ДНК в достаточном количестве для определения ее первичной структуры, а также для изучения соответствующих природных генов.

Представляет теоретический и практический интерес изучение экспрессии нейроспецифического белка NSE на транскрипционном и трансляционном уровне, проведение клонирования гена этого белка и конструирование штамма микроорганизма—продуцента биологически активного белка NSE, который по данным ряда авторов [2], может быть ценным диагностическим тестом при ряде нейроонкологических заболеваний.

Материалы и методы

В работе использовали dNTP, $dT_{(18)}$, [^{32}P] NTP, [^{32}P] ATP-радиохимического центра „Amercham" (Англия), актиномицин D („Calbiochem", США), олиго (dT)—целлюлоза („Biochemicals" США), агароза, трис, лизоцим, бромид этидия („Sigma", США), нитроцеллюлозные фильтры, Hybond-фильтры („Millipore", США), GF/C-фильтры („Whatman", Англия), сефадекс G-50 fine („Pharmacia Fine Chemicals", Швеция), дрожжевой экстракт, триптон, агар („Difco", США), а также другие реактивы аналитической чистоты. Все растворы приготовлены на деионизованной воде. ДНК-полимераза I из E. coli выделена по методу Jovin и соавт. [3]; ревертаза AMV („Life Sciences", США), рестриктазы (П/О „Фермент", Вильнюс).

В опытах использовали кору мозга беспородных крыс. Тотальную РНК из коры мозга крыс выделяли гуанидинизотиоцианатным методом [4], а поли(A)$^+$ РНК на олиго (dT)-целлюлозе—по методу Aviv, Leder [5]. Препарат поли(A)$^+$ РНК подвергали повторной хроматографии и осаждали этанолом. Синтез двуспиральной ДНК и встраивание молекул ДНК в фаговый вектор λgt 10 проводили по методу Gulber, Heffman [6].

Анализ фаговых бляшек, содержащих последовательности, специфичные гену NSE крысы, осуществляли методом гибридизации фаговых ДНК, фиксированных на нитроцеллюлозном фильтре, используя в качестве молекулярного зонда [^{32}P] меченный олигонуклеотид, химически синтезированный по известной структуре ДНК гена NSE [7].

Мечение олигонуклеотида проводили с помощью ДНК-полимеразы I (Кленов фрагмент) в присутствии [α^{32}P] dNTP, а также T_4 полинуклеотидкиназы в присутствии [γ^{32}P] ATP [8]. Анализ меченых олигонуклеотидов проводили в 20%-ном ПААГ на 7 М мочевине в TBE-буфере в течение 2,5 ч при 500 в. После электрофореза гель закладывали на радиоавтографию.

Выделение рекомбинантной фаговой ДНК λgt 10, содержащей последовательности, специфичные гену NSE крысы, проводили следующим образом: к клеточному лизату добавляли NaCl (5%) и хлороформ (0,1%), лизат центрифугировали 10 мин при 15000 об/мин, к супернатанту добавляли ПЕГ 6000 до концентрации 10% и выдерживали в ледяной бане в течение 1 ч, осаждали фаг центрифугированием при 15000 об/мин в течение 10 мин, осадок растворяли в буфере ТЕ, содержащем 10 мМ $MgCl_2$, добавляли ДНКазу I (25 мг/мл) и выдерживали 1 ч при 37°. К раствору добавляли 0,5% ДДС-Na, 10 мМ ЭДТА и протеиназу К (100 мг/мл), смесь инкубировали 1 ч при 37°. Проводили депротеинизацию раствора фенолом, ДНК осаждали спиртом.

Обработку рекомбинантных фаговых ДНК рестриктазой EcoR I и электрофорез продуктов рестрикции в 1%-ной агарозе проводили по методу Maniatis и соавт. [4].

Фрагмент ДНК, несущий последовательности гена NSE, элюировали из агарозы и субклонировали в плазмидном векторе GEM-4 в клетках E. coli HM 514. [7]. Плазмиды выделяли по методу Birnboim, Doly [9].

Первичную структуру ДНК NSE крысы определяли по методу Sanger и соавт. [10].

Результаты и обсуждение

Из коры мозга крысы выделена поли (A)$^+$ РНК, по которой синтезированы двуспиральные ДНК с помощью ревертазы, ДНК-полимеразы I. По тупым концам генов пришиты EcoR I—линкеры и с помощью T_4 лигазы получены рекомбинантные ДНК, где в качестве вектора использованы EcoR I—фрагменты ДНК фага λgt 10 [6]. После упаковки рекомбинантных фаговых ДНК, клетки E. coli HM514 инфицировали рекомбинантным фагом, высевали на чашки и проводили скрининг фаговых бляшек на наличие в мозговой клонотеке ДНК, несущих последовательности, специфичные γ-енолазному гену крысы. В качестве молекулярного зонда при скрининге мозговой фаговой клонотеки использовали два 15-членных олигонуклеотида с комплементарным участком в 7 нуклеотидов, химически синтезированными по известной структуре ДНК γ-енолазного гена крысы [11]. Мечение олигонуклеотидов осуществляли с помощью ДНК-полимеразы I (Кленов фрагмент) в присутствии меченых [α^{32}p] dNTP [8]. В результате ДНК-полимеразной реакции происходит достройка олигонуклеотидов мечеными трифосфатами, что дает возможность получить двуспиральную высокомеченную ДНК, которая после денатурации использовалась для скрининга мозговой клонотеки. Двуспиральный меченый олигонуклеотид значительно повышает вероятность обнаружения нужного гена в фаговой клонотеке (рис. 1).

```
5' GTATGGATGTGGCTG********
   ********CACCGACGGAGACTC 5'

5' GTATGGATGTGGCTG********
   ********CACCGACGGAGACTC 5'
```

Рис. 1. 15-членные олигонуклеотиды с комплементарными последовательностями, использованными в качестве молекулярного зонда при скрининге мозговой фаговой клонотеки на наличие в ней последовательностей ДНК, специфичных гену NSE крысы. Достройка олигонуклеотидов производилась ДНК-полимеразой I (Кленов фрагмент) в присутствии четырех [α^{32}p] dNTP. *—меченые комплементарные нуклеотиды

Было проанализировано около 120000 рекомбинантных фагов, из которых выявлено 2 фага, гибридизующихся с меченым молекулярным зондом. Из рекомбинантных гибридизующихся фагов, несущих последовательности ДНК гена NSE, выделяли фаговую ДНК, которую обрабатывали рестриктазой EcoR I для выщепления чужеродного

фрагмента ДНК. Размеры вставок ДНК в фаге λgt 10 были определены электрофорезом продуктов рестрикции в 1%-ной агарозе и составили 1,6—1,4 кб. (рис. 2). Гибридизующиеся фрагменты элюировали из агарозы low melting и субклонировали в плазмидном векторе GEM-4. Для трансформации использовали клетки E. coli HM 514.

Рис. 2. Электрофорез в 1%-ной агарозе продуктов рестрикции рекомбинантных фаговых ДНК эндонуклеазой EcoR I. *1*—pNSE$_8$; *2*—pNSE$_{10}$; *3*—ДНК фага λ, обработанная рестриктазами EcoR I и Hind III. Фрагменты использованы в качестве маркеров

Была определена первичная структура двух генов, обозначенных нами p NSE$_8$ и p NSE$_{10}$. Анализ первичной структуры этих генов показал их полную гомологию с нуклеотидной последовательностью γ-енолазного гена крысы, определенную ранее [11] (рис. 3).

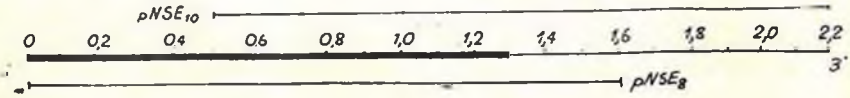

Рис. 3. Схематическое изображение генов p NSE$_8$ и p NSE$_{10}$. Кодирующая область гена выделена жирной линией

Таким образом, в результате проведенной работы получен γ-енолазный ген крысы, который был использован нами в качестве молекулярного зонда для нахождения гена NSE человека в клонотеке генов кДНК. Поиск гена NSE человека проводили в кДНК мозговой человеческой клонотеке, сконструированной на основе фага λgt II («Clontech», США). Для скрининга клонотеки использовали меченный в системе ник-трансляции [4] ген NSE крысы размером 1,6 кб, предварительно вырезанный из плазмиды p NSE$_8$ рестрикционной

обработкой эндонуклеазой EcoR I. Известно, что кодирующая область генов NSE крысы и человека имеет 91% гомологии по нуклеотидной последовательности [13], а гомология по нуклеотидной последовательности в кодирующей области генов NSE и NNE крысы составляет 75% [11].

В результате проведенной работы нами получены две плазмиды, содержащие последовательности ДНК, гибридизующиеся с геном NSE крысы. Определение первичной структуры клонированных ДНК показало, что плазмида, содержащая вставку ДНК размером 1,3 кб и обозначенная нами p NSE-H, содержит последовательности ДНК, соответствующие гену NSE человека [13], в то время как плазмида (p NNE-H) с размером чужеродной ДНК 900 нуклеотидных последовательностей несет последовательности гена NNE. Сравнение нуклеотидной последовательности кодирующей области гена NNE, полученного нами, с известной структурой гена NNE человека показало, что гомология составляет 96,1% [14].

Таким образом, нами получены гены NSE крысы, NSE и NNE человека, которые будут использованы в дальнейшем для изучения структурной организации этих генов, их транскрипционной и трансляционной активности, а также для получения рекомбинантной плазмиды, экспрессируемой в клетках *E. coli*. Полученный белок NSE может найти применение для получения антител и приготовления диагностикумов для клинического использования в диагностике ранних стадий рака легкого и других онкологических заболеваний нейроэндокринного происхождения [12].

MOLECULAR CLONING AND SEQUENCING OF RAT BRAIN NSE GENE

SKOBELEVA N. A., ZAKHARYAN R. A., BUKHMAN V. L., KISELEV S. L., MIKHAILOV S. A.

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

cDNAs for rat gamma-enolase (neuron-specific enolase, NSE; EC 4.2.1.11) were isolated from a cDNA library using colony hybridization with synthetic oligonucleotides. The isolated cDNA clones coding for the rat gamma-enolase were sequenced. The sequences of the obtained cDNAs were completely identical to the known rat gamma-enolase gene sequence.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Zomzely-Neurath C. E.*—In: Hand book of neurochemistry (ed. Lajtha A.), v. 4, p. 403—433, Plenum, Press, N. Y., 2nd Ed., 1983.
2. *Carney N. D., Ihde D. C., Cohen M. N., Marangos P. J., Bunn P. J., Gazdar A. F.* Lancet, v. 8272, p. 583—585, 1982.

3. *Jovin T. M., Englund P. T., Bertch L. L.* J. Biol. Chem., v. 244, № 11, p. 2996—3008, 1969.
4. *Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J.* Mol. cloning. Cold Spring Harbor, N. Y., 1982.
5. *Avlv H., Leder P.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA., Biol. Sci., v. 69, p. 1408—1412, 1972.
6. *Gulber U., Heffman B.* Gene, v. 25, p. 263—271, 1983.
7. *Davis L. G., Dibner M. D., Battey J. F.* Basis methods in Molec. biol., N. Y., Amsterdam, London, 1986.
8. *Davis K. E.*—In: Human genetic diseases. (ed. Ricknood D., Hances D. B.), p. 255—261, Oxford, Washington, 1986.
9. *Birnboim B. C., Doly J.* Nucl. Acid. Res., v. 7, № 6, p. 1513—1523, 1979.
10. *Sanger R., Coulson A. R., Barrell B. G., Smith A. J.* Mol. Biol., v. 143, p. 161—178, 1980.
11. *Sakimura K., Kushija E., Obinata M., Odani Sh., Takahashi Y.* Proc. Nat. Acad. Sci, USA, Biol. Sci., v. 82, p. 7453—7457, 1985.
12. *Carney D. N., Teeling M.* Eur. J. of Cancer & clinical oncology, v. 24, № 5, p. 825—830, 1988.
13. *Van Obbergheh E., Bishop III J. C., Zomzely-Neurath C., Lazzarini R. A.* J. Neuroscience Res., v. 19, p. 450—456, 1989.
14. *Giallongo A., Feo S., Moore R., Croce C. M., Showe L. C.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci., v. 83, p. 6741—6745, 1986.

Поступила 28. VI. 1990

НЕЙРОХИМИЯ
т. 9, № 3, 1990

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 612.822.1.015

НЕЙРОЛЕПТИКИ РАЗЛИЧНЫХ КЛАССОВ ПОДАВЛЯЮТ H^+-ТРАНСПОРТ В МЕМБРАНАХ СИНАПТИЧЕСКИХ ПУЗЫРЬКОВ МОЗГА КРЫС

МЕЛЬНИК В. И., ШУКАЛОВА Т. Ф., ГЛЕБОВ Р. Н.
НИИ общей патологии и патологической физиологии АМН СССР. Москва

Нейролептики состоят из нескольких групп веществ, имеющих мало общего между собой в химическом строении. Известные к настоящему времени биохимические и фармакологические свойства их весьма сильно различаются—в одних случаях (бутирофеноны) ярко выражены свойства блокаторов дофаминовых рецепторов, в других (фенотиазины)—блокаторов кальмодулина, в третьих (резерпин)—истощение запасов биогенных аминов [1]. Общего механизма, присущего всем группам нейролептиков, пока не найдено.

В свое время мы обнаружили, что один из нейролептиков—трифтазин весьма эффективно устраняет генерацию градиентов pH в синаптических пузырьках (СП) мозга крыс, которая осуществляется АТР-зависимым H^+-насосом (H^+-АТРазой) [2]. Поддержание кислой среды внутри СП—важная функция H^+-насоса, поскольку от этого прямо зависят аккумуляция и депонирование, а в ряде случаев—и синтез медиаторов [3, 4]. В настоящей работе исследовано влияние других наиболее распространенных и применяемых в клинике нейролептиков из различных групп на активный, АТР-зависимый H^+-транспорт в изолированных мембранах СП. Для исследования были выбраны трифтазин и хлорпромазин как представители фенотиазинов, галоперидол и дроперидол как представители бутирофенонов, а также алкалоид растительного происхождения—резерпин. Результаты показывают, что устранение градиентов pH является общим свойством всех нейролептиков.

Мембраны СП, лишенные содержимого («тени»), получали путем дифференциального центрифугирования осмотически разрушенной фракции синаптосом головного мозга крыс [5]. Осадок мембран СП суспендировали в 0,3 М сахарозе, 10 мМ HEPES/трис pH 7,4 и хранили при —20°.

Активный транспорт H^+ измеряли методом непрерывной регистрации изменений флуоресценции слабо-основного зонда акридинораижа [5, 6]. Среда измерения содержала 1 мкМ акридинораиж, 150 мМ

KCl, 20 мМ HEPES/трис pH 7,4 при 25°. Через 4 мин после добавления мембран СП (7—15 мкг белка/мл) инициировали H^+-транспорт добавлением 1 мМ Mg-ATP. Исследуемые соединения-нейролептики вносили в среду перед добавлением мембран СП. Транспортную активность выражали с помощью двух параметров—начальной скорости транспорта и стационарной аккумуляции протонов как описано ранее [5].

В работе использовали резерпин и трифтазин («Serva», ФРГ), галоперидол и дроперидол («Г. Рихтер», Венгрия) и хлорпромазин (аминазин) отечественного производства. Резерпин растворяли в диметилсульфоксиде, конечная концентрация которого в пробах не превышала 0,5% (в этой концентрации растворитель не влиял на H^+-транспорт). Остальные нейролептики применяли в виде водных растворов.

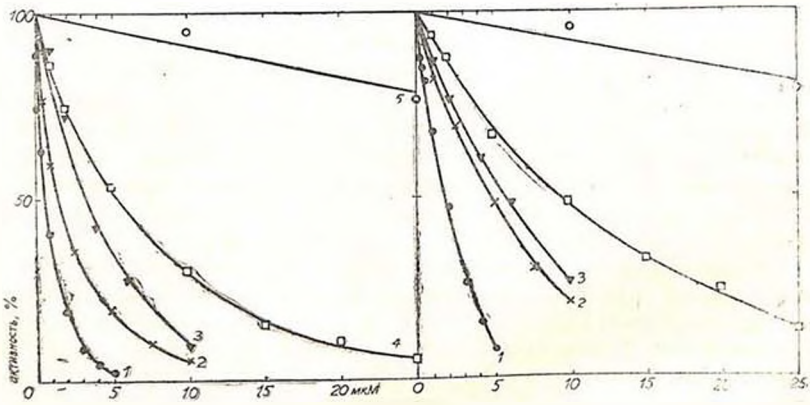

Рис. 1. Влияние различных нейролептиков на стационарную аккумуляцию протонов *(а)* и начальную скорость транспорта *(б)* H^+-насосом в мембранах СП. *1*—трифтазин, *2*—хлорпромазин, *3*—резерпин, *4*—галоперидол, *5*—дроперидол

Все исследованные нейролептики подавляли АТР-зависимый H^+-транспорт концентрационнозависимым образом. На рис. 1, *а* представлены изменения стационарной аккумуляции протонов. Этот параметр, пропорциональный достигаемой внутри СП концентрации H^+, более физиологичен, чем скорость транспорта. Ингибирование H^+-транспорта нейролептиками наблюдалось в субмикромолярном и микромолярном диапазонах концентраций. По эффективности ингибирования нейролептики располагались в следующей последовательности: трифтазин > хлорпромазин > резерпин > галоперидол ≫ дроперидол. Соответствующие величины IC_{50} составили 1,0; 2,2; 4,3; 7,7 и 49 мкМ.

Аналогичным образом под влиянием нейролептиков изменялась начальная скорость транспорта H^+ (рис. 1, *б*). Порядок эффективности сохранялся, а отличие заключается в том, что соответствующие

величины IC_{50} были в 1,5—2 раза выше, чем для аккумуляции протонов.

Наряду с ингибированием АТР-зависимого H^+-транспорта все нейролептики в том же диапазоне концентраций устраняли эндогенный градиент pH, который частично сохраняется в мембранах СП после выделения, но довольно быстро диссипирует при инкубации в отсутствие АТР (рис. 2). Как показано на примере хлорпромазина, эндогенный ΔpH, проявляющийся в виде реакции зонда на внесение СП (кривая *а*), исчезает в присутствии нейролептика (кривая б). В этой концентрации хлорпромазин почти полностью подавляет АТР-зависимый H^+-транспорт, о чем свидетельствует резкое снижение флуоресцентного ответа зонда на последующее добавление Mg-АТР.

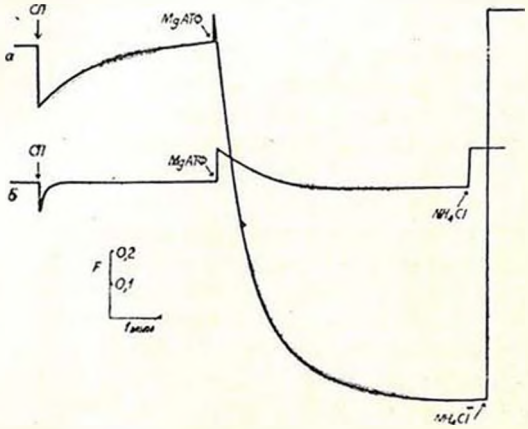

Рис. 2. Изменения флуоресценции акридинорапжа при последовательном добавлении мембран СП и Mg-АТР. *а*—в стандартной среде измерения, *б*—в присутствии 10 мкМ хлорпромазина. Степень тушения флуоресценции зонда пропорциональна величине градиента концентраций H^+. Небольшое повышение флуоресценции в момент добавления Mg-АТР не связано с H^+-транспортом [5]

Таким образом, для устранения градиента pH не требуется прямого взаимодействия нейролептиков с H^+-насосом. Учитывая физико-химические свойства этих соединений (наличие вторичных и третичных аминогрупп) можно предположить, что механизм действия нейролептиков на градиенты pH как в отсутствие, так и в присутствии АТР представляет собой разобщающий эффект по типу проникающих слабых оснований.

Полученные результаты показывают, что ингибирование генерации градиентов pH является общим свойством нейролептиков, представляющих различные группы—фенотиазины, бутирофеноны, алкалоид резерпин. По эффективности ингибирования они мало отличаются друг от друга, кроме дроперидола, который клинически менее эффективен и заметно слабее. Концентрации нейролептиков, при кото-

рых наблюдается ингибирование, близки к тем, которые оказывают терапевтическое действие [1]. Известные из литературы токсические эффекты обнаруживаются при более высоких концентрациях [7, 8].

Поскольку нейролептики, вероятно, действуют на H^+-транспорт как разобщители типа слабых оснований, они, в свою очередь, должны при этом накапливаться внутри СП. Концентрации их могут оказаться весьма высокими, так как накопление должно проходить пропорционально соотношению концентраций H^+ внутри и снаружи СП, которое в обычных условиях ($\Delta pH > 2$) превосходит 100. Накапливаясь внутри СП в высоких концентрациях, нейролептики могут взаимодействовать с локализованными там нейрохимическими системами, в частности с ферментами метаболизма медиаторов или их переносчиками. Возможно, такие взаимодействия придают относительную специфичность тем или иным видам нейролептиков, обусловливая их индивидуальные различия. В пользу такого предположения свидетельствуют данные о потребности в протонном градиенте на мембране СП для связывания резерпина [9], обладающего свойствами блокатора переносчика катехоламинов в этой мембране.

NEUROLEPTICS OF DIFFERENT CLASSES ABOLISH H^+ TRANSPORT IN SYNAPTIC VESICLE MEMBRANES OF RAT BRAIN

MEL'NIK V. I., SHUKALOVA T. F., GLEBOV R. N.

Research Institute of General Pathology and Pathophysiology, USSR Academy of Medical Sciences, Moscow

The effect of neuroleptics of different classes on the ATP-dependent H^+ transport (monitored using acridine organe, a fluorescent probe) in synaptic vesicle membranes of the rat brain was studied. All studied neuroleptics suppressed the active H^+ transport. According to their efficacy, they can be arranged in the following series: trifluoperazine$\gg$chlorpromazine$>$reserpine$\gg$haloperidol$\gg$droperidol. The corresponding IC_{50} values were 1,0; 2,2; 4,3; 7,7 and 49 μM. In the same concentration range the neuroleptics also disturbed the endogenous pH gradients observed in the absence of ATP. The suppressed H^+ transport and disturbed pH gradients appear to be due to an uncoupling effect of neuroleptics acting as permeating weak bases. Such mechanism involves the accumulation of neuroleptics inside synaptic vesicles in proportion to the transmembranes H^+ concentration gradient.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Jenner P., Marsden C. D.* Clin. Pharmacol., v. 7, p. 349—356, 985

2. *Антоников И. М., Мельник В. И., Глебов Р. Н.* Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 102, № 12, с. 714—771, 1986.

3. *Глебов Р. Н., Крыжановский Г. Н.* Успехи соврем. биол., т. 95, № 2, с. 225—241, 1983.

4. *Johnson R. G.* Physiol. Rev., v. 68, № 1, p. 232—307, 1988.
5. *Мельник В. И., Глебов Р. Н.* Нейрохимия, т. 6, № 4, с. 517—530, 1987.
6. *Глебов Р. Н., Мельник В. И., Титов С. Ю.* Биохимия, т. 52, № 11, с. 1818—1828, 1987.
7. *Abe K., Sakizawa T., Kogure K.* Neurosci. Letters, v. 71, № 3, p. 335—339.
8. *Munyon W. H., Salo R., Briones D. F.* Psychopharmacology, v. 91, № 2, p. 182—188, 1987.
9. *Near J. A., Mahler H. R.* FEBS Letters, v. 158, № 1, p. 31—35, 1983.

Поступила 28. VI. 1990

M. PETERLIK, F. BRONNER. Molecular and Cellular Regulation of Calcium and Phosphate Metabolism. J. Wiley and Sons. Baffins Lane, Chichester, 258 p., 1990.

Молекулярная и клеточная регуляция кальция и фосфорный метаболизм

Процесс окостенения и рассасывания костной ткани протекает весьма сложными путями, в которые вовлекаются клеточная деятельность, внеклеточные структуры и изменение фазы с жидкой на твердую при формировании костной ткани и, наоборот, твердой на жидкую при ресорбции кости. Настоящая книга предлагает совокупные данные новейших исследований по этим вопросам и интерпретацию механизмов регуляций указанных процессов. Она выходит в серии «Progress in Clinical and Biological Research» (т. 332) и содержит следующие главы: «Влияние пептидов, аналогичных паратиреоидным гормонам пептидов на транспорт кальция и фосфата», «Пептид, вызывающий некоторые злокачественные гиперкальцемии и играющий регуляторную роль в транспорте кальция через плаценту», «Разнообразные функции секреторного белка I», «Рецептор для кальцитонин-кальцитронного гормона», «Различные аспекты гормоноподобного действия витамина D».

НЕЙРОХИМИЯ
т. 9, № 3, 1990

УДК 591.481.1+547.952

ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ ЦЕРЕБРОЗИДОВ И СУЛЬФОЦЕРЕБРОЗИДОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА БАЙКАЛЬСКОЙ НЕРПЫ

ЛЕВИТИНА М. В.

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

Цереброзиды и сульфоцереброзиды являются основными гликолипидными компонентами плазматических мембран клеток головного мозга, их особенно много в олигодендроглии и миелиновых мембранах. Содержание и состав цереброзидов и сульфоцереброзидов довольно хорошо изучены в головном мозгу наземных млекопитающих, однако биохимические данные, касающиеся этих гликолипидов в головном мозгу водных млекопитающих в литературе отсутствуют.

В настоящей работе впервые сообщаются результаты изучения цереброзидов и сульфоцереброзидов головного мозга байкальской нерпы Phoca sibirica, типичного представителя водных млекопитающих. Цереброзиды и сульфоцереброзиды выделяли из суммарных липидов мозга методом ТСХ: в нейтральной системе растворителей хлороформ-метанол-вода (70 : 30 : 5) выделяются два пятна цереброзидов, соответствующих фракциям с гидроксикислотами (Цг) и с нормальными жирными кислотами (Цн) и одно пятно сульфоцереброзидов. Для выделения двух фракций сульфоцереброзидов, содержащих гидроксикислоты (СЦг) и нормальные кислоты (СЦн), использовали 2-мерную ТСХ [1]. Количество цереброзидов определяли по галактозе, количество сульфоцереброзидов—по сульфатной группе по методикам, описанным нами ранее [2]. Жирные кислоты цереброзидов и сульфоцереброзидов выделяли в виде метиловых эфиров, которые анализировали с помощью ГЖХ, используя неполярную фазу SE-30.

Как показали исследования, в головном мозгу байкальской нерпы содержание цереброзидов составляет 11,6 мг/г сырой ткани, а содержание сульфоцереброзидов—3,4 мг/г. Количество фракции Цг в незначительной степени превышает количество фракции Цн, так что отношение Цг/Цн равно 1,1. В отличие от цереброзидов доля СЦг ниже, чем доля СЦн, и поэтому отношение СЦг/СЦн составляет 0,89.

Состав жирных кислот цереброзидов и их сульфоэфиров головного мозга байкальской нерпы приведен в таблице. Как видно из представленных данных, в обоих гликолипидах доминируют пальми-

типовая (16:0) и стеариновая (18:0) жирные кислоты, на долю которых приходится 50% общих нормальных жирных кислот в цереброзидах и 38%—в их сульфоэфирах, причем в обоих липидах преобладает 16:0. Длинноцепочечных нормальных кислот в обоих липидах сравнительно мало: лигноцериновая кислота (24:0) составляет только 10% в цереброзидах и 19%—в их сульфоэфирах. Обращает внимание низкое относительное содержание ненасыщенных нормальных кислот

Таблица

Состав жирных кислот цереброзидов и сульфоцереброзидов головного мозга байкальской нерпы (% суммы нормальных кислот и суммы гидроксикислот)

Жирные кислоты	Цереброзиды		Сульфоцереброзиды	
	нормальные кислоты	гидрокси-кислоты	нормальные кислоты	гидрокси-кислоты
12:0	1,6	—	—	—
13:0	3,8	—	2,3	—
14:0	4,9	13,4	3,2	18,2
15:0	4,8	сл.	2,5	—
16:0	30,6	2,5	22,7	сл.
17:0	сл.	сл	сл.	—
18:1	сл	сл	—	—
18:0	19,4	3,8	15,9	сл.
20:1	1,8	сл.	—	—
20:0	2,6	7,0	3,5	8,4
21:0	сл.	1,5	сл.	сл.
22:1	сл.	—	сл.	сл.
22:0	3,6	12,9	7,0	11,7
23:1	сл.	сл.	сл.	сл.
23:0	2,7	16,2	5,0	13,6
24:1	1,6	сл.	1,5	сл.
24:0	10,3	36,3	19,1	42,9
25:1	1,4	сл.	1,0	сл.
25:0	1,2	2,8	2,0	5,2
26:1	6,0	1,9	10,8	сл.
26:0	3,8	1,7	3,5	сл
Сумма кислот	89,2	98,1	86,7	100

Примечание сл.—менее 0,5% от суммы жирных кислот.

в гликолипидах мозга нерпы: в цереброзидах они составляют 11%, в их сульфоэфирах—13% общих нормальных кислот. Из гидроксикислот преобладают длинноцепочечные насыщенные кислоты—цереброновая (ОН 24:0), составляющая около 40%, гидроксибегеновая (ОН 22:0) и гидроксикислота 23:0, в сумме составляющие почти 30% общих гидроксикислот. Содержание ненасыщенных гидроксикислот не превышает 2%.

По соотношению фракций Цг/Ци и по жирнокислотному составу цереброзидов и сульфоцереброзидов головной мозг байкальской нерпы отличается от мозга наземных млекопитающих. В головном мозгу изученных наземных млекопитающих отношение Цг/Ци ≈ 2 [2—4], а у нерпы—1,1, тогда как в сульфоцереброзидах таких различий не обнаружено [3—6]. Другой особенностью цереброзидов и

сульфоцереброзидов мозга нерпы является преобладание насыщенных жирных кислот над моноеновыми кислотами. У наземных млекопитающих во фракциях Цн и СЦн, как правило, преобладают моноеновые жирные кислоты, а во фракциях Цг и СЦг моноеновые гидроксикислоты составляют меньше половины общих гидроксикислот [1, 2, 4, 5]. В головном мозгу нерпы во фракциях Цг и СЦг исключительно высоко относительное содержание насыщенных гидроксикислот—98 и 100%; во фракциях Цн и СЦн насыщенные нормальные кислоты составляют 89 и 87% соответственно.

В головном мозгу наземных млекопитающих образование гидроксикислот из соответствующих нормальных жирных кислот происходит путем гидроксилирования при участии гидроксилазы (НФ 1.99.1), для активности которых абсолютно необходим кислород [7, 8]. Наличие кислорода является обязательным и для активности десатураз (дегидрогеназ; НФ 1.3.1), ферментов, катализирующих образование ненасыщенных жирных кислот из насыщенных [7, 9].

Известно, что тюлени, к которым относится байкальская нерпа, являются превосходными ныряльщиками и большую часть времени находятся под водой. Установлено, что под водой тюлень потребляет только 25% кислорода, расходуемого в состоянии покоя на воздухе [10, 11]. Можно предположить, что длительная адаптация байкальской нерпы к жизни в воде, связанной с нырянием для добычи корма, привела к необходимости экономного расходования кислорода мозгом. На основании сообщенных в настоящей работе результатов можно сделать вывод, что в головном мозгу байкальской нерпы конкуренция кислородзависимых ферментов за кислород привела к снижению активности гидроксилаз и десатураз и, как следствие этого, к снижению содержания моноеновых нормальных кислот и гидроксикислот в цереброзидах и их сульфоэфирах.

FATTY ACIDS OF CEREBROSIDES AND SULPHOCEREBROSIDES IN THE BRAIN OF THE BAIKAL SEAL

LEVITINA M. V.

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

The molar ratio of cerebrosides esterified with hydroxy fatty acids to cerebrosides esterified with normal fatty acids was much lower in the brain of Baikal seal (*Phoca sibirica*), as compared with terrestrial mammals (1.1 and 2.0±0.3 respectively). However, the ratio of sulphocerebrosides esterified with hydroxy fatty acids to those esterified with normal fatty acids in the brain of the seal and terrestrial mammals is similar. Very high proportion of saturated fatty acids is characteristic of cerebrosides and sulphocerebrosides with hydroxy fatty acids (up to 98—

100%). Unusually high percentage of saturated fatty acids was also found in glycolipids esterified normal fatty acids in the brain of the seal. These results are discussed in relation to adaptation of the Baikal seal to diving.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Rouser G., Fleischer S., Yamamoto A.* Lipids, v. 5, № 5, p. 494—496, 1970.
2. *Левитина М. В., Абрамова Л. Н., Кренс Е. М.*—В кн.: Физиология и биохимия морских и пресноводных животных, с. 89—129, Л., Наука, 1979.
3. *Nonaka G., Kishimoto Y.* Biochim. Biophys. Acta, v. 572, № 3, p. 432—441, 1979.
4. *Svennerholm L., Stallberg-Stenhagen S.* J. Lipid Res., v. 9, № 2, p. 215—225, 1968.
5. *Singh H., Spritz N., Geyer B.* J. Lipid Res., v, 12, p. 473—481, 1971.
6. *Radin N. S.* Handbook of Neurochem., (ed. A. Lajtha), v. 3, p. 163—177, New York, Plenum Press, 1983.
7. *Harwood J. L.*—In: The lipid handbook, (eds. F. D. Gunstone, J. L. Harwood F. B. Padley), p. 485—503, London, Chapman and Hall, 1986.
8. *Kishimoto Y., Akanuma H., Singh I.* Molec. Cellul. Biochem., v. 28, № 1—3, p. 93—105, 1979.
9. *Мецлер Д.* Биохимия, т. 2, М., Мир, 1980.
10. *Галанцев В. П.* Руководство по физиологии, ч. 3, с. 427—477, Л., Наука, 1982.
11. *Проссер Л., Браун Ф.* Сравнительная физиология животных, М., Мир, 1967.

Поступила 29. V. 1990

НЕЙРОХИМИЯ
т. 9, № 3, 1990

УДК 547.963.3:577.157.7

ИЗМЕНЕНИЕ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК МОЗГА ПРИ ВЫРАБОТКЕ УСЛОВНОГО РЕФЛЕКСА ПАССИВНОГО ИЗБЕГАНИЯ

ДАНИЕЛЯН И. С., МЕЛИКЯН Г. Г., АКОПЯН А. Г., ГАРИБЯН Л. В., ДЖАГАЦПАНЯН И. А., ГАРИБДЖАНЯН Б. Т.

Институт тонкой органической химии АН Армении им. А. Л. Мнджояна, Ереван

В соответствии с современными представлениями молекулярной биологии—одна из важнейших задач нейрохимии—изучение молекулярных механизмов памяти, необходимым элементом которых является синтез ДНК.

Известно, что одной из форм выражения функциональной и метаболической активности ДНК служит процесс метилирования [1].

В настоящей работе изучен нуклеотидный состав ДНК в разных отделах мозга крыс и предпринята попытка выяснить, изменится ли уровень метилирования ДНК в процессе выработки условных рефлексов как модели ретроградной амнезии.

Опыты проводились в дневной период суток на белых беспородных крысах-самцах массой 130—150 г, содержавшихся в одинаковых условиях и обычных камерах, по 15 животных в каждой группе. Для оценки амнезии у крыс вырабатывали условную реакцию пассивного избегания (УРПИ) с последующим применением электрошока в качестве инвестического фактора по модифицированной методике Bures, Buresova [2]. В течение 3-х минут регистрировали время пребывания крыс в светлом и темном отсеках (необученные). Затем в темном отсеке обученные животные дополнительно получали однократный удар током через электродный пол, после чего использовали крыс, достигших максимального электросудорожного припадка. Проведение электрошока непосредственно после обучения вызывало стирание памятного следа. Тест на воспроизведение осуществляли через 24 часа у обеих групп животных.

Животных забивали декапитацией и извлекали кору больших полушарий и мозжечок. Из извлеченных органов выделяли ДНК по модифицированному методу Мармура [3]. Полученные препараты содержали не более 1,5—2% белка и РНК. Для определения нуклеотидного состава ДНК, включая 5-МЦ, препараты ДНК высушивали при 105°С и гидролизовали до оснований (99% муравьиная кислота, 175°С, 30 мин.). Основания разделяли с помощью двукратной одно-

мерной восходящей хроматографии на бумаге в растворителе н-бутанол : вода : аммиак (60 : 10 : 0,1) и определяли спектрофотометрическим методом [4].

Изучение мнестических функций мозга крыс показало, что при воспроизведении процедуры через 24 часа обученные крысы забывали навыки так же, как и необученные животные и предпочитали находиться в темной части камеры.

Таблица

Нуклеотидный состав ДНК из разных отделов мозга крыс с ретроградной электрошоковой амнезией (n=6)

Отдел мозга	Группа животных	Основания в ДНК мол. %					Г + Ц / А + МЦ
		Г	А	Ц	5-МЦ	Т	
Кора больших полушарий	необученные	21,7	28,4	20,9	1,02±0,19	28,1	43,6
	обученные	21,5	28,5	20,6	1,68±0,17	28,4	43,7
Мозжечок	необученные	21,6	28,3	20,5	0,74±0,24	28,4	42,8
	обученные	21,3	28,4	20,4	1,16±0,11	28,4	42,8

Примечание. Г—гуанин, А—аденин, Ц—цитозин, 5-МЦ—метилцитозин, Т—тимин.

Данные, приведенные в таблице, показывают, что содержание 5-МЦ в суммарной ДНК коры больших полушарий после выработки условного рефлекса было на 64,7% выше, чем у необученных крыс (1,02±0,19 и 1,68±0,17 моль соответственно), а в суммарной ДНК мозжечка заметных изменений в уровне метилирования не наблюдается. При этом нуклеотидный состав изученных ДНК не изменялся и соответствовал правилам Чаргаффа.

Выявленное увеличение степени метилирования ДНК коры больших полушарий свидетельствует о том, что геном клеток мозга не остается безучастным при образовании условно-рефлекторной связи и сам претерпевает при этом заметные структурные изменения. Эти изменения обнаружены в тех структурах мозга (кора больших полушарий), которые связаны с условно-рефлекторной деятельностью и формированием памяти.

Эти данные согласуются с результатами, полученными ранее при выработке у крыс других условных рефлексов (пищевых, оборонительных), при этом индуцируемое обучением метилирование ДНК имело обязательно обратимый характер [5]. Следовательно, выявленный эффект представляет собой ответ общего характера, возникший при обучении, и может отражать уровень функциональной активности клеток.

Мы склонны считать, что индуцируемое обучением увеличение степени метилирования вызвано, во-первых, интенсификацией синтеза ДНК в коре больших полушарий [6], во-вторых, обусловлено репаративным синтезом ДНК, который сопровождает выработку условных

рефлексов у животных и является процессом, дополняющим индуцированный обучением синтез ДНК [7]. Поскольку ДНК в клетке не инертна, то физиологические повреждения, возникающие при обучении, являются сигналом к репарации и приводят к восстановлению целостности генома. Основной путь репарации физиологических повреждений ДНК, по-видимому, заключается в выщеплении возникающих при обучении дополнительных остатков 5-МЦ и репарации получающихся брешей.

Известно также, что при обучении крыс происходит значительная активация нуклеаз в головном мозгу [8].

Наконец, индуцируемое суперметилирование ДНК в коре больших полушарий головного мозга может рассматриваться в качестве механизма дифференциальной транскрипции [9], которая сопровождается появлением в клетках мозга новых РНК [10] и белков [11].

Представленные данные позволяют сделать вывод о том, что одним из биохимических механизмов связи генетического аппарата с физиологической функцией нервных клеток при обучении может быть ферментативное метилирование, которое коррелирует с функциональной активностью клеток мозга.

MODIFICATION OF DNA METHYLATION IN THE BRAIN DURING FORMATION OF THE CONDITIONED PASSIVE AVOIDANCE REFLEX

DANIELYAN I. S., MELIKYAN G. G., AKOPYAN A. G., GARIBYAN D. V., DZHAGATSPANYAN I. A., GARIBDZHANYAN B. T.

Mndzhoyan Institute of Fine Organic Chemistry, Academy of Sciences of the Armenian Republic, Yerevan

The base composition of DNA including the level of 5-methylcytosine (5-MC) has been studied in various regions of rat brain (cerebral cortex and cerebellum) during the formation of the conditioned passive avoidance reflex with the subsequent use of electric shock as a model of retrograde amnesia.

It has been established that following the conditioned reflex formation, the content of 5-MC in the cerebral cortex increased by 64·7% as compared with the control. In contrast, no significant changes in DNA methylation were detected in cerebellum.

It is proposed that the process of conditioned reflex formation is associated with modification of the genome, and enzymatic methylation of DNA correlates with the functional activity of brain cells.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Третьяк Т. М.* Успехи соврем. биол., т. 100, № 1(4), с. 20—28, 1985.

2. *Lynch J., Baudry O. G.* et al. Physiol. Psychol., v. 56, p. 268—274, 1978.

3. *Романов Г. А., Кирьянов Г. И., Дворкин В. М., Ванюшин Б. Ф.* Биохимия, т. 41, № 6, с. 1038, 1976.
4. *Ванюшин Б. Ф.* Современные методы в биохимии, М., Медицина, с. 236, 1964.
5. *Ванюшин Б. Ф., Тушмалова Н. А., Гуськова Л. В., Демичкина Н. П., Никандрова Л. Р.* Мол. биология, т. II, № 1, с. 181—187, 1977.
6. *Ашапкин В. В., Романов Г. А., Тушманова Н. А., Ванюшин Б. Ф.* Научные доклады высшей школы. Биологические науки, № 11, с. 30—34, 1981.
7. *Иванов В. А., Тушмалова Н. А.* Успехи соврем. биол., т. 106, № 2(5), с. 163—178, 1988.
8. *Третьяк Т. А., Семенова Т. П., Смирнова Н. М.* Физиол. журн. СССР, т. 65, № 4, с. 507—512, 1979.
9. *Adams R. L. P., Burdon R. H. CRC.* Crit. Rev. Biochem., v. 13, p. 349, 1982.
10. *Galto J., Bonnet K.* Psychol. Rev., v. 75, p. 109, 1971.
11. *Ашмарин И. П.* Загадки и открытия биохимии памяти. Изд-во ЛГУ, с. 159, 1975.

Поступила 17. VIII. 1990

НЕЙРОХИМИЯ
т. 9, № 3, 1990

УДК 616—092.4/9+612.041.1

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ СОДЕРЖАНИЯ α-ТОКОФЕРОЛА В МОЗГОВОЙ ТКАНИ В РАЗНЫХ СТАДИЯХ КОРАЗОЛОВОЙ ЭПИЛЕПСИИ

*МАРТИРОСЯН М. А., КАРАГЕЗЯН К. Г., ХАНБАБЯН М. В., САРКИСЯН Л. В.

Институт экспериментальной биологии АН Армении,
*Армянский педагогический институт им. Х. Абовяна

Исследованиями последних лет показано усиление перекисного окисления липидов (ПОЛ) [1—4] при судорожной активности. Предварительное введение в организм антиоксидантов, например, ионола [5], пегинола, фенозана [6], α-токоферола [7] и других приводит к лимитированию интенсивности течения ПОЛ и ослаблению эпилептического припадка. В нормальных условиях антиоксидантной системе организма отводится важная роль в стабилизации процессов ПОЛ, что особенно отчетливо проявляется при различных патологических и экстремальных состояниях организма [8—10]. С этой точки зрения особый интерес представляет изучение особенностей метаболизма α-токоферола в мозгу, как одного из важнейших звеньев антирадикальной защиты организма в процессе развития эпилептической активности. Так, данные по содержанию α-токоферола в мозговой ткани были продемонстрированы при бемегридовой [9], пенициллиновой [9] и других формах экспериментальной эпилепсии. В настоящей работе мы преследовали цель проследить за динамикой изменений содержания α-токоферола в определенных областях головного мозга крыс.

Опыты проводили на белых беспородных крысах массой 160—180 г. Первично-генерализованную эпилепсию вызывали внутрибрюшинным введением коразола в дозе 45 мг/кг. Крыс декапитировали через 2 мин (в предсудорожном периоде), 6—10 мин (в период генерации судорог) и через 1 ч после введения конвульсанта. Свободный α-токоферол определяли в тканях мозжечка и коры больших полушарий на флюоресцентном спектрофотометре «Hitachi», модель MRGAA (Япония) при максимуме возбуждения 270 и максимуме флюоресценции 330 нм.

В пробирку с притертой пробкой к 1 мл гомогената добавляли 1 мл дистиллированной воды, 2 мл абсолютного спирта и после тщательного перемешивания 4 мл гексана. Содержимое интенсивно встряхивали 30 мин и центрифугировали при 4000 об/мин в течение

10 мин. 1 мл чистой органической фазы растворяли в 3-х объемах абсолютного спирта и измеряли флюоресценцию образующейся смеси.

Как видно из приведенного рисунка, в период развитого коразолового припадка содержание α-токоферола в мозжечке сохраняется на уровне контроля, а в коре больших полушарий его дефицит составляет примерно 25%. Аналогичные указания приведены и в литературе [9]. В предсудорожном периоде и после эпилептического припадка содержание α-токоферола в исследованных отделах мозга увеличивается. Так, в коре больших полушарий этот прирост составляет примерно 125%, а через 1 ч он превосходит контрольный уровень как в коре, так и мозжечке приблизительно в 2—3 раза.

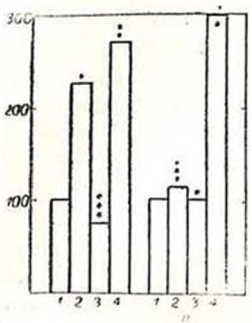

Рисунок. Содержание эндогенного α-токоферола (%) в коре больших полушарий (I) и мозжечке (II) в разных стадиях эпилептического припадка, вызванного коразолом. *1*—контроль, *2*—до припадка, *3*—во время припадка, *4*—через 1 ч после введения коразола. *$p<0,001$; **$p<0,002$; ***$p<0,0001$.

Вышеуказанное свидетельствует о том, что в преддверье формирования эпилептического припадка в организме животного идут процессы активации системы антирадикальной защиты. Однако чрезмерная генерация активных форм кислорода в период отчетливо проявляющегося эпилептического припадка, по всей вероятности, превышает физиологические возможности антиоксидантной системы организма. Этот факт находит свое подтверждение в полученных нами ранее данных по интенсификации процессов ПОЛ в период припадка [11]. Естественно, что накопление высоких концентраций липидных перекисей в тканях чревато максимальной мобилизацией антиоксидантной системы организма, проявляющейся в повышении уровня α-токоферола в постсудорожном периоде. По всей вероятности, описанные количественные сдвиги антиоксидантов играют существенную роль в формировании компенсаторно-приспособительных реакций организма. Такая тенденция к балансированию между образованием и элиминацией свободных радикалов лежит в основе поддерживания свободнорадикального гомеостаза.

THE DYNAMICS OF CHANGES IN α-TOCOPHEROL CONTENT IN BRAIN TISSUE AT THE VARIOUS STAGES OF CORAZOL EPILEPSY

*MARTIROSIAN M. A., KARAGUEZIAN K. G., CHANBABIAN M. V., SARKISIAN L. V.

Institute of Experimental Biology, Academy of Sciences of the Armenian Republic, Yerevan
*Armenian Pedagogical Institute, Yerevan

The dynamics of changes in α-tocopherol content in albino rats brain cortex and cerebellum during primary-generalized corazol epilepsy have been studied. The uniformity of the changes in the both regions of brain have been shown. Some increase in the α-tocopherol level before fit has been changed into its nonsufficient decrease during the convulsion generation. After one hour the amount of α-tocopherol excelled the control indices approximately 2 –3 times. This changes testify to compensatory—adaptive role of the organism antyoxidant system during corazol-induced peroxide intoxication.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Крыжановский Г. Н., Никушкин Е. В., Браславский В. Е., Глебов Р. Н.* Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 89, № 1, с. 14—16, 1980.
2. *Меграбян А. А., Мхитарян В. Г., Адамян М. Г.* Журн. невропатол. и психиатрии, т. 86, № 9, с. 1409—1416, 1986.
3. *Никушкин В. Е., Браславский В. Е., Крыжановский Г. Н.* Журн. невропатол. и психиатрии, т. 81, № 6, с. 810—815, 1981.
4. *Triggs W. J., Willmor L. J. J.* Neurochem., v. 43, № 4, p. 976—980, 1984.
5. *Никушкин В. Е., Браславский В. Е., Крыжановский Г. Н.* Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 90, с. 696—698, 1980.
6. *Архипова Г. В., Бурлакова Е. Б., Семиохина А. Ф., Федотова И. Б., Крушинский Л. В.* Докл. АН СССР, т. 267, с. 469—471, 1982.
7. *Крыжановский Г. Н.* Журн. невропатол. и психиатрии, т. 76, с. 1730—1735, 1974.
8. *Симонян М. А., Табачникова С. И., Громов Л. А.* Нейрохимия, т. 3, № 2, с. 124—129, 1984.
9. *Тупеев И. Р., Бордюков М. М., Крыжановский Г. Н., Никушкин Е. В.* Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 100, № 11, с. 538—541, 1985.
10. *Chance B., Sies H., Boveris A.* Physiol. Rev., v. 59, p. 527—607, 1979.
11. *Мартиросян М. А., Овсепян Л. М., Саркисян Л. В., Ханбабян М. В., Карагезян К. Г.* Биол. журн. Армении, т. 42, № 11, 1989.

Поступила 3. IX. 1990

НЕЙРОХИМИЯ
т. 9, № 3, 1990

НАУЧНЫЕ ДИСКУССИИ

УДК 612.8.015

ПОЛУПРОВОДНИКОВЫЕ МОДУЛИ МЕМБРАН МОЗГА

ТУМАНОВА С. Ю.

Ленинградский государственный университет

Предполагается, что мембраны мозга состоят из дискретных липидных и липид-белковых модулей, работающих как органические полупроводники, преобразующие электромагнитную информацию. Глия является хранилищем информации, записанной на жидких кристаллах.

В 1984 г. Стивенс писал: «Хотя нейроны имеют те же самые гены, то же самое общее строение и тот же самый биохимический аппарат, что и другие клетки, они обладают уникальными особенностями, которые делают функцию мозга совершенно отличной от функций других органов» [1]. Конкретно объяснить это явление в настоящее время трудно. Искать ответ необходимо, как считает Крик, «через новые методы исследования и новые системы понятий» [2]. В цитируемой статье Ф. Крика слова мозг и компьютер стоят рядом, хотя автор предостерегает от их отождествления.

Для обоснованности дальнейших рассуждений следует кратко охарактеризовать рабочие единицы компьютера. Ими являются легированные донорно-акцепторными элементами кристаллические полупроводники из кремния или германия, преобразующие электромагнитные колебания самого широкого диапазона.

Мы можем услышать интонации знакомого голоса, не слыша его в данный момент, и можем представить черноморский пейзаж, находясь в Ленинграде. Следовательно, наш мозг записывает звук, цвет и графически полное изображение мира и затем в нужный момент каким-то мыслительным актом генерирует это в нашем сознании. Для выполнения таких функций высокоспециализированные мембраны мозга должны иметь особые приборы.

В вышеупомянутой статье Крик выражал сожаление, что «нервная система сделана не из металла или неорганических полупроводников, а из специализированных клеток». Развивая его мысль дальше, можно утверждать, что специализированные мембраны мозга состоят из органических полупроводников, способных получать, обрабатывать, передавать и сохранять электромагнитную информацию в головном

мозгу. Что может в мембранах мозга претендовать на роль таких органических полупроводников?

Мозг отличается от других органов прежде всего высоким содержанием липидов, которые составляют 50—80% его сухого веса. Липиды имеют самый большой процент углерода (78%) по сравнению с белками (55%) и углеводами (44%), поэтому мембраны мозга обогащены углеродом.

Углерод—элемент того же периода таблицы Менделеева, что кремний и германий, которые имеют одинаковое число электронов (4) на внешней орбите, одинаковую валентность, аналогичность кристаллических решеток и сопоставимую электронную проводимость. Если кремний и германий являются основой неорганических полупроводников, то углерод является основным элементом органических полупроводников. Кстати, сейчас в микропроцессорной технике широкое распространение получили углеродные эквалайзеры—регуляторы частот в широком диапазоне.

Липиды в мембранах находятся преимущественно в жидкокристаллическом состоянии. Общеизвестно, что жидкие кристаллы липидов ведут себя как полупроводники, изменение электронной проводимости которых достигается термо- или лиотропным переходом в твердокристаллическое состояние. Таким образом в мембранах сосуществуют жидкие и твердокристаллические электромагнитные приборы—состояние, пока трудно достигаемое в технике.

Жидкокристаллическое состояние липидов в мембране имеет несколько уровней организации: нематики, смектики, холестерики, каждое из которых характеризуется непредсказуемым разнообразием ориентации молекул, влияющей на электронную проводимость. Техника пока только ищет материалы, которые сочетали бы в себе свойства нематиков, смектиков, холестериков. В мембранах мозга эти состояния не только сосуществуют, но находятся в тонко регулируемом динамическом равновесии. Обратимые переходы жидкокристаллических состояний вызываются изменениями ионной силы, pH, температуры, примесями, белковыми молекулами. Каждый уровень жидкокристаллической организации имеет свою электронную проводимость и все типы жидких кристаллов по-разному, но очень долго хранят электрическую, магнитную и оптическую информацию.

Не следует забывать о том, что молекулы из углерода имеют асимметричный атом, что наделяет эти молекулы очень лабильной оптической осью. В жидких кристаллах оптическая ось особенно легко управляема электрическим полем. В зависимости от исходной ориентации жидкого кристалла, амплитуды и частоты приложенного импульса может иметь место интерференция. Явление интерференции в мембранах позволяет сделать скачок к голографии.

Жидкие кристаллы самым непосредственным образом связаны с голографией, в которой полная информация об объекте записывается в виде интерференционной картины на жидкокристаллический трач-

спорант. Результирующая запись несет как информацию об амплитуде сигнального луча, так и его запаздывании, то есть получается объемное изображение предметов. Жидкокристаллический транспорант играет роль преобразователя электрических сигналов в оптический образ, который может считываться. В технике с таких транспорантов идет считывание с высочайшей скоростью, а как в головном мозгу?

Каждый участок жидкокристаллического транспоранта с записью несет информацию об объекте в целом. Утрата даже небольшого участка транспоранта приводит лишь к очень незначительному ухудшению записи, но не потери записи, если она была высококачественной. Голограммы очень компактны, громадная информация может быть записана в малом объеме и эта запись очень помехоустойчива. Можно утверждать, что в нейрональных и глиальных мембранах находятся целые наборы жидкокристаллических транспорантов, в которых может быть не один механизм создания образов.

Существующие обширные жидкокристаллические области в мембранах мозга должны каким-то образом быть закреплены. Техника в настоящее время ищет полимерные подложки, на которых можно было бы закрепить жидкие кристаллы. В мембранах мозга опорой липидных жидкокристаллических областей являются интеркалированные в них белки. Конечно, полимерные молекулы белков не только опора. Донорно-акцепторное взаимодействие полимерного белка с жидким липидным кристаллом создает всю специфичность полупроводниковых свойств дискретных липид-белковых электромагнитных модулей мембран мозга.

Природа такого взаимодействия будет определять электромагнитные характеристики дискретных модулей мембран. Можно утверждать, что модули мозга могут быть полноправными генераторами, усилителями, регуляторами и преобразователями электромагнитных колебаний. Но в отличие от неорганических полупроводников модули мозга работают с минимальными запускающими токами, а выход дают на несколько порядков выше.

Электронная проводимость полупроводников из кремния или германия модифицируется специально подобранными донорными или акцепторными примесями, причем достаточно ввести один атом примеси на 10 млн. атомов полупроводника. Донорными примесями элементов IV периода является фосфор. Неудивительно, что полупроводниковые модули мембран мозга на 70% состоят из фосфолипидов.

Стивенс пишет: «Большинство современных исследований нейрона сосредоточено на мембранных белках, наделяющих двухслойную клеточную мембрану, которая сама по себе лишена каких-либо особенностей, специфическими свойствами, определяющими функционирование мозга» [1]. Исходя из этого следует, что более 50% структурного материала мембраны лишено вклада в деятельность нейрона. Согласиться с таким положением нельзя. Необходимо несколько подробнее рассмотреть липиды и их организацию в мембране.

При ограниченном числе основных классов фосфолипидов, гликo-

липидов, глицеридов и стероидов количество индивидуальных представителей липидов в головном мозгу с учетом жирнокислотного состава необычайно велико. Так, число индивидуальных фосфолипидов миелина достигает 1500. Природа—экономный изобретатель и недаром наделила мембраны мозга таким липидным разнообразием.

Липиды в мембранах организованы в бислой с асимметричным размещением индивидуальных представителей во внешнем и внутреннем монослоях. В мембранах существует поперечная и планарная микрогетерогенность липидного бислоя. Допускается, что 20% липидов бислоя находятся в короткорадиусных взаимодействиях с белками, а 80% составляют пул, не занятый белком. Таким образом, в мембранах есть материальная база для дискретных липидных и липид-белковых модулей. Врожденные нарушения липидного обмена являются неопровержимыми доказательствами того, что в мембранах существует строгая матричная детерминированность распределения всего разнообразия липидных молекул. Липидозы, которые всегда сопровождаются серьезными умственными и психическими нарушениями, демонстрируют не только важность присутствия определенных липидов в мембране, но и исключительную значимость всех элементов липидной структуры, будь то жирная кислота, положение двойной связи или заместители.

Генетически обусловленное сочетание индивидуальных фосфо-, глицеро- и гликолипидов и стероидов создает для каждого типа мембран уникальный набор дискретных жидко- и твердокристаллических модулей со специфическими электромагнитными характеристиками и информационной емкостью. Белковые молекулы, входящие в состав модулей, являются модификаторами проводимости, причем в процессе модификации очень интересная роль должна принадлежать фосфорилированию белков. Встает вопрос о липид-белковом составе каждого типа модулей и об их размерах. Миниатюризация, происходящая в технике, добилась того, что полупроводниковый преобразователь, содержащий тысячу атомов, хорошо работает, а как в мембранах мозга?

Необходимо выяснить, охватывает ли дискретный модуль монослой или бислой, поскольку известны дифференцированные по монослоям фазовые переходы липидов, и чем в мембранах поддерживается дискретность модулей. Возможно, частично она обусловливается холестерином, чей сегрегирующий эффект в мембранах хорошо известен, хотя не следует забывать об его исключительной информационной роли в качестве жидкокристаллической слоистой холестерической спирали.

Дискретность электромагнитных модулей может обеспечиваться белками, которые, разграничивая их, могут специфически модифицировать электронную проводимость модулей, вызывая обратимый переход: диэлектрик—полупроводник—проводник.

Возможно, что дискретные модули мембран имеют свой состав ионных каналов, т. е. специфичность модуля обусловливается при-

родой ионного канала. Известно, что нейроны имеют 6—7 типов ионных каналов, а аксоны—2 типа. Закрытое или открытое состояние ионных каналов определяет проводимость модулей, рабочее же напряжение их поддерживается пассивным или активным транспортом ионов.

Модули разных полупроводниковых характеристик реагируют неодинаково на один и тот же медиатор, что может объяснить, почему один и тот же медиатор один нейрон возбуждает, а другой тормозит. По-видимому, правильнее рассматривать действие эффекторных молекул (гормонов, медиаторов, нейропептидов, простагландинов и т. д.) в свете изменения электронной проводимости модуля и изменения им способа обработки кодированного по частоте нервного импульса.

Безусловно, что каждый функционально дискретный полупроводниковый модуль имеет свою поверхностную маркировку. Маркированность липидных модулей осуществляется ганглиозидами. Большое разнообразие ганглиозидов в мембранах мозга позволяет предполагать в мозгу соответствующее разнообразие липидных модулей. Возможно, что в мембранах мозга дискретные модули объединены в функциональные блоки. Тогда мембрана нейронов и глиальных клеток может работать как микропроцессор с набором специальных жидкокристаллических приборов, аналогичных техническим диодам, триодам, дозаторам, стабилитронам, диинсторам, тиристорам, транзисторам, которые в разном сочетании способны полно и эффективно осуществлять многообразные функции приема, преобразования, передачи и хранения электромагнитной информации.

В головном мозгу имеется от 10 до 100 млн. нейронов (до 100000 в 1 мм^2) и во много раз больше глиальных клеток. Значит число полупроводниковых приборов в мозгу не меньше, чем в самом совершенном компьютере. В мембранах мозга полупроводниковый модуль работает не в одном режиме, поэтому информационноперерабатывающая емкость всей нейронально-глиальной системы неучитываемо велика.

Можно предположить, что мембраны зрительной коры содержат модули, преобразующие световые электромагнитные колебания, в которых больше свето- и фотодиодов. В свою очередь, в слуховой коре должны быть модули, меняющие электронную проводимость в звуковом диапазоне колебаний. Вероятно, у людей, одаренных музыкально, генетически усилена оснащенность мембран такого типа модуляции, и в мозгу таких людей могут рождаться необычайные звуковые сочетания, переходящие в причудливые арабески симфоний.

Можно с уверенностью утверждать, что ДНК клеток мозга не принимает участия в переработке, записи, хранении и воспроизведении текущей составляющей жизненный опыт человека информации. Генетический аппарат обеспечивает полную молекулярную оснащенность, чтобы должное происходило в должное время и в должном

месте. ДНК абсолютно топографически точно собирает модули в мембраны и через обратную связь обеспечивает встраивание новых комбинаций модулей, но не определяет, какая ими будет обрабатываться информация. Например, способность к речи требует высокоразвитого механизма в головном мозгу, который совершенно очевидно зависит от генетических процессов. Но тот конкретный язык, на котором говорит человек, не обусловлен генетически, а почти полностью определяется фактором среды, принадлежностью к той или иной культуре [3].

Наша повседневная мыслительная деятельность—это переговариваемость между собой жидких кристаллов, чей электромагнитный язык генерирует в нашем сознании всю цветовую, звуковую и графическую многогранность мира.

Нет сомнения, что процессы записи и хранения информации в мозгу компартментализированы. Хранилищем записанной на жидких кристаллах информации в головном мозгу является глия и в этом её главное предназначение. Глиальные мембраны содержат больше липидов, чем нейрональные и представляют собой жидкокристаллический банк с голографической и электромагнитной памятью. Память человека и объем его знаний находится в прямой связи с количеством и заполненностью глиальных хранилищ.

К каждой группе нейронов прилегает своя глия. Нейрон активно перерабатывает приходящие импульсы и передает их в глию по миелиновым волокнам, приуроченным, возможно, к проведению строго определенных частот. Недавно в миелине были обнаружены совершенно предельные углеводороды с числом атомов углерода от 21 до 35. Если вспомнить, что регуляторы частот эквалайзеры состоят из углерода, то можно предположить, что алканы в миелине способствуют разночастотному проведению.

В глии информация накапливается и хранится, а не модифицируется. Информация синхронизированно считывается с разных областей глии, давая ассоциативные и логические представления. Пока неясно, какой мыслительный акт инициирует специфический набор считывающих импульсов и как электромагнитные модули мембран комбинируются для создания языка гораздо более сложных мыслительных процессов.

Крик отмечал, что «те проблемы, которые связаны со множеством одновременных взаимодействий, мало продвигаются вперед..., надо отделить небольшую часть системы и изучать сравнительно оторванно от всей остальной системы» [2]. Привлечение внимания читателей к полупроводниковым модулям мембран в качестве нового подхода в изучении функции мозга весьма своевременно. Весной 1989 г. в Японии начал разрабатываться национальный проект «Нейрокомпьютер», в четырех разделах которого первое место занимает теория и фундаментальные исследования. В Европе создана совместная полупроводниковая кремниевая инициатива, которая будет производить кристаллы памяти емкостью 16—64 Мбит. В Америке начали работать

так называемые кремниевые менестрели — новейшие приборы передачи звука.

Исходя из предложенного подхода, можно по-новому взглянуть на ряд проблем. Например, сон следует рассматривать как циркадное переключение таймером мембранных модулей, возможно, за счет перевода их работы с активного на пассивный транспорт ионов. Сновидения, возникающие перед пробуждением, обусловлены включением мембранных модулей с определенной латентностью и потому непредсказуемом, отрывочном считывании с модулей, что порождает причудливость, нереальность снов.

При лечении эпилепсии, видимо, надо в эпилептогенные зоны вводить мембранотропное, синтетическое вещество, отличающееся сильными акцепторными свойствами. Эти блокаторы, принимая электроны, снижали бы проводимость отдельных модулей и предотвращали бы припадок.

По-иному можно объяснить галлюцинации: не так и не с тех транспарантов считывается информация или не по тем кабелям передается в глию, или искажен механизм записи.

Явление доминанты можно рассматривать как генетически обусловленную материальную предрасположенность человека к тому или другому типу электромагнитных модулей.

Необычайно актуален вопрос о том, как сохраняется информация в течение всей жизни в жидкокристаллических областях при постоянно проходящем обновлении липидных и белковых молекул. Нельзя не упомянуть того факта, что обновляемость молекул глиальных мембран происходит во много раз медленнее, чем молекул нейрональных мембран. Тем не менее в мембраны встраиваются молекулы, которые не присутствовали при записи информации.

Если набор модулей в мембранах генетически детерминирован, то можно через генную инженерию внедрять в мембранах модули, обеспечивающие наиболее оптимальное выполнение специфических функций мозга. В будущем можно подойти к регулируемости интеллекта и коррекции его нарушений.

Несомненно, что люди отличаются по способностям из-за различной оснащенности мембран модулями, их синхронизированной работой на всех звеньях и оптимальной обеспеченности процессов записи и считывания информации.

В литературе накоплен большой арсенал данных о липидном и белковом составе мембран мозга, но он не анализировался. Необходимо сосредоточить усилия для детального выяснения из каких липидов и белков возникает элементарная полупроводниковая единица, учитывая структурную и химическую аффинность между определенными липидами и белками, и какие блоки собираются из разновидностей полупроводниковых единиц. Накопление таких данных объяснит, почему экстрасенсы являются мощными генераторами электромагнитных излучений и почему некоторые люди обладают способностью считывать с информационного поля Земли.

SEMICONDUCTOR MODULES OF BRAIN MEMBRANES

TUMANOVA S. Yu.

Leningrad State University.

Hypothetically, brain membranes consist of discrete lipid and lipid-protein modules which may be regarded as organic semiconductors. These semiconductors transform electromagnetic information. Glia serves as liquid crystal bank of information.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Стивенс Ч.*—В кн.: Мозг, с. 31—58, М., Мир, 1984.
2. *Крик Ф.* — В кн.: Мозг, с. 257—275, М., Мир, 1984.
3. *Кити С.* — В кн.: Мозг, с. 241—256, М., Мир, 1984.

Поступила 24. I. 1990

НЕЙРОХИМИЯ
т. 9, № 3, 1990

ПИСЬМА В РЕДАКЦИЮ

УДК 577.152.3—547.963

НОВЫЕ ГИПОТАЛАМИЧЕСКИЕ КАРДИОТРОПНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ—УНИВЕРСАЛЬНЫЕ АКТИВАТОРЫ БАЗАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ КАЛЬМОДУЛИНЗАВИСИМЫХ ФЕРМЕНТОВ

ГАЛОЯН А. А., ГУРВИЦ Б. Я.

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

В составе препарата кардиотропного нейрогормона «С», выделенного из гипоталамуса быка [1, 2], ранее нами были обнаружены три кальцийнезависимых активатора высокоочищенной кальмодулин (КМ)-зависимой ФДЭ [3, 4]. Эти активаторы были нами названы С-модулинами в связи с их КМ-подобными эффектами, а также на основании предположения о том, что они являются регуляторами кардиотропного действия нейрогормона «С». С-модулины были очищены до гомогенного состояния с помощью обратно-фазовой ВЭЖХ и гель-фильтрации; величины их M_r составляют 3—8 кД. Наибольшую активность проявлял С-модулин с $M_r \sim 4$ кД. Была установлена способность С-модулинов стимулировать базальную активность ФДЭ в 6—10 раз в отсутствие КМ и Ca^{2+}. Кинетический анализ стимулирующего действия С-модулинов выявил их высокое сродство к ферменту. Кажущаяся K_a комплекса активатор-фермент составляла 10 нг/мл.

Полученные результаты позволили предположить, что С-модулины, подобно КМ, являются стимуляторами базальной активности не только ФДЭ, но и других КМ-зависимых ферментов. Исследования действия С-модулинов на киназу легких цепей миозина (КЛЦМ), КМ-зависимую протеинкиназу (ПК), киназу фосфорилазы, а также на 5′-нуклеотидазу (5′-НК) подтвердили это предположение.

КЛЦМ была выделена из скелетных мышц кролика до состояния, близкого к гомогенному, с применением аффинной хроматографии на КМ-сефарозе. Выделенная таким образом КЛЦМ не обладала ферментативной активностью даже при добавлении Ca^{2+}, что свидетельствовало о ее полном отделении от эндогенного КМ. Внесение в инкубационную смесь КМ вызывало максимальную активацию фермента. Степень фосфорилирования легких цепей-2 (ЛЦ$_2$) миозина под действием КЛЦМ в присутствии 5 мМ Mg-АТР регистрировали по

увеличению электрофоретической подвижности фосфорилированных $ЛЦ_2$ по сравнению с дефосфорилированными при электрофорезе миозина из скелетной мышцы кролика в ПААГ в присутствии 8 М мочевины.

Обнаружено, что добавление С-модулинов ($С_1$, $С_2$ или $С_3$) к препарату КЛЦМ, отделенной от КМ, вызывает сильную активацию фермента. По данным электрофореза, в ПААГ дефосфорилированные $ЛЦ_2$ в отсутствие С-модулинов фосфорилировались до 100% при добавлении в инкубационную среду наномолярных концентраций каждого из С-модулинов. Условия эксперимента подбирались таким образом, чтобы аналогичное количество фермента в присутствии избытка экзогенного КМ и Ca^{2+} вызывало лишь частичное фосфорилирование $ЛЦ_2$ (до 30%). Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что С-модулины, обладающие высоким сродством к ферменту, являются более мощными по сравнению с КМ активаторами КЛЦМ.

При этом чрезвычайно важен тот факт, что наблюдаемый эффект, в отличие от действия КМ, является Ca^{2+}-независимым. Он проявлялся в присутствии в инкубационной смеси 2 мМ ЭГТА, и при замене ЭГТА на $CaCl_2$ степень активации КЛЦМ под действием С-модулинов не изменялась.

В присутствии КМ стимулирующее действие С-модулинов тормозилось, а в некоторых случаях наблюдался ингибирующий эффект.

Нами было также исследовано действие С-модулинов на КМ-зависимую $ПК_2$ из мозга крысы. Базальная активность выделенного на КМ-сефарозе фермента сохранялась на низком уровне и в присутствии Ca^{2+} и не снижалась при добавлении ЭГТА, что свидетельствовало об отсутствии в препарате фермента эндогенного КМ. При этом $ПК_2$ проявляла высокую чувствительность к активации экзогенным КМ.

Внесение в инкубационную среду, не содержащую Ca^{2+} и КМ, С-модулинов стимулировало базальную активность $ПК_2$ в 3—5 раз. В качестве субстрата использовался основной белок миелина. Интересен также тот факт, что $ПК_2$, активированная под действием КМ, тормозилась в присутствии С-модулинов.

Необходимо привести также полученные нами ранее данные об активации С-модулинами 5′-НК [5]. Хотя 5′-НК не входит в число классических КМ-зависимых ферментов, она способна активироваться под действием Ca^{2+}, а также КМ в комплексе с Ca^{2+}. 5′-НК по своим свойствам проявляет значительное сходство с КМ-зависимыми ферментами, способными активироваться Ca^{2+} в отсутствие экзогенного КМ. Характерным примером этих ферментов является киназа фосфорилазы, которая может стимулироваться Ca^{2+} двумя путями. Активирующий эффект возникает при взаимодействии Ca^{2+} с КМ, который, как известно, входит в качестве субъединицы в состав фермента, а также в результате связывания Ca^{2+} в комплексе с КМ с дополнительным Ca^{2+}-связывающим центром.

5′-НК была нами выделена из растворимой фракции гипоталамуса быка с использованием ИОХ на ДЭАЭ TSK, аффинной хроматографии на фенил-сефарозе и на конканавалин-сефарозе. Установлено, что выделенный фермент активировался более чем в 6 раз под действием КМ в комплексе с Ca^{2+}. Полумаксимальный эффект наблюдался при концентрации КМ $5 \cdot 10^{-7}$ М [5]. С-модулины проявляли более высокое сродство к ферменту; суммарная фракция С-модулинов ($C_1+C_2+C_3$) в концентрации 5 мкг/мл стимулировала 5′-НК в 5—8 раз в отсутствие экзогенного Ca^{2+}. При добавлении в инкубационную смесь 10^{-4} М $CaCl_2$ или 10^{-4} М ЭГТА результат не изменялся.

Активирующее действие С-модулинов в отсутствие экзогенного КМ проявлялось также в отношении киназы фосфорилазы.

Итак, полученные результаты позволяют предположить, что С-модулины, подобно КМ, являются универсальными регуляторами различных ферментов. Однако, в отличие от КМ, действие С-модулинов осуществляется Ca^{2+}-независимым способом.

Несомненный интерес представляет обнаруженный нами феномен мощной активации под действием С-модулинов Ca^{2+}-независимого фосфорилирования, катализируемого КМ-зависимыми ПК (КЛЦМ, $ПК_2$ и киназой фосфорилазы). Проведенные нами исследования обогащают современные представления о моделях мышечной сократимости, о роли фосфорилирования, о метаболизме циклических нуклеотидов и гликогена и других процессах. Приведенные результаты свидетельствуют о том, что в основе регуляции этих процессов лежат более сложные, тонкие, Ca^{2+}-независимые механизмы с участием выделенных нами соединений гипоталамуса, действующих в наномолярных, а в некоторых случаях и в никомолярных концентрациях, сопоставимых с их физиологическим уровнем в гипоталамусе.

THE NEW CARDIOACTIVE COMPOUNDS OF HYPOTHALAMUS—UNIVERSAL ACTIVATORS OF BASAL ACTIVITY OF CALCIUM-CALMODULIN DEPENDENT ENZYMES

GALOYAN A. A., GURVITS B. Ya.

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

It was isolated in individual forms polipeptides from the hypothalamus which are activators of calcium-calmodulin-dependent enzymes (myosin light chain kinase, phosphodiesterase, protein kinase etc). Without participation of calcium and calmodulin (substanus C_1, C_2 and C_3). These compounds are universal activators of enzymes. The primary structure of C_1 was estimated.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Галоян А. А.* Докл. АН АрмССР, т. 4, № 3, с. 109—111, 1962.
2. *Galoyan A. A.* Neurochem. Res., v. 11, № 6, p. 769—787, 1986.
3. *Галоян А. А., Гурвиц Б. Я.* Нейрохимия, т. 5, № 4, с. 420—422, 1986.
4. *Галоян А. А., Бобрускин И. Д., Гурвиц Б. Я., Абрамян Г. Э.* Нейрохимия, т. 8, № 1, с. 78—86, 1989.
5. *Галоян А. А., Гурвиц Б. Я., Шарова Н. П., Алексанян С. С.* Нейрохимия, т. 6, № 4, с. 544—551, 1987.

Поступила 15. XI. 1990

Neurobiology of Panic Disorder (Series Frontiers in Clinical Neuroscience, v. 8). ed. C. Ballinger, J. Wiley and Sons, Baffins Lane, Chichester, 410 p., 1990.

Нейробиология панических расстройств

Большинство крупных исследовательских центров по психиатрии изучают в настоящее время расстройства, вызванные паническим состоянием. В настоящем издании представлены новейшие данные в этой развивающейся области нейропсихиатрии, включая нейробиологические аспекты панических расстройств. Особое внимание уделяется расшифровке механизма заболевания и предболезненным состояниям. Книга содержит следующие главы: «Животные модели страха», «Предклинические исследования механизмов тревожных состояний и их лечение», «Изучение панических расстройств на двойниках», «Молекулярная генетика и панические расстройства», «Новые подходы к старым проблемам», «Источники панических заболеваний», «Норадренергическое нарушение регуляции при панических расстройствах», «Паника, вызванная изопротеранолом», «Трибулин и стресс», «Клинические исследования новой нейрохимической системы», «Потенциальные механизмы индукции паники лактатом натрия», «Физиология паники», «Провокация паники кофеином—внимание к биологическим механизмам», «Ось гипоталамус-гипофиз-надпочечники при панических расстройствах», «Биологическое различие между страхом и депрессией», «Страх и иммунная система», «Простагландины—связь с ЦНС и тромбоцитами при панических расстройствах», «Сон при панике и генерализованном страхе».

НЕЙРОХИМИЯ
т. 9, № 3, 1990

ОБЗОРЫ

УДК 577.152.277:612.8.015

ADP-РИБОЗИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ В МОЗГУ И ДРУГИХ ОРГАНАХ

АРУТЮНЯН А. В.

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

В обзоре обобщены литературные данные об эндогенном ADP-рибозилировании у эукариот. Приведен собственный экспериментальный материал и результаты исследований других авторов об особенностях этого процесса в нервной ткани, на основании чего выдвинуто представление о том, что в ней осуществляется широкий круг реакций ферментативного ADP-рибозилирования: поли-ADP-рибозилирование, олиго (ADP-рибозилирование) и несколько типов моно-ADP-рибозилирования. Соответствующие ферменты отличаются субклеточной локализацией и, вероятно, выполняют различные функции в нервной клетке.

Рассмотрен также вопрос об участии белковых факторов мозга в реализации действия бактериальных токсинов, в связи с чем излагаются современные взгляды на роль ADP-рибозилирования в трансдукции сигнала рецепторными системами.

В заключение обсуждаются наиболее важные и перспективные направления дальнейшего исследования процесса ADP-рибозилирования в НС.

ADP-рибозилирование относится к числу наиболее распространенных в природе посттрансляционных модификаций различных клеточных белков. NAD используется в качестве уникального субстрата в этом процессе, являясь донором ADP-рибозы. Существует два типа реакций ADP-рибозилирования: моно- и поли-ADP-рибозилирование, осуществляемые различными ферментными системами. Образующиеся конъюгаты отличаются не только длиной ADP-рибозной цепи, которая может носить как линейный, так и разветвленный характер (рис. 1, *а, б*), но и природой химической связи: N-гликозидной, характерной для моно-ADP-рибозилирования и O-гликозидной—для поли-ADP-рибозилирования [1]. Акцепторными аминокислотами белков в реакциях моно-ADP-рибозилирования являются обычно аргинин, дифтамид (модифицированный остаток гистидина), аспарагин, лизин и, как недавно было установлено, цистеин, а в реакциях поли-ADP-рибозилирования—глутаминовая кислота и лизин (рис. 2).

Началу изучения процессов ADP-рибозилирования положили исследования, проведенные в лаборатории P. Mandel, впервые обнаружившего поли (ADP-рибоза) синтетазную активность и существование полимера ADP-рибозы *in vivo* [2, 3]. Впоследствии было установлено,

что связанная с хроматином поли (ADP-рибоза) синтетазная активность катализирует перенос остатков ADP-рибозы с NAD на гистоны и другие ядерные белки [4, 5]. Было накоплено много данных, свидетельствующих о том, что физиологическая значимость реакций поли-ADP-рибозилирования связана с модификацией структуры и функции хроматина. Поли (ADP-рибоза) синтетаза абсолютно зависима от ДНК, активность фермента не проявляется в отсутствие ДНК или ее

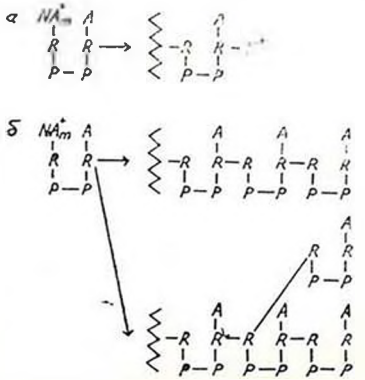

Рис. 1. а. Синтез моно-ADP-рибозил-белков, катализируемый ADP-рибозил-трансферазами; *б.* Синтез линейных или разветвленных поли (ADP-рибозил) белков, катализируемых (ADP-рибоза) полимеразой (поли-ADP-рибоза-синтетазой)

фрагментов [6]. Установлено участие поли-ADP-рибозилирования в регуляции синтеза, репарации и репликации ДНК, генных перестроек и перемещений, клеточной дифференцировке и трансформации, то есть практически во всех процессах, сопровождающихся разрывом и сборкой нитей ДНК [7, 8]. Структурные изменения в хроматине, обусловленные ADP-рибозилированием гистонов, приводят к конденсации хромосом и облегчают доступ к ДНК ДНК-регенерирующих ферментов. Кроме того, ADP-рибозилирование модулирует *in vivo* активность ряда ДНК-связывающих ферментов, таких как α- и β-ДНК-полимеразы, ДНК-топоизомеразы I и II, ДНК-лиаза II, Ca^{2+}, Mg^{2+}-зависимая эндонуклеаза и т. д.

Процесс моно-ADP-рибозилирования осуществляется моно-ADP-рибозилтрансферазами, которые обычно имеют цитоплазматическую, митохондриальную или мембранную локализацию [8]. Долгое время господствовало мнение, что моно-ADP-рибозилирование является прерогативой прокариот на основании того, что у эукариот не удавалось обнаружить моно-ADP-рибозилтрансферазной активности, несмотря на присутствие акцептирующих белков. Это положение подтверждалось тем, что моно-ADP-рибозилирование является общим механизмом действия на клеточный метаболизм ряда бактериальных токсинов. Сравнительно недавно (в конце 70-х—начале 80-х гг.) моно-ADP-рибозилтрансферазная активность была обнаружена у эукариотических организмов. Впервые моно-ADP-рибозилтрансфераза была выделена из эритроцитов индюка и человека [9] и растворимой фракции печени

крыс [10]. Затем подобный фермент, осуществляющий специфическую модификацию аргинина и других гуанидиновых соединений, был обнаружен в мембранах тироидных клеток [11], ядерной фракции печени кур [12], саркоплазматическом ретикулуме скелетных мышц кролика [13] и т. д. В последнее время описаны также эндогенные

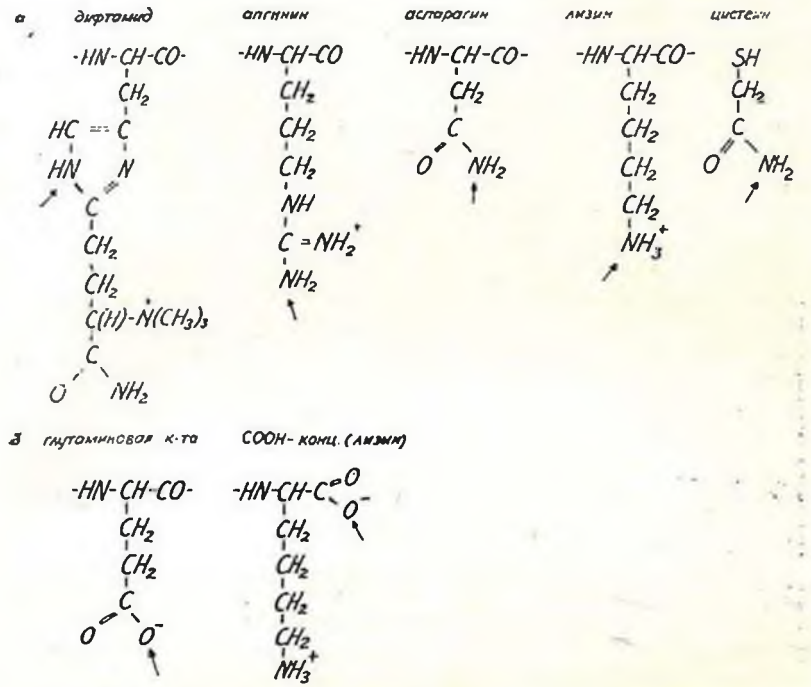

Рис. 2. Акцепторные аминокислоты в реакциях моно-ADP-рибозилирования (*а*) и поли-ADP-рибозилирования (*б*)

ADP-рибозилтрансферазы, специфическим образом модифицирующие остатки гистидина [14, 15] и цистеина [16] в белках. Все эти моно-ADP-рибозилтрансферазы, несмотря на многочисленные отличия физико-химических свойств, имеют много общего с бактериальными токсинами, механизм действия которых на клеточный метаболизм довольно хорошо изучен. Полагают, что аргинин- и цистеинспецифические эндогенные ADP-рибозилтрансферазы принимают участие в регуляции активности аденилатциклазы (АЦ) подобно холерному и коклюшному токсину, которые ADP-рибозилирует регуляторные GTP-связывающие белки аденилатциклазной системы. Об этом свидетельствует то обстоятельство, что многими исследователями установлено, что ADP-рибозилирование в ряде тканей (щитовидная железа, мозг, эритроциты) сопровождается стимулированием активности АЦ. Правомочно также утверждение об идентичности механизма действия ADP-рибо-

зилтрансфераз, обнаруженных в пораженных вирусом полиомы почках хомячка [14] и печени быка [15] и дифтерийного токсина, модифицирующего остаток дифтамида фактора элонгации E_2 у эукариот, что приводит к угнетению синтеза белка, препятствуя проникновению в рибосомы пептидил-тРНК.

Вышеизложенное убедительно демонстрирует участие эндогенных ADP-рибозилтрансфераз в регуляции клеточного метаболизма. Однако, для того, чтобы рассматривать этот процесс в качестве реакции универсальной посттрансляционной модификации белков, необходимо получить доказательства его обратимости аналогично, например, фосфорилированию или ацетилированию. В этой связи следует отметить, что недавно было показано существование ферментов, катализирующих высвобождение ADP-рибозы из моно-ADP-рибозилированных белков. Эта активность была обнаружена в эритроцитах индюка [16], трансформированных вирусом Simian-40 фибробластах [17] и растворимой фракции скелетных мышц [18]. Остается неясным вопрос о связи между метаболизмом поли(ADP-рибозы) и ADP-рибозы в организме, несмотря на то, что NAD является субстратом в обоих типах реакций ADP-рибозилирования. Прямых данных в этом отношении нет, однако небезынтересно, что в ряде случаев реакции поли-ADP-рибозилирования протекают в цитоплазме [19, 20], а типичная моно-ADP-рибозилтрансфераза была обнаружена Shimoyama и соавт. в ядерной фракции печени, где она осуществляет ADP-рибозилирование ряда белков, в том числе гистонов [12].

Поли-АДР-рибозилирование в мозгу

(ADP-рибоза)полимераза, катализирующая ковалентное присоединение к белкам ADP-рибозильного остатка NAD с последующим синтезом поли-ADP-рибозы посредством ($1''$—$2'$) рибозо-рибозной связи, была впервые обнаружена в ядерной фракции мозга крыс в 1980 г. [21]. Показано, что наиболее высокой активностью фермента обладают ядра нейронов, в глии она выше в астроцитах, по сравнению с олигодендроцитами. Ядерная (ADP-рибоза)полимераза мозговой ткани обнаруживает абсолютную зависимость от ДНК и ее активность в интактных ядрах значительно ниже, чем в разрушенных, что связано с возможной фрагментацией ДНК [22].

В дальнейшем была предпринята попытка выделить и очистить (ADP-рибоза)полимеразу из мозговой ткани. Заалишвили и соавт. изолировали фермент из ядерной фракции мозга крыс [23, 24]. При применении аффинной хроматографии на ДНК-сахарозе ими был получен препарат фермента со степенью очистки 123 раза и выходом 11,2%. Обнаружено стимулирующее влияние ионов магния и спермина на активность фермента, а также фрагментации ДНК под влиянием ДНК-азы I [24], что указывает на участие (ADP-рибоза)полимеразы в репарации ядерной ДНК.

Исследования, проведенные в лаборатории Mandel [25], установили, что, помимо ядерной фракции, (ADP-рибоза)полимераза присутствует во фракции синаптических и несинаптических митохондрий мозга, где ее активность сопоставима с таковой в митохондриях печени и составляет около 20 пмоль/мг белка/10 мин при 37°. Еще более высокая активность (ADP-рибоза)полимеразы была обнаружена в цитоплазматической рибонуклеопротеиновой фракции мозга, содержащей мРНК (т. н. mRNP) [26, 27]. Характерно, что митохондриальный фермент, в отличие от ядерной (ADP-рибоза)полимеразы, катализирует присоединение небольшого числа ADP-рибозных остатков (6—7) к акцептирующим белкам, что послужило основанием Mandel и соавт. выделить его в группу олиго (ADP-рибозил)трансфераз [25, 27]. Столь разнообразная локализация фермента в мозговой ткани, по-видимому, обуславливает правильность подхода некоторых исследователей к его изолированию из цельного мозга. Описана методика выделения (ADP-рибоза)полимеразы из мозга крупного рогатого скота и охарактеризованы основные физико-химические свойства выделенного фермента [28]. Путем осаждения экстракта цельного мозга сульфатом аммония и последовательной хроматографии надосадочной жидкости на ДНК-целлюлозе, Red-сефарозе и гидроксилапатите был выделен фермент со степенью очистки 5300 раз и выходом 19%. M_r фермента равна 116 кД, что соответствует величине M_r (ADP-рибоза) полимеразы из других источников (тимус, семенники и т. д.). Выделенный фермент существенно не отличался от описанных в литературе (ADP-рибоза)полимераз и по ряду других физико-химических параметров (pH-зависимость, величина У.А., K_m NAD, ингибирование аналогами субстрата). Характерно, что (ADP-рибоза)полимераза мозга, в отличие от фермента из тимуса и семенников, проявляет некоторую активность в отсутствие ДНК, что, вероятно, можно объяснить за счет фермента mRNP-фракции, который, по данным Mandel [26], не является ДНК-зависимым.

ADP-рибозилирование белков под влиянием бактериальных токсинов и участие в этом процессе белковых факторов мозга.

Известно, что в сопряжении различных рецепторов с ферментами мембран и ионными каналами принимают участие GTP-связывающие белки (G-белки), выполняющие роль внутриклеточных переносчиков сигнала. Если в ряде случаев остается невыясненным, каким образом G-белки взаимодействуют с эффекторными системами (фосфолипаза С, фосфолипаза A_2, активируемые мускарином K^+-каналы и т. д.), то в отношении АЦ этот вопрос достаточно хорошо изучен. G-белки АЦ-системы, в зависимости от оказываемого ими влияния на активность фермента подразделяются на 2 категории: стимулирующие (G_S-белки) и ингибирующие (G_i, G_o и G_0'-белки). Все они обладают GTP-азной активностью, имеют тримерную структуру, состоят из α, β, γ-субъединиц, причем в обоих типах белка β- и γ-субъединицы

прочно связаны и обычно функционируют в комплексе. α-Субъединица каждого из этих белков отличается величиной M_r: 45 или 52 кД у G_s-белков и 41, 39 и 40 кД соответственно у G_i, G_o и G_{t_1}-белков [29].

Активация АЦ при присоединении лиганда к рецепторному белку осуществляется путем прямого взаимодействия α-субъединицы G_s-белка (α_s) с ферментом. Ингибирование же АЦ наступает в результате комбинированного действия нескольких факторов. Прежде всего βγ-субъединицы, высвобождающиеся из G-ингибиторных белков при связывании агониста с рецептором, взаимодействуют с α-субъединицей G_s-белка, образуя с ней тримерный комплекс, вследствие чего снижается концентрация свободной α_s, являющейся непосредственным активатором АЦ [30]. Кроме того, α-субъединица G_i-белка конкурирует с α_s за присоединение к АЦ, а βγ-субъединицы G-белков сами по себе оказывают ингибирующее влияние на активность фермента [31]. Наконец, установлено, что βγ-субъединицы G_i-белков с высоким сродством связываются с кальмодулином, являющимся потенциальным активатором АЦ, после чего он перестает активировать фермент. Таким образом, в присутствии кальмодулина ингибирование АЦ βγ-субъединицами G-белков носит бифазный характер: в низких концентрациях они, связываясь с ним, ингибируют активность АЦ, а в высоких концентрациях оказывают этот эффект путем непосредственного взаимодействия с ферментом [32].

Столь подробное описание нами регуляторных G-белков аденилатциклазной системы обусловлено тем, что их ADP-рибозилирование лежит в основе механизма действия ряда бактериальных токсинов на животный организм. В частности, холерный токсин (холераген) катализирует ADP-рибозилирование α_s, что приводит к ингибированию присущей ей активности GTP-азы и выключает реакцию GTP-GDP-обмена, благодаря чему АЦ остается необратимо активированной. В клетках кишечного эпителия обусловленное действием холерагена бесконтрольное повышение уровня cAMP приводит к выбросу больших количеств Na^+ и воды в просвет кишечника, что является причиной тяжелой диарреи. Аналогичным образом действуют некоторые штаммы патогенной E. coli, продуцирующие энтеротоксин, функционально и иммунологически близкий к холерагену [33]. Исследования, проведенные в лаборатории J. Moss (США) однозначно показали, что акцепторной аминокислотой в процессах ADP-рибозилирования, катализируемых холерагеном, является аргинин. Показано, что субстратом реакции могут быть свободный аргинин или другие низкомолекулярные гуанидиновые соединения [34, 35].

Стимулирование АЦ под влиянием коклюшного токсина происходит в результате ADP-рибозилирования α-субъединицы G-ингибиторных белков (α_i), в результате чего G_i перестают функционировать в качестве медиаторов связанного с рецепторами ингибирования АЦ. При этом снижается или полностью утрачивается чувствительность сопряженных с АЦ рецепторов (α_2-адренергических, мускариновых

холинергических, опиатных и т. д.) к своим лигандам, ингибирующим активность фермента и снижающим уровень cAMP. Подобные факты, широко известные в отношении периферических органов, в последнее время стали обнаруживать и в ЦНС. В частности, недавно было показано, что ADP-рибозилирование α-субъединицы G_i-белка с M_r 41 кД коклюшным токсином подавляет связывание α_2-рецепторов в синаптических мембранах коры больших полушарий головного мозга и предотвращает влияние GTP на этот процесс [36]. Asano и Ogasawara установили интересные взаимоотношения между G_i и G_o-белками и $ГАМК_A$-рецептором в мембранах коры мозга крупного рогатого скота [37]. Ими было показано, что модификация α-субъединицы с помощью коклюшного токсина приводит к потере возможности GTP-связывающих белков взаимодействовать с рецептором. Обработанные алкильными реагентами типа N-этилмалеимида G-ингибиторные белки утрачивали способность ADP-рибозилироваться под влиянием коклюшного токсина. Эти данные свидетельствуют о совпадении или близости участков модификации N-этилмалеимидом или ADP-рибозилтрансферазой и указывают на возможность того, что акцептором ADP-рибозы в ингибиторных G-белках является цистеин.

Таким образом, бактериальные токсины и, в частности, коклюшный токсин успешно используются в нейрохимических исследованиях в качестве инструментов, позволяющих изучить участие G-белков в процессах рецепторного связывания. Следует отметить, что α-субъединицы G-белков ADP-рибозилируются коклюшным токсином (также как и холерагеном) только в том случае, если они жестко связаны с βγ-субъединицами, то есть находятся в неактивной форме. ADP-рибозилированные G-белки более не способны связываться с рецепторами, что выражается в уменьшении их сродства к агонистам, о чем было сказано выше, или потере способности агонистов индуцировать GTP-GDP обмен посредством GTP-азной реакции в клеточной мембране [38, 39]. На рис. 3 вышесказанное резюмировано в виде схемы, в которой описано функционирование G-белков в качестве переносчиков сигнала и влияние бактериальных токсинов (на примере коклюшного токсина) на этот процесс.

Характерно, что впервые G-белки АЦ-системы, являющиеся субстратами ADP-рибозилирования бактериальных токсинов, были выделены в лаборатории Gilman из мозговой ткани [40], которая, как оказалось, наиболее богата ими: в ней на долю G-белков приходится около 1% от общего содержания белка [41]. Из мембранной фракции мозга быка были изолированы ингибиторные G_i- и G_o-белки, подвергающиеся ADP-рибозилированию под влиянием коклюшного токсина. Впоследствии в этой же лаборатории был обнаружен и выделен из мембранной фракции крупного рогатого скота GTP-связывающий белковый фактор, названный ARF (ADP-ribosylation factor), участвующий в процессе катализируемого холерагеном ADP-рибозилирования белков [42, 43]. Было высказано мнение, что ARF образует

комплекс с αs (Gs·ARF), являющийся более эффективным субстратом ADP-рибозилирования холерагеном, по сравнению со свободной αs [42]. Позднее было обнаружено, что ARF стимулирует активность холерагена, индуцируя GTP-зависимые процессы, не связанные с G-белками, такие как гидролиз NAD, ауто-ADP-рибозилирование A_1-пептида—компонента холерагена, ADP-рибозилирование агматина и ряда других простых гуанидиновых соединений и белков, не относящихся к АЦ-системе [44]. Аналогичные белковые факторы, стиму

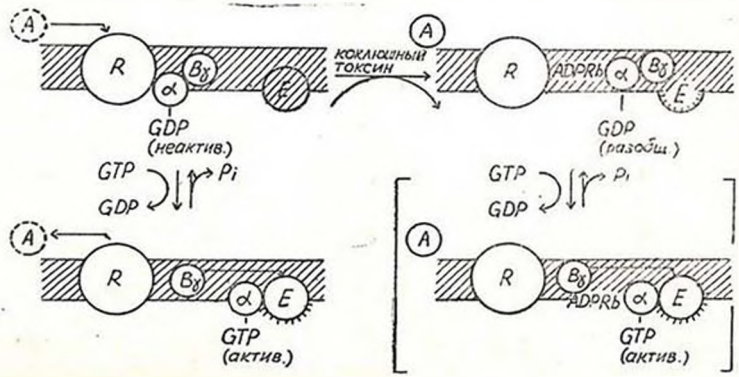

Рис. 3. G-белки как переносчики сигнала (цит. по 32). R—рецептор, A—агонист, E—эффектор

лирующие ADP-рибозилтрансферазную активность холерагена, были изолированы из растворимой фракции мозга. Предпосылкой к этому послужили ранее опубликованные данные о повышении АЦ-активности под влиянием холерагена в присутствии не только мембран, но и растворимой фракции из различных тканей [45, 46]. Moss и сотр., используя модифицированный метод Kahn, Gilman [43], выделили из растворимой фракции мозга быка два белка с M_r 19 кД ($sARF_1$ и $sARF_2$), которые по своим свойствам соответствовали ранее описанному ARF мембран ($_m$ARF) [47, 48]. Оба эти белка оказывали на Cs_a-зависимые и -независимые реакции, катализируемые холерагеном, эффекты, подобные $_m$ARF [44]. Эти данные позволили уточнить механизм активирования АЦ-системы холерагеном и прийти к заключению, что первичный эффект ARF связан не с G-белками, а с его непосредственным взаимодействием с A_1-пептидом холерного токсина. Поскольку это взаимодействие зависит от GTP и субстратом осуществляемой токсином реакции ADP-рибозилирования также является GTP-связывающий белок (Gs_4) легко убедиться в том, что в активации АЦ холерагеном участвует каскадная система GTP-связывающих белков. На первом этапе A_1-пептид токсина активирует ARF (пока непонятно, какой из видов—$_m$ARF или $_s$ARF является более предпочтительным участником этого процесса в клетке); затем комп-

лекс ARF—холераген катализирует ADP-рибозилирование $G_{s\alpha}$, повышая чувствительность последней к GTP и ее способность к активации каталитической субъединицы АЦ (рис. 4). Недавно было установлено, что в этом процессе первостепенная роль принадлежит низко- и высокоаффинному взаимодействию ARF с GTP [49]. Физиологическая роль тканевых белковых факторов, стимулирующих действие бактериальных токсинов, не представляется окончательно ясной, но неоспоримо, что они участвуют в GTP-зависимой регуляции эндогенных ADP-рибозилтрансфераз.

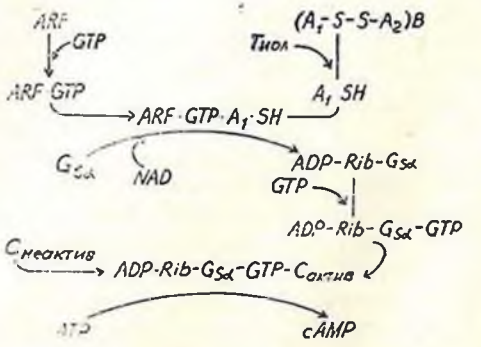

Рис. 4. Участие ARF в стимулировании АЦ холерагеном (цит. по 48): (A_1—S—S—A_2)—пептиды, связанные с β-субъединицей холерагена дисульфидной связью. С—каталитическая субъединица АЦ

В последнее время появились данные о том, что ряд нейротоксинов, продуцируемых Clostridium botulinum, также обладает ADP-рибозилтрансферазной активностью. Фармакологически все нейротоксины этого типа (A, B, C_1, D, E, F и G) идентичны, они блокируют высвобождение нейромедиаторов нервными окончаниями, преимущественно холинергических нервов. Недавно из надпочечников был выделен новый GTP-связывающий белок, являющийся субстратом ADP-рибозилирования, катализируемого нейротоксинами C_1 и D, названный, в отличие от известных ранее G-белков, G_b-белком [50, 51]. Аналогичный по величине M_r G-белок был изолирован из тромбоцитов, но по сравнению с G_b-белком он был менее эффективен как субстрат ADP-рибозилирования C_1-нейротоксином. Высокой активностью в отношении этого белка обладал другой штамм Clostridium botulinum типа C, названный авторами ADP-рибозилтрансферазой C_3 [52]. В опытах, проведенных с культурой пермеабилизованных хромаффинных клеток, было обнаружено, что этому белку принадлежит важная роль в усилении экзоцитоза при повышении внутриклеточного содержания кальция [53]. При ADP-рибозилировании G-белка экзоцитоз нейромедиаторов нарушался и это, по мнению Knight и соавт. [53] и поддерживающих эту точку зрения японских исследователей [50, 51], обусловливает действие некоторых нейротоксинов. Однако, следует приз-

нать, что этот механизм детально не изучен; кроме того ADP-рибозилтрансферазной активностью обладают некоторые штаммы Clostridium botulinum, не являющиеся нейротоксинами (например, C_2) и, напротив, у большинства продуцируемых этим микроорганизмом нейротоксинов не обнаружено ADP-рибозилтрансферазной активности [51].

Исследованиями Kikuchi и соавт. было установлено, что под влиянием нейротоксина C_1 в мембранах мозга происходит ADP-рибозилирование трех GTP-связывающих белков, один из которых идентифицирован как белок с M_r 20 кД, являющийся продуктом rho-гена [54]. В связи с этим следует отметить, что в настоящее время описано большое количество так называемых малых G-белков (с величиной M_r, не превышающей 25—39 кД), не связанных с процессами трансдукции сигнала и играющих важную роль в регуляции пролиферации и дифференциации клеток. Полагают, что они являются наиболее древними представителями этой группы белков, в процессе эволюции которых сформировались G-белки, связанные с рецепторами [55]. К числу бактериальных токсинов, обладающих ADP-рибозилтрансферазной активностью, относятся также дифтерийный токсин (Corynebacterium diphterine) и Pseudomonas Toxin A, ингибирующие синтез белка путем ADP-рибозилирования дифтамида (продукт посттрансляционной модификации гистидина) фактора элонгации 2 (EF-2) эукариот и последующего подавления его связывания с рибосомами [33, 56]. Мы не обнаружили в доступной нам литературе данных о присутствии в мозгу субстратов или тканевых факторов, способствующих ADP-рибозилированию вышеназванными бактериальными токсинами. Однако обнаруженные недавно факты о наличии ADP-рибозилтрансфераз с аналогичным осуществляемому ими механизмом действия [57] не исключают возможности существования подобного фермента в мозговой ткани.

Моно-ADP-рибозилтрансферазы мозга и других органов

Исследование эндогенных субстратов моно-ADP-рибозилирования, осуществляемого различными бактериальными токсинами, почти во всех тканях животного организма стимулировало поиск моно-ADP-рибозилтрансфераз животного происхождения. Наибольших успехов в этом направлении достигли J. Moss и сотр. из лаборатории клеточного метаболизма Национального института здоровья (Бетесда, США). Впервые в 1978 г. появились сообщения о наличии моно-ADP-рибозилтрансферазной активности в эритроцитах индюка [58] и щитовидной железе крупного рогатого скота [59]. Интенсивно развивающиеся с начала 80-х годов исследования показали, что в животных тканях присутствует, наряду с мембраносвязанной, растворимая форма ADP-рибозилтрансферазы.

Появились первые работы, посвященные очистке и изучению свойств эндогенных моно-ADP-рибозилтрансфераз. Из цитозоля эри-

троцитов индюка были очищены до гомогенного состояния ADP-рибозилтрансферазы А и В, отличающиеся чувствительностью к гистонам и хаотропным солям (А-форма переходит из неактивной в активную в присутствии гистонов или NaCl, а В-форма не подвержена активирующему действию этих соединений) [60, 61]. Кроме того, эти две формы фермента несколько отличаются субстратной специфичностью: А-форма использует в реакциях ADP-рибозилирования исключительно NAD, тогда как субстратом В-формы, наряду с NAD, является NADP [62]. Затем было показано, что помимо них, эритроциты содержат мембраносвязанную активность ADP-рибозилтрансферазы: из ядер и плазматических мембран были изолированы соответственно A_1 и С-форма фермента, первая из которых очень напоминает А-форму фермента из цитозоля, а вторая относительно инертна к воздействию солей и гистонов [63].

В 1984 г. Shimoyama и соавт. [64] выделили из ядерной фракции печени кур высокоактивную моно-ADP-рибозилтрансферазу, чувствительную к ДНК, чем она прежде всего отличается от А- и A_1-ADP-рибозилтрансфераз из эритроцитов. Интересно, что образуемые в реакциях, катализируемых этим ферментом, аддукты ADP-рибоза-гистоны инициируют образование поли(ADP-рибозы) при их инкубации с поли (ADP-рибоза)синтетазой в присутствии Mg^{2+} и ДНК. Одним из эффективных акцепторов ADP-рибозы, модифицируемых этим ферментом, наряду с гистонами, является белок хроматина с M_r 33 кД (р33), ADP-рибозилирование которого, по мнению авторов, вносит определенный вклад в процессы репликации ДНК и транскрипции [65].

Все изолированные ферменты подобно холерагену катализировали *in vitro* перенос ADP- рибозильного остатка с NAD на гуанидиновую группу аргинина. Наличие аргининспецифической ADP-рибозилтрансферазы показано в эритроцитах человека [66], растворимой фракции печени крыс [67] и внутренней митохондриальной мембране печени быка [68], в саркоплазматическом ретикулуме и сарколемме кролика [69, 70].

В 1982 г. были опубликованы результаты исследований Lester и соавт., впервые описавших ADP-рибозилирование белков синаптосом и митохондрий электрического органа Torpedo, положившие начало детальному изучению этого процесса в нервной ткани. Было показано, что наиболее интенсивному ADP-рибозилированию подвергаются белки с M_r 62 и 86 кД, тогда как в присутствии холерагена ADP-рибозилируется в основном белок с M_r 42 кД, относящийся, по мнению авторов, к GTP-связывающим белкам АЦ-системы [71]. Наряду с этим, показано, что в ряде тканей, например, в плазматических мембранах печени под влиянием эндогенной ADP-рибозилтрансферазы и холерагена ADP-рибозилируются одни и те же белки [72]. Исследованиями Фоменко и соавт. было установлено, что в синаптических мембранах мозга крыс осуществляется аргининспецифическое моно-ADP-рибозилирование белка с M_r 42 кД, причем, в отличие от дан-

ных, полученных на мембранных препаратах Torpedo, этот белок ADP-рибозилируется в отсутствие добавленного холерагена [70]. Наблюдаемое обеими группами исследователей ADP-рибозилирование белка с M_r 42 кД сопровождалось повышением активности АЦ. Этот механизм, как полагают Фоменко и соавт., лежит в основе стимулирования АЦ при введении животным предшественника NAD никотинамида [73]. Уровень включения меченой ADP-рибозы в белки синаптических мембран в экспериментах, проведенных вышеназванными группами исследователей, был незначителен и, в частности, по данным Фоменко и соавт., составлял около 2% от используемой метки. Авторы склонны считать, что это обусловлено недостаточной доступностью мембранных акцепторов ADP-рибозы и возможным наличием в экстрактах синаптических мембран ингибитора процесса ADP-рибозилирования. Проведенные в этом направлении исследования в нашей лаборатории показали, что интенсивность ADP-рибозилирования возрастает более чем в 15 раз при хранении синаптических мембран в течение 20 ч при комнатной температуре, причем это не связано с протеолитическим распадом акцепторных белков [74]. По нашим данным, ADP-рибозилирование хранившихся синаптических мембран подавлялось в присутствии тимидина, являющегося ингибитором поли (ADP-рибоза)синтетазы, и, в отличие от результатов ранее проведенных другими авторами исследований, не полностью ингибировалось аргинином и носило более продолжительный характер: процесс завершался лишь через 2 ч инкубации и при этом расходовалось около 12% от используемого [^{14}C] NAD. Интенсификация процесса ADP-рибозилирования в условиях наших опытов может быть обусловлена деструкцией синаптических мембран при хранении и высвобождении из них акцепторных белков, а также соответствующих мембраносвязанных ADP-рибозилтрансфераз, осуществляющих перенос ADP-рибозы на другие, помимо аргинина, аминокислотные остатки мембранных белков.

В этой связи интересно отметить, что более эффективными, по сравнению с аргинином, ингибиторами ADP-рибозилирования белков хранившихся синаптических мембран оказались гистидин и, особенно, цистеин. Дальнейшие исследования показали, что при инкубации синаптических мембран, используемых в качестве источника ADP-рибозилтрансфераз, с меченым NAD в присутствии свободных аминокислот среди продуктов реакции, наряду с ADP-рибозил-аргинином, обнаруживаются ADP-рибозилцистеин и ADP-рибозил-гистидин (или ADP-рибозил-дифтамид?). При этом отмечается увеличение включения радиоактивности в зону высокомолекулярных белков (M_r 215—260 кД), белков с M_r 41—43 кД и появление метки в белках с M_r 56—57, 81—83 и 129—135 кД [75].

В связи с полученными нами данными интересно отметить, что эндогенная ADP-рибозилтрансфераза, катализирующая перенос ADP-рибозы с NAD на остаток дифтамида, обнаружена в составе фактора

элонгации E_2, выделенного из почечной ткани хомячка, пораженного вирусом полиомы, и из печени крупного рогатого скота. Оказалось, что E_2 может модифицироваться не только под влиянием дифтерийного токсина, но и путем ауто-ADP-рибозилирования [57]. Дифтамид представляет собой уникальный модифицированный остаток гистидина, обнаруженный лишь в составе фактора элонгации E_2 и сохранившийся в процессе эволюции эукариот [76]. Трудно представить, что единственное предназначение дифтамида—это быть субстратом модификации E_2 при микробной интоксикации. Более привлекательно думать, что дифтамид служит акцептором в реакциях ADP-рибозилирования белков, катализируемых тканевыми ферментами. Не исключено, что в этой же роли может выступать непосредственно гистидин.

В последние годы появились работы, свидетельствующие о наличии цистеинспецифических тканевых моно-ADP-рибозилтрансфераз с механизмом действия, подобным коклюшному токсину. Впервые NAD : цистеин ADP-рибозилтрансфераза была обнаружена и выделена из цитозоля эритроцитов человека [77]. Установлено, что этот фермент катализирует ADP-рибозилирование, наряду со свободным цистеином, GTP-связывающие белки $G_{i\alpha}$ [78]. Недавно появились данные о наличии аналогичного фермента в печени крыс, в которой он присутствует вместе с ADP-рибозилтрансферазами, катализирующими образование ADP-рибозиларгинина и ADP-рибозилкабоксилата [78].

Результаты исследований, проведенных в нашей лаборатории, в совокупности с литературными данными указывают на то, что в синаптосомах ADP-рибозилирование осуществляется системой моно-ADP-рибозилтрансфераз, модифицирующих различные аминокислотные остатки в белках синаптических мембран (аргинин, цистеин и гистидин). Принимая во внимание данные об ингибирующем влиянии на процесс ADP-рибозилирования тимидина, нельзя отрицать также присутствие в синаптических мембранах поли(ADP-рибоза)синтетазы. В пользу этого предположения свидетельствует факт ингибирования ADP-рибозилирования в отсутствие тимидина глутаматом [74], являющимся, как уже отмечалось, акцептором ADP-рибозы в реакциях поли-ADP-рибозилирования (I). С другой стороны, нельзя полностью исключить ингибирующее влияние тимидина на процессы моно-ADP-рибозилирования, так как ингибиторы поли(ADP-рибозы)синтетазы, к которым, наряду с тимидином, относятся также никотинамид, бензамид и 3[1]-бензамид, не являются строго специфическими [7].

Резюмируя вышеизложенное, можно заключить, что в мозговой ткани осуществляется широкий спектр реакций ферментативного ADP-рибозилирования: поли-ADP-рибозилирование в ядерной фракции и, отчасти, в синаптических мембранах, олиго-ADP-рибозилирование в митохондриях и несколько типов моно-ADP-рибозилирования в синаптосомах.

В последнее время интенсивно развиваются исследования в направлении изучения механизма действия катализирующих эти процессы ферментных систем, их очистки и описания физико-химических свойств изолированных белков. Между тем, практически неисследованными остаются вопросы функциональной значимости этих процессов в нервной ткани. В первую очередь, что относится к моно- и олиго-ADP-рибозилтрансферазам, которые вообще мало исследованы, по сравнению с поли(ADP-рибоза)синтетазой.

Весьма перспективным является исследование влияния осуществляемой этими ферментами посттрансляционной модификации синаптических белков на нейромедиаторные процессы. Значительный интерес представляет идентификация ADP-рибозилированных белков и выяснение их функциональной роли в синаптосомах, а также в митохондриях. В этой связи следует упомянуть, что определенная роль в митохондриальном транспорте Ca^{2+} принадлежит ADP-рибозилированию, которое, в свою очередь, может регулироваться Ca^{2+}-кальмодулиновой системой [80].

Немаловажным аспектом изучения ADP-рибозилирования в нервной ткани может стать выяснение роли этого процесса в регуляции ферментативной активности и его взаимосвязи с другими видами посттрансляционной модификации белков, в том числе ферментов. Наличие аргинин- и цистеинспецифических ADP-рибозилтрансфераз в мозгу прежде всего диктует необходимость исследования их участия в регуляции активности АЦ через систему G-белков. Другим возможным примером опосредованного влияния ADP-рибозилирования на ферментные белки служит изменение их способности подвергаться другим посттрансляционным модификациям, в частности фосфорилированию, что доказано на примере киназы фосфорилазы скелетных мышц и пируваткиназы L-типа из печени свиньи [81, 82]. Наконец, эндогенные ADP-рибозилтрансферазы мозговой ткани могут оказывать непосредственное регуляторное влияние на активность ферментов, как это было показано в случае ADP-рибозилирования глутаминсинтетазы из мозга быка и сердца кур [83], ацетилКоАкарбоксилазы из печени крыс [84], AMP-дезаминазы скелетных мышц кролика [85] и др.

Ждет своего разрешения вопрос об обратимости процесса ADP-рибозилирования в нервной ткани. Факт функционирования цикла ADP-рибозилирование—де-ADP-рибозилирование явится экспериментальным обоснованием гипотезы о том, что эти процессы, наряду с другими посттрансляционными модификациями белков (фосфорилирование, метилирование, гликозилирование) выполняют важную регуляторную роль в животной клетке.

ADP-RIBOSYLATION OF PROTEINS IN BRAIN AND OTHER ORGANS

ARUTYUNYAN A. V.

Buniatian Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Armenian Republic, Yerevan

This review summarizes literature about endogenous ADP-ribosylation in eukaryotes. We present our own experimental materials and results of other authors about characteristics of this process in nerve tissue. On the basis of these data we conclude that enzymatic ribosylation reactions such as poly-ADP-ribosylation, oligo-ADP-ribosylation and several types of mono-ADP-ribosylation are underway in nerve tissue. The corresponding enzymes differ in subcellular localization and appear to play different functions in the nerve cell.

We have also reviewed the problem about the involvement of brain protein factors in the action of bacterial toxins. We discuss current views about the role of ADP-ribosylation in signal transduction by receptor systems.

In conclusion we discuss some of the more important and promising goals in further studies of ADP-ribosylation in the nervous system.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ueda K., Hayatshi O.* Ann. Rev. Biochem., v. 54, p. 73—105, 1985
2. *Chambon P., Weill J. D., Mandel P.* Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 11, № 1, p. 39—43, 1963.
3. *Chambon P., Weill J. D., Doly J., Strossen M. T.* Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 25, p. 638—643, 1966.
4. *Nishizuka Y., Ueda K., Honjo T., Hayaishi O.* J. Biol. Chem., v. 243, p. 3765—3767, 1968.
5. *Otake H., Miwa M., Fujimura S., Sugimura T.* J. Biochem., v. 65, № 1, p. 145—146, 1969.
6. *Hayaishi O., Ueda K.*—In: ADP-Ribosylation Reactions (Biology and Medicine), p. 3—16, Acad. Press, L.—N. Y. 1982.
7. *Gaal J. C., Pearson C. K.* Biochem. J., v. 230, p. 1—18, 1985.
8. *Shall S.*—In: Advances in Posttranslational Modifications of Proteins and Aging, (eds. V. Zappia, P. Galetti, R. Porta, F. Wold), v. 231, p. 597—626, 1988.
9. *Moss J., Vaughan M.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 75, p. 3621—3624, 1978.
10. *Moss J., Stanley C. J.* J. Biol. Chem. v. 525, p. 7830—7833, 1981.
11. *De Wolf M. J. S., Vitti P., Ambesi-Impiobato F. S., Kohn L. D.* J. Biol. Chem. v. 256, p. 12287—12295, 1981.
12. *Tanigawa Y., Tsuchiya M., Imai Y., Shimoyama M.* J. Biol. Chem. v. 259, p. 2022—2029, 1984.
13. *Soman G., Mickelson J. R., Louis C. F., Graves D. J.* Biochem. Biophys. Res. Commun. v. 120, p. 973—980, 1984.
14. *Lee H., Iglewski W. J.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. v. 81, p. 2703—2707, 1984.
15. *Iglewski W. J., Lee H., Muller P.* FEBS Lett., v. 173, p. 113—118, 1984.
16. *Moss J., Jacobson M. K., Stanley S. J.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 82, p. 5603—5607, 1985.
17. *Smith K. P., Benjamin R. S., Moss J., Jacobson M. K.* Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 126, p. 136—142, 1985.

18. *Yang-Chung Chang, Soman C., Graves D. J.* Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 139, № 3, p. 932—933, 1986.
19. *Elkaim R., Thomassin H., Niedergang C., Egly J. M., Kempf J., Mandel P.* Biochimie, v. 65, p. 653—659, 1983.
20. *Mandel P.*—In: ADP-Ribosylation of Proteins (ed. by F. R. Althaus, H. Hilz, S. Shall), p. 2—8, Springer-Verlag, 1985.
21. *Заалишвили Т. М., Маргиани Д. О., Тамазян А. С.* Изв. АН ГССР, т. 6, № 2, с. 141—146, 1980.
22. *Заалишвили Т. М.* Изв. АН ГССР, т. 7, № 4, с. 381—383, 1981.
23. *Заалишвили Т. М., Маргиани Д. О., Тамазян А. С.* Сообщ. АН ГССР, т. 106, № 2, с. 397—400, 1982.
24. *Заалишвили Т. М., Сабелашвили Д. Ш.* Нейрохимия, т. 8, № 3, с. 385—389, 1989.
25. *Masmoudi A., Mandel P.* J. Neurochem., v. 51, № 1, p. 188—193, 1988.
26. *Mandel P.*—In: ADP-ribose Transfer Reactions. Mechanisms and Biological Significance (ed. by M. K. Jacobson and E. L. Jacobson), p. 32—38, Springer-Verlag, 1989.
27. *Chypre C., Manieg C., Mandel P.* J. Neurochem. v. 51, p. 561—565, 1988.
28. *Арутюнян Д. Л., Погосян А. А., Мхитарян А. Г.* ДАН АрмССР, т. 86, № 4, с. 178—180, 1988.
29. *Gilman A. G.* Ann. Rev. Biochem., v. 56, p. 615—649, 1987.
30. *Katada T., Bokoh G. M., Smigel M. D., Ui M., Gilman A. G.* J. Biol. Chem. v. 261, p. 3586—3595, 1984.
31. *Katada T., Oinuma M., Ui M.* J. Biol. Chem., v. 261, p. 3586—3595, 1984.
32. *Ui M.*—In: ADP-ribose Transfer Reactions. Mechanisms and Biological Significance (ed. by M. K. Jakobson and E. L. Jacobson), p. 414—421, Springer-Verlag, 1989.
33. *Gaal J. C., Pearson C. K.* Trends in Biochem. Sci., v. 11, № 4, p. 171—175, 1986.
34. *Moss J., Vaughan M.* J. Biol. Chem. v. 252, p. 2455—2457, 1977.
35. *Moss J., Vaughan M.* Adv. Enzymol. v. 61, p. 303—379, 1988.
36. *Nomura Y., Kitamura Y., Segava T.* J. Neurochem. v. 44, № 2, p. 364—369, 1985.
37. *Asuno T., Ogasawara N.* Mol. Pharmacol., v. 29, p. 241—249, 1985.
38. *Haga K., Haga T., Ichiyama A., Katada T., Kurose H., Ui M.* Nature, v. 316, p. 731—732, 1985.
39. *Kurose H., Katada T., Haga T., Haga K., Ichiyama A., Ui M.* J. Biol. Chem., v. 261, p. 6423—6428, 1986.
40. *Gilman A. G.* Cell, v. 36, p. 577—579, 1984.
41. *Kahn R. A., Goddard G., Newkirk M.* J. Biol. Chem., v. 263, p. 8282—8287, 1988.
42. *Kahn R. A., Gilman A. G.* J. Biol. Chem., v. 259, p. 6228—6234, 1984.
43. *Kahn R. A., Gilman A. G.* J. Biol. Chem., v. 261, p. 7905—7911, 1985.
44. *Tsai S. C., Noda M., Adamik R., Moss J., Vaughan M.* Proc. Natl. Acad. Sci., USA, v. 84, p. 5139—5142, 1987.
45. *Enomoto K., Gill D. M.* J. Biol. Chem., v. 255, p. 1252—1258, 1980.
46. *Le Vine I. I., Cuatrecasas P.* Biochim. et biophys. acta, v. 672, p. 248—261, 1981.
47. *Tsai S.—C., Noda M., Adamik R., Chang P. P., Chen H.—C., Moss J., Vaughan M.* J. Biol. Chem., v. 263, № 4, p. 1768—1772, 1988.
48. *Noda M., Tsai S.—C., Adamik R., Chang P. P., Kunz B., Moss J., Vaughan M.*—In: ADP-Ribose Transfer Reactions. Mechanisms and Biological Significance (ed. by M. K. Jacobson, E. L. Jacobson), p. 445—449, Springer-Verlag, 1989.
49. *Bobak D. A., Buziotes M. M., Noda M., Tsai S.—C., Adamik R., Moss J.* Biochemistry, v. 29, № 4, p. 855—861, 1990.
50. *Ohashi Y., Kamiya T., Fujiwara M., Narimiya S.* Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 142, p. 1032—1038, 1987.
51. *Narimiya S. Ohashi Y., Fujiwara M.*—In: ADP-Ribose Transfer Reactions. Mechanisms and Biological Significance (ed. by M. K. Jacobson and E. L. Jacobson), p. 437—444, 1989.

52. *Aktories K., Laux M., Rosener S.*—In: ADP-Ribose Transfer Reactions. Mechanisms and Biological Significance (ed. by M. K. Jacobson, E. L. Jacobson), p. 445—449, 1989.
53. *Knight D. E., Tonge D. A., Baker P. F.* Nature, v. 317, p. 719—721, 1985.
54. *Kikuchi A., Yamamoto K., Fujita T., Takai Y.* J. Biol. Chem., v. 263, № 31, p. 16303—16308, 1986.
55. *Этингоф Р. Н., Думлер И. Л.* Журн. эвол. биох. и физиол., т. 25, № 2, с.195—214, 1989.
56. *Nygard O., Nilson L.* Biochim. et biophys. acta, v. 821, № 1, p. 152—162, 1985.
57. *Lee H., Iglewski W. J.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 81, p. 2703—2707, 1984.
58. *Moss J., Vaughan M.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 75, p. 3621—3624, 1978.
59. *Kohn L. D.* Recept. Recognit., Ser. A, № 1, p. 134—212, 1978.
60. *Moss J., Stanley S. J., Watkins P. A.* J. Biol. Chem., v. 255, p. 5838—5840, 1980.
61. *Yost D. A., Moss J.* J. Biol. Chem., v. 258, p. 4926—4929, 1983.
62. *West R. E., Jr., Moss J.* Biochemistry, p. 8057—8062, 1986.
63. *Moss J., West R. E., Osborne J. C., Levine R. L.*—In: ADP-Ribosylation of Proteins (ed. by F. R. Althaus, H. Hilz, S. Shall), p. 512—517, Springer-Verlag, 1985.
64. *Tanigawa Y., Tsuchiya M., Imai Y., Shimoyama M.* J. Biol. Chem. v. 259, p. 2022—2029, 1984.
65. *Mishima K., Tsuchiya M., Tanigawa Y., Yoshimura Y., Shimoyama M.* Eur. J. Biochem., v. 179, p. 267—273, 1989.
66. *Moss J., Stanley S. J.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 78, p. 4809—4812, 1981.
67. *Moss J., Stanley S. J.* J. Biol. Chem. v. 256, p. 7830—7833, 1981.
68. *Richter C., Winterhalter K. H., Baumhuter S., Lotscher H. R., Moser B.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 80, p. 3188—3192, 1983.
69. *Soman G., Mickelson J. R., Louis C. F., Graves D. J.* Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 120, № 3, p. 979—980, 1984.
70. *Soman G., Graves D. J.* Arch. Biochem. Biophys., v. 260, № 1, p. 56—66, 1988.
71. *Lester H. A., Steer L., Michaelson D. M.* J. Neurochem. v. 38, № 4, p. 1080—1086, 1982.
72. *Beckner S. K., Blecher M.* Biochim. Biophys. Acta, v. 673, p. 477—486, 1981.
73. *Фоменко А. И., Халмурадов А. Г., Степаненко С. П., Пожарук С. В.* Биологич. мембраны, т. 3, № 2, с. 124—130, 1986.
74. *Арутюнян А. В., Мовсесян Н. О., Бурназян Л. Б., Еранян С. С., Геворкян Г. А.* Нейрохимия, т. 7, № 4, с. 500—508, 1988.
75. *Мовсесян Н. О., Бурназян Л. Б., Арутюнян А. В.* Нейрохимия, т. 9, № 4 (в печати).
76. *Brown B. A., Bodley J. W.* FEBS Lett., v. 103, p. 253—255, 1979.
77. *Tanuma S., Kawashima K., Endo H.* J. Biochem. v. 101, № 3, p. 821—824, 1987.
78. *Tanuma S., Kawashima K., Endo H.* J. Biol. Chem. v. 263, p. 5485—5489, 1988.
79. *Jacobson E. L., Mingmuang M., Aboul-Ela N., Jacobson N. K.*—In: ADP-Ribose Transfer Reactions. Mechanisms and Biological Significance (ed. by M. K. Jacobson, E. L. Jacobson), p. 13—17, Springer-Verlag, 1989.
80. *Graves C. B., McDonald J. M.* Cell Calcium., v. 6, p. 491—501, 1985.
81. *Tsuchiya M., Tanigawa Y., Ushiroyama T., Matsuura R., Shimoyama M.* Eur. J. Biochem., v. 147, p. 33—40, 1985.
82. *Matsuura R., Tanigawa Y., Tsuchiya M., Mishima K., Yoshimura Y., Shimoyama M.* Biochim. et biophys. acta. v. 969, p. 57—65.
83. *Moss J., Watkins P. A., Stanley S. J., Purnell M. R., Kidwell R.* J. Biol. Chem., v. 259, p. 5100—5104, 1984.
84. *Witters L. A., Dermott M. Mc.* Biochemistry, v. 25, p. 7216—7220, 1986.
85. *Haroutunian A. V., Mishima K., Tsuchiya M., Tonigawa Y., Shimoyama M., Shimane S.* Med. Sci., v. 11, p. 1—12, 1987.

Поступила 28. X. 1990

НЕЙРОХИМИЯ
т. 9, № 3, 1990

УДК 612.82.571.1

СИНТЕЗ БЕЛКА В ЯДРАХ НЕЙРОНОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА И ИЗУЧЕНИЕ ЕГО ПРОДУКТОВ

САИТМУРАТОВА О. Х.

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

Обобщены литературные и собственные экспериментальные данные о роли клеточных ядер в синтезе белка, механизме биосинтеза белков в ядрах. Представлены результаты собственных исследований по включению меченых аминокислот ядер в образующиеся белки, выделению, изучению природы, органоспецифичности и их действия на двигательную активность животных.

Выяснение роли нейрональных белков и пептидов животных и человека остается одной из актуальных проблем. Значительная часть выполненных в этом направлении исследований посвящена проблемам биосинтеза белков ядрами клеток животных и механизму их синтеза.

Многообразие структурных свойств клеточных ядер эукариот обуславливает их полифункциональность. Возникновение некоторых видов болезней, в том числе злокачественных новообразований, зависит от изменения функции и активности клеточного ядра и ядрышек [1].

Исследования последних 30 лет показали, что клеточные ядра способны синтезировать сравнительно незначительное количество специфических белков. Поэтому процесс образования этих белков и механизм их синтеза привлекает особое внимание исследователей. В этой связи участие клеточных ядер в синтезе белков считается одной из самых интересных проблем и дискутируется в современной биохимии [2—4]. В ядре, вероятно, синтезируется лишь часть общеклеточного белка и, как полагают [3], синтез даже ограниченного количества специфических ядерных белков (например, негистоновых хромосомных белков) может иметь существенное физиологическое значение.

По предположению некоторых авторов [5], белки, синтезированные в ядрах, по-видимому, могут иметь особо важную роль в регуляции процессов, протекающих в ядре: при репликации генома, например, в роли посредника передачи информации в ядре, и, возможно, при синтезе нуклеиновых кислот и взаимосвязи с информационными процессами в цитоплазме. Исследуя соотношение активности ядерного полипептидного синтеза (ЯПС) и матричного синтеза белков в клетках печени крыс [6], установили, что ЯПС активируется в условиях

торможения синтеза белков в цитоплазме. На модельных опытах показано, что системы ЯПС- и ADP-рибозилирования ядерных белков конкурируют в определении общей структуры хроматина: ADP-рибозилирование способствует конденсации, а ЯПС—деконденсации хроматина.

Впервые сведения по ядерному синтезу белка появились в 1955 году, когда была исследована интенсивность включения меченых аминокислот в изолированные ядра селезенки [7]. Последующее выделение этих включений в цитоплазму было описано цитологами в некоторых нейронах, нейросекреторных клетках, овоцитах [8]. На основании полученных данных авторы пришли к выводу о наличии в ядре автономной белоксинтезирующей системы (БСС). Впоследствии аналогичные данные были получены для ядер других типов клеток животных [2, 9—19] и растений [9, 20, 21]. Работы подобного характера велись медленно и только в последние годы наличие БСС в ядрах эукариотических клеток стало установленным фактом [6]. При выяснении внутриядерной локализации меченных de novo белков после инкубации суспензии ядер в среде с радиоактивными аминокислотами и после фракционирования органелл обнаружено, что радиоактивность больше всего присуща ядрышкам, меньше—нуклеоплазме [22], внешней мембране [23], различным фракциям хроматина [2, 16, 17] и ДНП с небольшим количеством прочносвязанных белков [24].

Некоторыми исследователями изучены вновь синтезированные в ядрах продукты. Так, Zimmerman и соавт. [12], изучая синтез белка в изолированных ядрах и ядрышках клеток Hela, сделали вывод, что очищенные ядра синтезируют белок, и цитоплазматические загрязнения, содержащие рибосомы или митохондрии не ответственны за наблюдаемый синтез. При исследовании свойств ядерного синтеза белка, то есть потребности БСС отмечено отсутствие некоторых составных частей в смеси инкубации, что указывает на возможную ненужность некоторых из них, или на присутствие их в достаточном количестве внутри ядра для того, чтобы поддержать реакцию. Авторы также отмечают, что ядерные белки, очевидно, синтезируются в ядрышках. В 15%-ном ПААГ было обнаружено два радиоактивных пика: один большой, другой маленький. Фракция, обуславливающая маленький пик, растворима в кислоте, поэтому авторы предполагают возможность соответствия ее гистону. Что касается большого пика, то его природа неизвестна. Чуть позже Laval, Bouteille [13] использовали для измерения образования белка в ядерных фракциях электронномикроскопную авторадиографию. На авторадиограммах радиоактивность была связана с определенными областями ядра, в ядрышке она была в 3 раза выше, чем в остальных частях ядра. Эти результаты могут быть истолкованы в пользу концепции, что синтез белка происходит в ядре. Авторами получены чистые ядерные фракции и инкубированы с мечеными аминокислотами. При полном удалении внеш-

ней ядерной мембраны с прикрепленными к ней рибосомами в ядрах происходит синтез белка. 2,4-динитрофенол, ингибитор окислительного фосфорилирования, оказывает тормозящий эффект на процесс мечения ядер. Меченый продукт был чувствителен к проназе, так как переваривание нерастворимого материала проназой после осаждения в кислоте вызывало полную потерю радиоактивности. Авторы полагают, что включение аминокислот ядрами происходит другим путем, отличным от цитоплазматического. Позднее Laval и Mouli [17] анализировали электрофорезом в ПААГ и авторадиографически синтезированные ядрышками продукты *in vitro*. Путем электрофореза меченых ядрышковых белков обнаружили два радиоактивных пика: маленький пик растворялся в кислоте, а большой—не растворялся.

Эти же исследователи определяли N- и С-концы белка при помощи протеолитических ферментов и обнаружили радиоактивность вдоль полипептидных цепей (в середине и у С-конца). Авторы пришли к выводу, что в ядрышковой системе происходит синтез белка [17].

По данным Gallwitz и Mueller [25, 26], меченые аминокислоты включались в изолированные ядра HeLa клеток *in vitro* в присутствии цитоплазматической pH_5 фракции и системы, генерирующей энергию. Авторадиографически метка была распределена равномерно на ядре. Целью авторов было предварительно определить, какие белки действительно синтезируются в ядре. Обнаружено, что гистоны образуются в рибосомах цитоплазмы клеток [26]. Полученные результаты показали, что новосинтезированные меченые белки были равномерно распространены по всему ядру. Ядерные и микросомные системы продемонстрировали одинаково высокую чувствительность к РНКазе, ДНКазе и ингибиторам синтеза белка. ДНКаза в дозе 50 мкг/мл уменьшает активность включения аминокислот ядер на 60—70% в течение 30 мин инкубации. Предполагают, что основной механизм включения аминокислот может быть одинаковым в обеих внеклеточных системах.

Внешняя мембрана и ее частицы не ответственны за белоксинтезирующую активность ядер (БСА). Синтез белка является функцией системы, присутствующей в ядре. В качестве кандидата на эту роль были идентифицированы в электронном микроскопе в ядрах клеток тимуса, печени и HeLa ядерные рибосомы [27—29]. Поскольку их мало, совершенно очевидно, что они ответственны за низкий уровень синтеза белка, наблюдаемый в изолированных ядрах. В ядрах и цитоплазме участвуют сходные ферментные системы синтеза белка. Предполагалось существование ферментов—активаторов аминокислот и транспортных РНК при многообразии конкурирующих реакций с различной чувствительностью к концентрации ионов в ядре по сравнению с микросомной системой. Этот факт может объяснить эффективность подобных систем. В исследованиях синтеза белка в ядрах и цитоплазме показана различная природа синтезированных белков по электрофоретическому распределению с ПААГ. При электрофорезе

продукта, синтезированного *in vitro* микросомами, изолированными из клеток во время синтеза ДНК, основными являются отчетливые полосы радиоактивных гистонов; такие полосы отсутствуют в продукте ядерной системы тех же клеток, хотя гистоны составляют большую часть белка ядра. Цель исследования заключается в том, чтобы доказать связь этих белков с функцией ядра, возможно они могут исполнять какие-то специальные функции в регулировке экспрессии генов или при репликации хромосом.

Berlman, Jeffrey [13] изучали синтез белка выделенными ядрами из незрелых нервных клеток, активно делящихся и злокачественных нейробластов головного мозга взрослых крыс. По данным авторов, синтез белка нарушается, если ядра обработать неионным детергентом, тритоном X-100 или гипертонической сахарозой. Пуромицин и циклогексимид в концентрации 50—100 мкг/мл тормозят включение рибоактивной аминокислоты на 87 и 76% соответственно. Это показывает, что синтез белка в ядрах головного мозга происходит при помощи сходных механизмов в других исследованных системах. РНКаза не влияет на включение меченых аминокислот. Было также обнаружено, что синтез белка более активно происходит в глиальных ядрах по сравнению с нейрональными.

Как отмечают Reid и соавт. [30], различные белки могут быть синтезированы в ядре, но скорость синтеза этих белков отличается.

Вслед за вышеперечисленными работами Rein [15] опубликовал результаты изучения ядерного синтеза белка в нейрональных и глиальных клетках головного мозга крыс. Включение аминокислоты в белки ядер головного мозга происходит приблизительно в 3 раза активнее, чем в белки ядер печени. Наблюдалась возможность влияния цитоплазматических загрязнений на ядерный синтез белка. Кроме того, исследовалось влияние тритона X-100 на ультраструктуру ядер и частично на их способность синтезировать белки. Присутствие ионов калия сильно тормозит включение аминокислот при любом pH. Присутствие ионов натрия обязательно. Работы Allfrey и соавт. в основном подтверждают точку зрения, что синтез белка в ядре зависит от Na^+ [31—33], а в цитоплазме этот процесс требует K^+ [34]; выявлена неодинаковая способность изолированных ядер различных типов клеток головного мозга к эндогенному синтезу белка.

Работа Dravid, Wong [16] по исследованию включения [^{14}C] аминокислот в белок изолированными ядрами головного мозга крыс показывает, что в совершенно стерильных условиях Na^+, K^+, РНКаза, ДНКаза, пуромицин, циклогексимид и хлорамфеникол не влияют на способность ядер печени и головного мозга включать меченые аминокислоты в белок. При увеличении преинкубации некоторые факторы, существенные для включения аминокислот, выводятся из ядра в среду.

Эти авторы, так же как и Rein [15], выявили неоднозначную способность изолированных ядер из головного мозга и печени крыс к эндогенному синтезу белка.

Матинян и Уманский [2], используя в качестве матрицы изолированный хроматин ядер клеток печени крыс, обнаружили, что способностью стимулировать включение аминокислот обладают не только целые ядра, но и очищенный хроматин и комплекс ДНК с прочносвязанными белками. Удельная радиоактивность прочносвязанных негистоновых белков выше, чем лабильносвязанных, в гистоны метка не включается. Величина M_r выделенных меченых полипептидов, по данным гель-фильтрации и анализа N-концевых аминокислот, равна 6 кД. Меченые полипептиды, прочносвязанные с ДНК, состоят в среднем из 9 аминокислот. Удельная радиоактивность белков, прочносвязанных с ДНК, возрастает линейно с увеличением времени инкубации хроматина с гидролизатом [^{14}C] белка, а включение метки в лабильносвязанные негистоновые белки существенно увеличивается только через 30 мин после начала инкубации. Предполагается, что механизм синтеза полипептидов в системе отличается от классического механизма синтеза белка на рибосомах.

В 1978 году вышли две статьи Allen [3] и Goldl [4], в которых отмечается, что если ядра действительно способны синтезировать белок, то, по крайней мере, некоторые продукты трансляции должны быть уникальными для ядра, то есть не должны обнаруживаться в цитоплазме. Те же белки, которые действительно синтезируются ядерным механизмом, сравнивались *in vitro* как продукты трансляции ядер и цитоплазмы по электрофоретическим свойствам в ПААГ [35, 36]. Установлено, что образцы, полученные при помощи ядерных полирибосом, отличаются от образцов, полученных при помощи цитоплазматических полирибосом. В этих работах не характеризовались ядерно-специфические белки [35]. Тубулин и актин определяли в качестве основных продуктов трансляции выделенных ядер головного мозга новорожденных крыс [37]. Ядерные частицы синтезируют ядерно-специфические белки, которые отсутствуют среди продуктов трансляции цитоплазматических полирибосом. Авторы поддерживают предположение о ядерном синтезе белка.

Allen [4] приводит сведения о различиях между цитоплазматическими и ядерными полирибосомами. Однако нет ответа на ряд важных вопросов: какая часть синтеза белка может быть связана с ядром? Во всех ли клетках ограниченное количество ядерных белков может быть синтезировано на месте? Чем ограничено это количество? Ядерные белки синтезируются в самом ядре. Такой взгляд считался общепринятым до тех пор, пока не было показано, что основные классы ядерных белков синтезируются на цитоплазматических рибосомах (гистоны, негистоновые хромосомные белки). Данные о доли синтеза клеточного белка располагаются в порядке убывания следующим образом: 30% в ядрах тимоцитов теленка [38]; 10% в ядрах мышц [39] и ядрах клеток HeLa [40] и 0,2% в ядрах бластул, выделенных из морского ежа [41]. Allen приводит данные о том, что 0,4—0,8% от общего клеточного синтеза белка может быть ядерным.

Около 1% синтеза общеклеточного белка можно связать с ядрами различных клеточных типов.

Известно, что агрегатный фермент способен включать рибонуклеотидные трифосфаты в РНК. Sekeris и соавт. [42] исследовали включение аминокислот в белок ядер при помощи агрегатного фермента Вейса, который катализирует включение аминокислот в белки и во многих отношениях отличается от хорошо известных рибосомных систем.

Ситвольский, Газарян [10] на изолированных ядрах клеток слюнных желез личинок Chironomus plumosus показали, что необходимым условием для осуществления синтеза белка в ядрах является их целостность. Предполагается участие ядерных РНП-частиц в исследуемом процессе синтеза.

Согласно Nasir и Duncan [18], ингибирование синтеза белков в изолированных ядрах зобной железы теленка под действием ДНФ обусловлено не только разобщением окислительного фосфорилирования, но и блокированием транспорта компонентов синтеза внутри ядер. Цитидин и гуанозин, ингибирующие процесс ядерного фосфорилирования, могут также стимулировать белковый синтез при наличии в инкубационной смеси рибозо-5-фосфата. Фруктозо-1,6-дифосфат, стимулирующий фосфорилирование, может более чем на 50% ингибировать белковый синтез. Предполагается противоположный характер действия рибозо-5-фосфата и фруктозо-1,6-дифосфата на фосфорилирование и синтез белка.

Кузьмина и соавт. [43], используя интактные ядра, исследовали транспорт меченого белка в бесклеточной системе из ядер, изолированных из регенерирующей печени крыс. При этом было показано, что транспорт молекул белка ядер, обработанных тритоном Х-100, осуществляется с той же интенсивностью, что и в интактных ядрах. После тотального рентгеновского облучения ядер плотность поровых комплексов на периферии ядра уменьшается, что приводит к задержке выхода меченого белка из ядра в инкубационную среду. Авторы считают, что транспорт белка с импульсной меткой из ядра в цитоплазму связан с поровыми комплексами и не зависит от мембранных структур ядерной оболочки.

Казьмин, Щербан [44], изучив скорость синтеза ядерных и цитоплазматических белков ядрами синхронизированных клеток, пришли к выводу об авторегуляции процесса синтеза на протяжении всего митотического цикла. Синтез белков в ядрах исследован не только в нормальных клеточных ядрах, но и некоторых клеточных ядрах экспериментальных опухолевых клеток, например, асцитного рака Эрлиха, клеток HeLa и др., а также на ядрышках опухолевых клеток. Збарский, Перевощикова [45, 46] установили, что скорость включения меченой аминокислоты в ядра нормальных тканей в 1,5—2,0 раза превышает соответствующий показатель в ядрах саркомы М-1 крыс. Выявлена неодинаковая способность изолированных ядер различных типов клеток головного мозга к эндогенному синтезу белка [9, 14—

16]. Синтез белка исследован также в клеточных ядрах молодых животных, в частности у новорожденных телят, морского ежа. Как видно из вышеперечисленных работ, ядерный синтез белка *in vitro* исследован, в основном, в клетках печени и тимуса крыс, зобной железы теленка. Но продукт, синтезированный этими клеточными ядрами, окончательно не изучен, как впрочем и в ядрах нейронов головного мозга.

Особо следует отметить механизм синтеза белков в клеточных ядрах, по которому существует несколько предположений. Некоторые авторы допускают, что прикрепленные к внешней мембране ядер рибосомы не несут ответственности за синтез белков [32], так как при отторжении рибосом от мембраны детергентами ядра продолжают синтезировать белки и процесс этот почти не зависит от присутствия обычных ингибиторов синтеза белка. Допускается также, что в клеточном ядре содержатся все необходимые компоненты, тРНК, мРНК и т. д. для автономного синтеза собственных белков [5, 47, 48]. Наряду с этим, внутри ядра есть фермент аминоацилпептидил тРНК трансфераза, который присоединяет активированные аминокислоты к готовому пептиду и поэтому, возможно, выполняет функции рибосом [49]. Нами, наряду с другими авторами, показано, что в ядерной БСС рибосомы «не работают», а в рибосомах не срабатывают компоненты, присущие системе ядерного синтеза [32]. Существует чисто умозрительная гипотеза, что при ядерном синтезе срабатывает пятиплетный код, а не триплетный [50]. Сообщается, что белки синтезируются в ядрышке [51, 52], в «ядерных» рибосомах или хроматине [53]. Однозначные указания на наличие в ядре полноценных рибосом до сих пор отсутствуют, не установлено также функциональное значение ядерного синтеза.

Допускается возможность существования собственно ядерных рибосом [54], которые участвуют только в синтезе ядерных белков, но тогда не ясно, каким образом этот автономный синтез в самом ядре связан с цитоплазматическим синтезом. Если ядерный синтез белков действительно реализуется не рибосомным путем, то необходимо выяснить механизм этой функции ядра.

В литературе очень мало работ, посвященных изучению ядерного синтеза белков в нейрональных клетках головного мозга. Выявлена только неодинаковая способность изолированных ядер различных типов клеток головного мозга к эндогенному синтезу белка [9, 14—16]. Мы считаем, что изучение механизма биосинтеза белков в нейрональных ядрах животных, исследование структуры синтезированного ядрами продукта и его природы представляют несомненный интерес с точки зрения распознавания тонких механизмов функционирования клеток мозга.

С целью выяснения вышеперечисленных вопросов мы вели изучение синтеза белков ядрами *in vitro*, постарались выявить физиологическую активность и природу этих белков. В качестве объекта исследования нейроны были выбраны не случайно. Дело в том, что

нейрональные клетки не делятся, находятся в G_0-фазе и обладают очень большой продолжительностью жизни. Качественный состав клеток в зависимости от фазы их роста почти не меняется и поэтому нейроны могут служить удобным источником для выделения определенного типа белка.

Нам удалось расфракционировать ядра, выделить наиболее гомогенную по плотности и размерам ядерную фракцию в градиенте плотности сахарозы, изучить их БСА под влиянием различных экзогенных факторов. Процесс биосинтеза белка исследовали с помощью [^{14}C] аминокислот, инкубируя выделенные ядра в течение различного времени при 37°. Выделенные ядра нейронов в течение 60 мин продолжают синтезировать белки, после чего количественный показатель метки в ядрах стабилизируется, то есть интенсивность радиоактивности при регистрации выходит на плато. Нами исследовано изменение белоксинтезирующей активности ядер нейронов головного мозга в зависимости от времени после выделения. В частности, активность ядер снижается через сутки на 9%, через двое суток—на 20%, а через семь суток—на 58%. Поэтому фракцию ядер старались использовать сразу после выделения. Было показано, что нейрональные ядра головного мозга продолжают синтезировать белки *in vitro* при отсутствии экзогенных факторов (ферменты, смеси гидролизата аминокислот, ATP и GTP и др.). При их добавлении в инкубационную среду (50 нмоль смеси 19 немеченых аминокислот, 0,1 μ M GTP, 0,5 μ M ATP, 0,5 μ M фосфоэнолпирувата, 2 μ г пируваткиназы) интенсивность синтеза белка ядрами изменяется весьма незначительно. Добавка немеченых аминокислот в течение инкубации в концентрации 50 нмоль, как и в последующие периоды, указывает на то, что увеличение концентрации добавленных аминокислот со временем почти не влияет на скорость синтеза белка ядрами. В ядрах, во-первых, имеются все необходимые компоненты для автономного синтеза определенного количества белков, активирующие ферменты (аминокислоты, ATP, GTP и др.). Во-вторых, большинство ингибиторов рибосомного синтеза белков слабо действуют на уровень ядерного синтеза. В ядрах, очевидно, для самостоятельного синтеза белка имеется полный набор аминокислот и система активации пептидного синтеза. В процессе изучения биосинтеза белков в изолированных ядрах нам удалось установить активное образование продуктов белковой природы. Это подтверждается данными кинетики включения [^{14}C] аминокислот ядрами, положительной реакцией на белок по Лоури и наличием аминокислот в кислотном гидролизате, фракционированием меченого ядерного продукта. Таким образом, ядра являются наиболее вероятными органоидами, где осуществляется самостоятельный процесс включения меченых аминокислот в синтезируемые белковые молекулы.

Нами также показано, что ядра клеток нейронов кроликов более активно включают меченые аминокислоты в сравнении с ядрами нейронов крупного и мелкого рогатого скота, в связи с чем в дальней-

ших исследованиях мы использовали ядра нейронов кроликов. Наши результаты хорошо согласуются с работами других авторов [9]. Выявлены закономерности изменения скорости синтеза белка в зависимости от возраста животного. Оказалось, что начиная с 5-дневного возраста уровень синтеза белков возрастает и достигает максимума у 30- —35-дневных животных. По мере дальнейшего увеличения возраста активность синтеза ядерного белка снижается.

Исследовалось влияние ряда веществ: антибиотики—ингибиторы рибосомного синтеза белков, психо- и нейротропные соединения, алкалоиды и их синтетические производные, ферменты, гормоны, фенольные соединения, фосфоорганические соединения (ФОС), пептиды и ингибитор гликозилирования иммунодепрессант—батриден на БСА ядер нейронов головного мозга кроликов. Полученные результаты позволяют предполагать устойчивость ядерного синтеза белков к антибиотикам рибосомного синтеза белков, например пуромицину, циклогексимиду, белковому ингибитору рицину и ферментам. Ряд веществ активировал этот процесс, например, такие пептиды как энкефалин, эпиталамин, АКТГ$_{4-7}$ [55], а из синтетических алкалоидов такими свойствами обладали N-(β-хлорэтил)-декагидрохинолин, ликорин, лупинин, анабазина гидрохлорид, ФОС и др. Психо- и нейротропные вещества кокаин, стрихнин, аминазин, яд кобры и иммунодепрессант, ингибитор гликозилирования—батриден ингибировали этот процесс [56].

По полученным результатам определена специфичность ядерного синтеза белка в сравнении с рибосомным синтезом не только относительно условий образования, но и чувствительности к некоторым экзогенным препаратам, что согласуется с результатами других авторов [12, 14, 16]. Мы выделили среди этих соединений класс активаторов и ингибиторов. Это дает возможность определить функциональное значение этого ядерного продукта при регуляции специфическими веществами скорости и количества синтезируемых белков в ядрах.

По данным Rein и Eween [15], в ядерных мембранах обнаружены зерновидные шарики в электронном микроскопе, но это еще не указывает на наличие рибосом в ядерных мембранах. В ядерной БСС рибосомы не работают и, кроме того, ядерный синтез белка протекает в присутствии Na^+ [31—33], а рибосомный—в присутствии K^+ [3—4]. Более того, действие экзогенных химических агентов на ядерные мембраны, рецепторы, ферментные системы и на участки, которые отвечают за организацию ядерного синтеза белка, в большой степени зависит и от химического строения объектов воздействия.

Помимо вышеизложенных исследований, изучен биосинтез белков в ядрах нейрональных клеток головного мозга при попижении и повышении содержания гормонов щитовидной железы в сыворотке крови. Концентрируемые нервными клетками гормоны щитовидной железы тироксин (T_4) и трийодтиронин (T_3) имеют большое значение для нормального развития и дифференцировки клеток, а также для

функционирования головного мозга. В ядрах клеток печени [57—62], а также в нейронах головного мозга [63] находятся специфические рецепторы для T_4 и T_3, являющиеся негистоновыми белками, связанными с ДНК. Однако нет полной ясности в связи с влиянием тиреоидных гормонов на интенсивность и механизм ядерного синтеза белка. При снижении выработки гормонов в организме ядерный синтез белка снижается на 26—34%, а при увеличении гормонов также снижается на 46—57% по сравнению с контролем [63]. Эти данные свидетельствуют о том, что при нарушениях нормального функционирования железы изменяются не только регуляторные биохимические процессы, но и физиологическая деятельность НС, в том числе БСА ее ядер. Наши данные о влиянии T_4 на интенсивность синтеза белков изолированными ядрами хорошо согласуется с работами [64], выполненными на ядрах молочной железы лактирующих крольчих, а также результатами Збарского и Перевощиковой [45, 46] о том, что ядерный синтез белка снижается при патологическом состоянии организма.

Таким образом, скорость нейронального ядерного синтеза белка снижается не только при патологии мозга, но и при патологии эндокринной системы и вообще при нарушении физиологического состояния организма.

Нами впервые выделены вновь синтезированные меченые белки после инкубации ядер их ТХУ-нерастворимых осадков; их экстрагировали 0,025 М трис+0,192 М глициновым буфером, дальше экстракцию продолжали смесью 6 М мочевины, 0,1%-ного ДДС-Na и 0,14 М β-меркаптоэтанолом. Обессоленные и лиофильно высушенные белковые экстракты далее фракционировали на сефадексе G-50 с последующим разделением на высокоэффективном обращеннофазовом жидкостном хроматографе (две фракции выделены электрофоретически). Получены гомогенно меченные пики низкомолекулярных белков с M_r 25—30 и 10—15 кД. Это кратко изложено в предыдущих наших сообщениях [65]. Здесь важно отметить, что ранее такие радиоактивные пики (большой и маленький) получили также другие авторы в ядрах клеток HeLa [12] и в ядрышках печени крыс [17]. Как отмечают некоторые авторы, маленький пик, вероятно, является гистоном, а природа большого пика неизвестна [12, 17]. Другие исследователи отмечают, что гистоны синтезируются не в ядрах, а в цитоплазме клетки и затем переносятся в ядро [66]. Мы выделили два таких радиоактивных пика из ядер нейронов головного мозга кроликов. Методами ЯМР [67], ТСХ [68], ГЖХ [69], кислотного гидролиза и др. показано, что в составе этих белков есть углеводные остатки, а именно: глюкоза, ксилоза и манноза. Содержание ксилозы превышает содержание всех остальных сахаров. Интересно то, что редко встречающийся углевод ксилоза найден, например, в составе гликопротеида сыворотки крови человека [70]. Подтверждением того, что синтезированные ядрами нейронов белки являются гликопротеинами, служит тот факт, что включение [^{3}H] ксилозы в продукт значи-

гельно подавляется ингибитором гликозилирования батриденом [76].

Таким образом, нами установлено, что синтезированные в ядрах нейронов белки являются гликопротеинами. Мы еще раз подчеркиваем, что механизм синтеза белка окончательно не раскрыт, и поэтому трудно объяснить каким образом синтезированные продукты гликозилируются в ядрах. Некоторыми авторами в ядерных мембранах найдены гликозилирующие ферменты [71, 72]. Не исключено, что эти ферменты участвуют в присоединении углеводов к белковому продукту, который образуется в клеточных ядрах. Определен аминокислотный состав этих гликопротеинов [73]. В составе обоих белков преобладают следующие аминокислоты: Lys, Arg, Pro, Leu, Ala и в меньшей степени—His, Ser, Tyr. Белок с M_r 10—15 кД содержит больше кислых аминокислот Asp, Glu, но не содержит 1/2Cys и Met, в отличие от белка с M_r 25—30 кД. В структуре углеводной части в основном имеются ксилоза, манноза и глюкоза [69].

Нами начато изучение физиологической активности выделенных гликопротеинов из ядер клеток нейронов, параллельно также белков ядер печени и тимуса. Из ядер клеток печени и тимуса вновь синтезированные белки нами взяты для сравнения их с ядерными белками нейронов. По предварительным данным было показано, что гликопротеины ядер (мозга, печени и тимуса), взятые в концентрации 200 мкг/кг массы тела и введенные внутрибрюшинно, стимулируют двигательную активность (ДА) и поведенческие реакции. На ДА оказывают наиболее сильное влияние неразделенные фракции и выделенные I (M_r 25—30 кД) и II (M_r 10—15 кД) белки печени и тимуса [74]. Белки мозга обладали наиболее слабым действием на ДА из всего ряда исследованных белков. Для того, чтобы дать окончательное заключение о характере действия указанных белков, необходим детальный анализ с применением ряда тестов и, главное, с введением белков непосредственно в мозг.

Внутрикортикально введенный гликопротеин с M_r 10—15 кД из ядер нейронов в соответствии с массой животного в дозе 3 мкг вызывает изменение целого ряда электрофизиологических параметров и активацию поведенческих реакций, отчетливую активацию в лобном отделе коры и мезэнцефалической ретикулярной формации [77]. Меньшие дозы гликопротеина существенных изменений в поведении и ЭЭГ не вызывают, также не изменяют и биоэлектрическую активность гиппокампа. Как показывают наши результаты, синтезированные в ядрах низкомолекулярные гликопротеины усиливают ДА и поведенческие реакции.

В связи с тем, что ядерные гликопротеины оказывают влияние на ДА животных, изучена БСА ядер при действии нейро- и психотропных препаратов (кокаина, стрихнина, аминазина и яда кобры), введенных в ушные вены животных. При этом обнаружено резкое снижение скорости синтеза гликопротеинов в сравнении с контролем. Кокаин в концентрации 8 мк/кг на 94% ингибирует образование бел-

ков в ядрах в опытах *in vivo*, стрихнин (0,2 мк/кг)—на 72%, аминазин (1,4 мг/кг)—на 58% и яд кобры (0,1 мг/кг)—на 70%.

При кратковременном и продолжительном действии эндогенно введенных нейротропных препаратов установлены количественные изменения в кинетике БСА ядер клеток, которые влияют на соотношение образования низкомолекулярных нейрональных гликопротеинов [75].

Исследование действия различных нейротропных препаратов на синтез белков в ядрах нейрональных клеток позволит получить сведения о функциональном состоянии ядерной мембраны, и послужит модельной системой для изучения процессов, связанных с кодированием информации памяти. Для сравнения синтезированных продуктов различных клеток ядра инкубировались в одинаковых стандартных условиях и экстрагировались в соответственно равных условиях. Для выделения ядер нейронов применялся метод градиента сахарозы различной плотности. Мы провели сравнительное изучение белков, синтезированных *in vitro* ядрами нейронов головного мозга, клеток печени и тимуса кроликов. Оказалось, что несмотря на близость значения величин M_r белков, синтезированные *in vitro* в ядрах нейронов мозга белки нейронов отличаются от белков печени и тимуса не только по аминокислотному составу, содержанию нейтральных сахаров, У.А. синтеза, характеру действия на ДА животных, но и по динамике титра антителообразования у животных, иммунизированных этими белками [74].

Полученные нами данные указывают на существенные различия в путях биосинтеза белков в ядрах нейронов головного мозга и рибосомах цитоплазмы, а также их различную чувствительность к одним и тем же воздействиям. Эти факты позволяют формировать понятие об уникальности происхождения БСА ядер и самостоятельном функциональном значении этого процесса. Результаты наших исследований подтвердили предположения многочисленных авторов о том, что ядра снабжены всеми необходимыми компонентами для самостоятельного синтеза белка, что реализуется, по-видимому, не матричным путем, а при помощи комплекса мультиферментной системы.

PROTEIN SYNTHESIS IN THE DUCLEI OF BRAIN NEURONS

SAITMURATOVA O. Kh.

A. A. Sadykov Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the Uzbek. SSR, Tash'ent

This paper summarizes literature and experimental data of the author on the role of cell nuclei in protein synthesis as well as on the mechanism of protein synthesis in the nuclei. Data are presented on the incorporation of labeled amino acids into nuclear proteins, their isolation, studies on the nature, organ specificity on the effect of these proteins on the motor activity of animals.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Челидзе П. В., Зацепина О. В.* Тезисы докл. IX Всесоюзн. симпозиума «Структуры и функции клеточного ядра», Черноголовка, с. 38, 1987.
2. *Матинян К. С., Уманский С. Р.* Биохимия, т. 43, вып. 1, с. 111—120, 1978.
3. *Allen W. R.* Trends in Biochem. Sciences, v. 3, № 10, p. 225—228, 1978.
4. *Goidl J. A.* Trends in Biochem. Sciences, v. 3, № 10, p. 228—230, 1978.
5. *Георгиев Г. П.* Ядра. Цитология ферментов, с. 32—37, М., Мир, 1971.
6. *Гудникова М. Н., Шевченко Н. А., Бойков Ю. И., Митрохин Ю. И., Тодоров И. Н.* Биохимия, т. 50, вып. 12, с. 1990—1996, 1985.
7. *Cartny K. M., Parson T. J., Carter A. W., Jasslo J.* J. Biol. Chem., v. 41, № 23, p. 5489—5499, 1966.
8. *Кедровский Б. В.* Цитология, т. 3, № 3—4, с. 312, 1961.
9. *Джохадзе Д. И., Раквиашвили Н. Р.* Сообщ. АН ГрузССР, № 3, с. 299—305, 1975.
10. *Ситвольский Н. С., Газарян К. Г.* Цитология, т. 18, № 11, с. 1403—1408, 1976.
11. *Розгони И. И., Галяс В. Л.* Докл. АН СССР, т. 5, № 5, с. 449—451, 1977.
12. *Zimmerman E. F., Nackey J., Nelson P., Arias J.* Biochemistry, v. 18, № 6, p. 2636—2644, 1969.
13. *Laval M., Bouteille M.* Experimental Cell Research, v. 79, № 2, p. 391—403, 1973.
14. *Burdman J. A., Jouney J. L.* J. Neirochemistry, v. 16, p. 493—500, 1969.
15. *Lovtrup-Rein H., Mc Eween B. S.* Brain Res., v. 19, p. 433—444, № 3, 1970.
16. *Dravid A. R., Wong E.* J. Neurochem., v. 19, p. 2707—2725, 1972.
17. *Laval M., Mouli Y.* Biochemie, v. 58, p. 1157—1179, 1976.
18. *Nasir B., Duncan D.* Biochem. Med., v. 8, № 5, p. 464—471, 1973.
19. *Кульминская А. С.* и др. Цитология, т. 16, с. 575—581, 1974.
20. *Джохадзе Д. И.* Биохимические особенности клеточных ядер различных тканей, с. 176, Тбилиси, 1977.
21. *Дурмишидзе С. В., Джохадзе Д. И.* Докл. АН СССР, т. 242, № 2, с. 453, 1978.
22. *Shirley M. A., Anderson K. M.* Int. J. Biochem., v. 10, № 3, p. 251—256, 1979.
23. *One H., Tarayama H.* Biochim. et biophys. acta, v. 166, № 1, p. 175—185, 1968.
24. *Umansky S. R., Matinyan K. S., Torarskya V. J.* European G. J. Biochem., v. 105, № 1, p. 117—129, 1980.
25. *Gallwitz D., Mueller G. C.* European Journal of Biochemistry, № 9, p. 451—453, 1969.
26. *Gallwitz D., Mueller G. C.* Science, v. 163, p. 1351, 1969.
27. *Frenster J. H., Allfrey V. G., Mirsky A. E.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 7, 46, p. 432, 1960.
28. *Wang T. Y.* Biochim. et biophys. acta, v. 49, p. 108, 1961.
29. *Winckelmans D., Hill M., Errera M.* Biochim. et biophys. acta, v. 80, p. 52, 1964.
30. *Reid B. D., Stellwagen P. H., Cole R. D.* Biochim. et biophys. acta, v. 155, p. 583, 1968.
31. *Allfrey V. G., Hopkins J. W., Frenster J. H., Mirsky A. E.* Ann. N. Y. Sci., v. 88, p. 722—740, 1960.
32. *Allfrey V. G.* J. Cell. Biol., v. 21, p. 213, 1964.
33. *Allfrey W. G., Mendt R., Hopkins J. W., Mirsky A. E.* Proc. Nat. Acad Sci., USA, 47, p. 907—932, 1961.
34. *Sacns H.* J. Biol. Chem., v. 233, p. 643—649, 1958.
35. *Chatterjee N. K., Dickerman H. W., Beach T. A.* Arch. Biochem. and Biophys., v. 183, p. 228, 1977.
36. *Pederson T.* J. Mol. Biol., v. 82, p. 163, 1974.
37. *Lipman F.* Science, v. 173, p. 875, 1971.

38. *Goldl J. A., Canaani D., Bonblik M., Weiss-bach H., Dickerman H.* J. Biol. Chem., v. 250, p. 9198, 1975.
39. *Allen W. R., Wilt F. H.* Exp. Cell., Res., v. 97, p. 151, 1975.
40. *Phillips W. F., Conkey Mc E. H.* J. Biol. Chem., v. 251, p. 2876, 1976.
41. *Goidl J. A., Canoni D., Boublik M., Weissbach H., Dickerman H.* Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol., v. 34, p. 706, 1975.
42. *Sekeris C. E., Schmid W., Gallwitz D., Lukacs O.* Life Sci., v. 5, p. 969—975, 1966.
43. *Кузьмина С. Н., Бульдяева Т. В., Троицкая Л. П.* Докл. АН СССР, т. 250, № 4, с. 1005—1008, 1980.
44. *Казьмин С. Д., Щербак С. Д.* Биохимия, т. 45, вып. 1, с. 28—34, 1980.
45. *Збарский И. Б., Перевощикова К. А.* Вопр. мед. химии, т. 6, вып. 1, с. 34—40, 1960.
46. *Збарский И. Б., Перевощикова К. А.* Биохимия, т. 22, вып. 1—2, с. 295—304, 1957.
47. *Wilson S. N., Hoagland M. B.* Proc. Nat. Acad. Sci., v. 54, № 2, p. 600—607, 1965.
48. *Frenster I. G., Allfrey V. G., Mirsky A. E.* Nat. Acad. Sci., v. 46, № 4, p. 432—444, 1960.
49. *Шапвиль Ф., Энни А. Л.* — В кн.: Биосинтез белка, с. 264—279, М., Мир, 1977.
50. *Крик Ф.* Природа, № 3, с. 25—26, 1978.
51. *Brinstell M. L., Hyde B. B.* J. Cell Biol., v. 18, № 1, p. 41—50. 1963.
52. *Anderson K. M., Crosthwait H. C., Slavic M.* Exp. Cell Res., v. 66, p. 273—282. 1971.
53. *Gurley J. R., Walters R. A., Enger M. D.* Biochem. and Biophys. Res. Commun. v. 40, № 2, p. 428—436, 1970.
54. *Стрелков Л. А., Чиаурели Н. Б., Кафиани К. А.* Молекуляр. биология, т. 17, вып. 5, с. 10—17, 1983.
55. *Саитмуратова О. Х.* ДАН УзССР, № 5, с. 47—48, 1988.
56. *Саитмуратова О. Х.* Нейрохимия, т. 8, № 1, с. 149—150, 1989.
57. *Азимова Ш. С., Петрова О. С., Абдукаримов А. А.* Биохимия, т. 50, вып. 1, с. 114—121, 1985.
58. *Серкс М., Оппенгеймер Дж.* — В кн.: Взаимодействие гормонов с рецепторами, М., с. 364, 1979.
59. *Gallon V. A., Schaafsma G.* Endocrinology, v. 112, № 6, p. 1999—2006, 1983.
60. *Ungar G.* Internat. rev. of neurobiology, New York. Acad. Press. v. 17, p. 37—60, 1975.
61. *Bres O., Eales I. G.* Gen. and Comp. Endocrinol., v. 61, № 1, p. 29—39, 1986.
62. *Erkenbrack D. E.* Endocrinology, v. 119, № 1, p. 311—317, 1986.
63. *Саитмуратова О. Х., Туракулов Я. Х.* Узб. биол. журн., № 2, с. 5—9, 1988.
64. *Цветкова Н. Я.* Бюллетень Всесоюзного научно-исследовательского института физиологии и биохимии с/х животных, вып. 3, с. 19—20, 1970.
65. *Саитмуратова О. Х., Ахмедова Д., Рашидходжаева Г., Леонтьев В. Б.* Узб. биол. журн., № 6, с. 67—69, 1979.
66. *Gurley L. R., Enger M. D., Walsters R. A.* Biochemistry, v. 12, № 2, p. 237—245, 1973
67. *Леонтьев В. Б., Мухамедханова С., Саитмуратова О. Х., Ахмедова Д., Рашидходжаева Г.* Тезисы докл. Всесоюзн. конф. по ЯМР спектроскопии высокого разрешения, Ташкент, Изд-во «Фан», с. 97, 1979.
68. *Саитмуратова О. Х., Ахмедова Д., Алимходжаева Г.* Химия природн. соедин., № 6, с. 791—792, 1983.
69. *Саитмуратова О. Х., Немцова О. Г., Леонтьев В. Б.* Химия природн. соедин., № 4, с. 565—567, 1987.

70. *Rajendra V., Arthur H. Y.* Carbohyd Res., v. 82, № 2, p. 343—351, 1980.
71. *Gardon D. H., Snow C. M., Senior A.* et al. The Journal of Cell Biology, v. 104, № 5, p. 1157—1164, 1988.
72. *Hart G. W.* 14-th International Congress of Biochemistry, MO: S 21—4, v. 1, p. 20, Prague, 1988.
73. *Саитмуратова О. Х., Леонтьев В. Б., Ахмедова Д., Рашидходжаева Г.* Узб. биол. журн., № 4, с. 62—63, 1980.
74. *Саитмуратова О. Х.* Нейрохимия, т. 8, № 1, с. 70—71, 1989.
75. *Саитмуратова О. Х., Рустамова Ф., Садыков А. А., Леонтьев В. Б.* Нейрохимия, т. 6, № 3, с. 360—367, 1987.
76. *Саитмуратова О Х., Хазбиевич И. С., Насыров С. Х.* ДАН УзССР, № 9, с. 46—48, 1986.
77. *Саитмуратова О. Х.* ДАН УзССР, № 5, с. 53—55, 1987.

Поступила 20. 11. 1990

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

1. В журнале публикуются статьи, содержащие ранее не опубликованные результаты экспериментальных исследований по биохимии нервной системы, обзоры по важнейшим вопросам современной нейрохимии, рецензии на новые издания и актуальная научная хроника. Объем рукописи (включая резюме, список литературы и иллюстрации) не должен превышать 15 с., напечатанных на машинке через 2 интервала. Объем обзоров не более 20 с., кратких сообщений, рецензий и хроники 4 с., а писем в редакцию—2 с. Рукопись статьи должна подписываться всеми авторами (2 экз.) и сопровождаться актом экспертизы (2 экз.) и направлением от учреждения.

2. Перед каждой статьей, кроме кратких сообщений, должно быть напечатано краткое резюме (через 1,5 интервала) объемом не более 0,5 с., которое должно отражать цель и основные результаты работы. Ко всем статьям без исключения на отдельном листе прилагается тот же текст на английском языке.

Экспериментальные статьи должны быть разбиты на разделы: материалы и методы, результаты и обсуждение, литература. Иногда более целесообразным являются разделы—результаты исследований и обсуждение результатов. В кратких сообщениях выделять указанные разделы не следует. Заглавие статьи должно быть ясным, кратким и информативным. Под заглавием следует указать фамилии и инициалы авторов, а в правом верхнем углу над ним индекс универсальной десятичной классификации (УДК).

3. Список литературы составляется в порядке цитирования. Все ссылки печатаются на машинке на языке оригинала через 1,5 интервала. В тексте ссылки даются в квадратных скобках. Цитируемая литература в списке приводится в следующем порядке: порядковый номер, фамилия и инициалы авторов на языке оригинала, название журнала, том, номер или выпуск, страницы, год издания. В случае сплошной нумерации страниц тома номер выпуска не указывать. При цитировании книги указывается также под чьей редакцией она издана, название издательства и место издания.

Под списком литературы слева указывается полное название учреждения, в котором выполнена работа, а справа—дата ее поступления в редакцию.

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

Рисунки, отчетливо выполненные тушью на плотной белой бумаге или кальке, представляются в конверте в двух экземплярах. На обороте каждого рисунка карандашом следует указать фамилии авторов, сокращенное название статьи и порядковый номер, для фотографий (на глянцевой бумаге) обозначить ее верх и низ. Подписи к рисункам и фотографиям представляются на отдельном листе.

5. В приложении к правилам для авторов, которое публикуется в каждом первом номере нашего журнала, приводится список наиболее часто употребляемых сокращенных обозначений, разрешаемых применять без специальной расшифровки. Используемые авторами другие сокращенные слова при первом упоминании даются полностью и в скобках в сокращенном виде. Фамилии иностранных авторов даются на языке оригинала.

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

7. Редакция высылает автору второй экземпляр отредактированной рукописи для ознакомления и доработки. В случае возврата статьи для исправления датой поступления ее в редакцию считается день поступления исправленного текста.

8. Корректуру авторам редакция не высылает.

СОДЕРЖАНИЕ

Маслова Г. Б., Августинович Д. Ф., Попова Н. К. Влияние андрогенов на серотониновые рецепторы мозга крыс 293

Подгорная Е. К., Галкина О. В., Ильюченок Р. Ю. Связывание [3H]дофамина $ДА_2$-рецепторами синаптических мембран различных зон мозга крыс после условной реакции пассивного избегания 301

Киарян В. А., Априкян Г. В. Кинетический анализ высокоаффинного захвата L-аспарагиновой кислоты синаптосомами головного мозга белых крыс при старении 309

Абрамян С. С., Чилаг А., Срапионян Р. М., Месропян Н. Г., Галоян А. А. Иммуногистохимическая локализация гипоталамических кардиоактивных белок-гормональных комплексов в микроструктурах мозга крыс . . 316

Назарян К. Б., Егорян Р. А., Казарян Б. А. О взаимодействии фосфоглицератмутазы и енолазы головного мозга 326

Костанян А. А., Казарян Б. А., Назарян К. Б. Регуляция гликолиза в головном мозгу крыс эстрадиолом-17β и прогестероном 332

Скоблева Н. А., Захарян Р. А., Бухман В. Л., Киселев С. Л., Михайлов С. А. Молекулярное клонирование и определение первичной структуры гена NSE из мозга крысы 339

Краткие сообщения

Мельник В. И., Шукалова Т. Ф., Глебов Р. Н. Нейролептики различных классов подавляют H+-транспорт в мембранах синаптических пузырьков мозга крыс 345

Левитина М. В. Жирные кислоты цереброзидов и сульфоцереброзидов головного мозга байкальской нерпы 350

Даниелян И. С., Меликян Г. Г., Акопян А. Г., Гарибян Д. В., Джагацпанян И. А., Гарибджанян Б. Т. Изменение метилирования ДНК мозга при выработке условного рефлекса пассивного избегания 354

Мартиросян М. А., Карагезян К. Г., Ханбабян М. В., Саркисян Л. В. Динамика изменений содержания α-токоферола в мозговой ткани в разных стадиях коразоловой эпилепсии 358

Научные дискуссии

Туманова С. Ю. Полупроводниковые модули мембран мозга 361

Письма в редакцию

Галоян А. А., Гуроц Б. Я. Новые гипоталамические кардиотропные соединения—универсальные активаторы базальной активности кальмодулинзависимых ферментов 369

Обзоры

Арутюнян А. В. ADP-рибозилирование белков в мозгу и других органах . 373

Саитмуратова О. Х. Синтез белка в ядрах нейронов головного мозга и изучение его продуктов 390

CONTENTS

Maslova G. B., Avgustinovich D. F., Popova N. K. The effect of androgens on serotonin receptors of the rat brain 293

Podgornaya E. K., Galkina O. V., Ilyuchenok R. Yu. Parameters of [^{3}H] dopamine binding by DA_2-receptors of synaptic membranes of various regions of the rat brain after CRPA learning 301

Knaryan V. A., Aprtkyan G. V. Kinetic analysis of affinity L-aspartic acid uptake by rat brain synaptosomes during aging 309

Abramyan S. S., Csillag A., Sraplonyan R. M., Mesropyan N. G., Galoyan A. A. Immunohistochemical localization of hypothalamic cardioactive protein-hormonal complexes in rat brain microstructures 316

Nazaryan K. B., Egoryan R. U., Kazaryan B. A. A relationship between brain phosphoglyceromutase and enolase 326

Kostanyan A. A., Kazaryan B. A., Nazaryan K. B. Control of glycolysis by estradiol—17beta and progesterone in rat brain 332

Skobeleva N. A., Zakharyan R. A., Bukhman V. L., Kiselev S. L., Mikhalov S. A. Molecular cloning and sequencing of rat brain NSE gene 339

Short communications

Mel'nik V. I., Shukalova T. F., Glebov R. N. Neuroleptics of different classes abolish H+ transport in synaptic vesicle membranes of rat brain 345

Levitina M. V. Fatty acids of cerebrosides and sulphocerebrosides in the brain of the baikal seal 350

Danielyan I. S., Melikyan G. G., Akopyan A. G., Harthyan D. V., Dzhagatspanyan I. A., Garibdzhanyan B. T. Modification of DNA methylation in the brain during formation of the conditioned passive avoidance reflex . 354

Martirosian M. A., Karaguezian K. G., Chanbabian M. V., Sarkisian L. V. The dynamics of changess in α-tokopherol content in brain tissue at the various stages of corazol epilepsy 358

Scientific discusion

Tumanova S. Yu. Semiconductor modules of brain membranes 361

Letters to Editor

Galoyan A. A., Gurvits B. Yu. The in cardioactive compounds of hypothalamus—universal activators of basal activity of calcium-calmodulin dependent enzymes 369

Reviews

Arutyunyan A. V. ADP-ribosylation of protein in brain and other organs . . . 373

Saitmuratova O. Kh. Protein synthesis in the nuclei of brain neurons 390