т. 9, № 4, 1990

ISSN 0203—393X

НЕЙРОХИМИЯ

ՆԵՅՐՈՔԻՄԻԱ

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЕНИИ

Ст. редактор Э. А. ХАЧАТУРОВА
Лит. сотрудник Г. Р. ГРИГОРЯН

Сдано в набор 7.06. 1991 г. Подписано к печати 5. 12. 1991 г.
Формат 70×108 1/16. Бумага № 1 «сыктывкарская». Высокая печать.
Печ. лист. 7,75. Усл.-печ. лист. 10,85. Усл кр. от 10,85 Учет.-изд. 8,98.
Тираж 715. Заказ 171. Издат. 7954. Цена 3 р. 30 коп.
Адрес редакции: 375052, Ереван, ул. Асратяна, 9. 1 эт., 152 к., т. 28-20-31
Издательство АН Армении, 375019, Ереван, пр. Маршала Баграмяна, 24 г.
Типография Издательства Академии наук Армении, Ереван, 375019,
пр. Маршала Баграмяна, 24.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЕНИИ

НЕЙРОХИМИЯ
ՆԵՅՐՈՔԻՄԻԱ

ТОМ 9, ВЫП. 4
ОКТЯБРЬ—ДЕКАБРЬ

Журнал основан в 1982 году
Выходит 4 раза в год

ИЗДАТЕЛЬСТВО АН АРМЕНИИ
ЕРЕВАН 1990

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, № 4, 1990

УДК 612.822.1:615.214.2

ВЛИЯНИЕ ФОСФОЛИПАЗЫ A_2 НА СВЯЗЫВАНИЕ м-ХОЛИНО- И β-АДРЕНОБЛОКАТОРОВ СИНАПТОСОМАМИ МОЗГА КРЫС

МАНУХИН Б. Н., КИЧИКУЛОВА Т. П., МОСКОВКИН Г. Н.

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

На синаптосомах мозга 15-дневных и взрослых крыс установлено достоверное различие в величине основных параметров B_{max} и K_d, характеризующих связывание специфических блокаторов м-холино- и β-адренорецепторов [^{3}H] хинуклидинилбензилата и [^{3}H] дигидроалпренолола.

Показано, что мембраноактивный компонент из яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana* фосфолипаза A_2 в концентрации 1 мкг/мл вызывает, как правило, характерные изменения B_{max} и K_d связывания синаптосомами [^{3}H] хинуклидинилбензилата и [^{3}H] дигидроалпренолола.

Предполагается, что функциональные перестройки мембраны в процессе развития животных или вызванные фосфолипазой A_2 приводят к сдвигам в специфической активности адрено- и холинорецепторов и, как следствие, к изменению адренергической и холинергической реакций.

Процесс морфологического и функционального становления ЦНС у высших животных в онтогенезе не завершается на стадии пренатального развития, а продолжается после рождения [1]. В частности, существенно отличаются по физико-химическим свойствам липиды мембран взрослого и развивающегося мозга крыс в течение трех недель после рождения [2]. Поскольку специфические рецепторы нейротрансмиттеров являются интегральной частью цитоплазматической мембраны, можно ожидать, что способность синаптосом связывать нейротрансмиттеры и их антагонисты может меняться по мере созревания мембран нейронов.

Было установлено, что яд среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana* и его мембраноактивные компоненты фосфолипаза A_2, цитотоксин и нейротоксин вызывают достоверные характерные изменения адренергической и м-холинергической реакций изолированных отрезков тонкой кишки крысы [3, 4]. Изолированный отрезок тонкой кишки представляет сложную гетерогенную тканевую систему, изменение реакции которой на нейротрансмиттеры может быть следствием воздействия яда и его компонентов не только на специфические адрено- и холинорецепторы мышечных элементов, но и на клеточную мембрану, нервные сплетения и т. д. Поэтому для уточнения локализации действия мембраноактивных компонентов на медиаторную реакцию необходимо использовать более простую экспериментальную модель, ко-

торая структурно будет однородной системой. Одной из наиболее адекватных моделей для изучения элементарных нейрохимических процессов являются синаптосомы. Синаптосомы сохраняют ряд основных свойств нервных окончаний и постсинаптических мембран. В частности, способность их рецепторов связывать специфические лиганды, что изменяет трансмембранный транспорт ионов и медиаторов в синаптосомы [5].

Ранее было показано, что яд среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana* и его мембраноактивный компонент фосфолипаза A_2 тормозят специфическое связывание синаптосомами коры мозга крысы блокатора м-холинорецептора хинуклидинилбензилата [6].

Задачей настоящей работы было выяснение особенностей действия мембраноактивного агента фосфолипазы A_2 на способность синаптосом мозга взрослых и 15-дневных крыс связывать радиоактивные блокаторы м-холино- и β-адренорецепторов.

Материалы и методы

Синаптосомы из коры мозга крыс линии *Wistar* выделяли по методу Hajos [7]. Суспензию синаптических мембран инкубировали при 37° в течение 5 мин в присутствии фосфолипазы A_2 в концентрации 1 мкг/мл. После быстрого охлаждения в ледяной бане и добавления 15-кратного объема холодного раствора Тироде, суспензию синаптосом дважды центрифугировали при 20 000 g в течение 20 мин. Полученные осадки суспензировали в 0,05 М фосфатном буфере pH 7,4 и использовали для радиолигандного анализа. Общий объем инкубационной среды—500 мкл, объем суспензии синаптосом—50 мкл, концентрация радиолигандов от 0,25 до 16 нМ. Для определения неспецифического связывания лигандов использовали атропин или пропранолол в концентрации 10 мкМ. Инкубацию проводили при 25° в течение 60 мин. Связывание останавливали быстрым охлаждением в ледяной бане. Связанный с синаптосомами и свободный радиолиганд разделяли центрифугированием при 20000 g или фильтрацией через стеклянные фильтры GF/B («Whatman», Англия) с последующей их промывкой 6—8 объемами фосфатного буфера. Осадки после центрифугирования промывали двукратным объемом фосфатного буфера и инкубировали сутки в 0,5 мл 1%-ного раствора тритона Х-100. Растворенный осадок или фильтр (после фильтрации) переносили во флаконы с сцинтилляционной жидкостью ЖС-8. В каждом опыте использовали 4—6 концентраций лиганда, по 3 параллели для каждой концентрации. Радиоактивность измеряли на сцинтилляционном счетчике SL-4000 («Intertechnique», Франция). Эффективность счета—37%. Содержание белка определяли по методу Лоури. Для расчета параметров связывания радиолигандов использовали метод наименьших квадратов. Статистическую обработку результатов проводили с применением критериев Стьюдента и непараметрических методов (кластерный анализ и ранговая корреляция).

В работе были использованы: [^{3}H] хинуклидинилбензилат, У. А. 12,3 Ки/ммоль, [^{3}H] дигидроалпренолол, У.А. 73 Ки/моль («Amersham», Англия), фосфолипаза A_2 из яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana* (Институт биохимии АН Узбекской ССР).

Результаты исследования

Специфическое связывание использованных в работе лигандов холино- и адренорецепторов—это типичный насыщаемый процесс. Неспецифическое связывание на фоне атропина и пропранолола линейно зависит от концентрации лиганда. Фосфолипаза A_2 не изменяет общий характер кривой специфического связывания лигандов, но, как правило, снижает его величину. На неспецифическое связывание лигандов фосфолипаза A_2 достоверного влияния не оказывает. В качестве примера на рис. 1 представлены результаты одного из

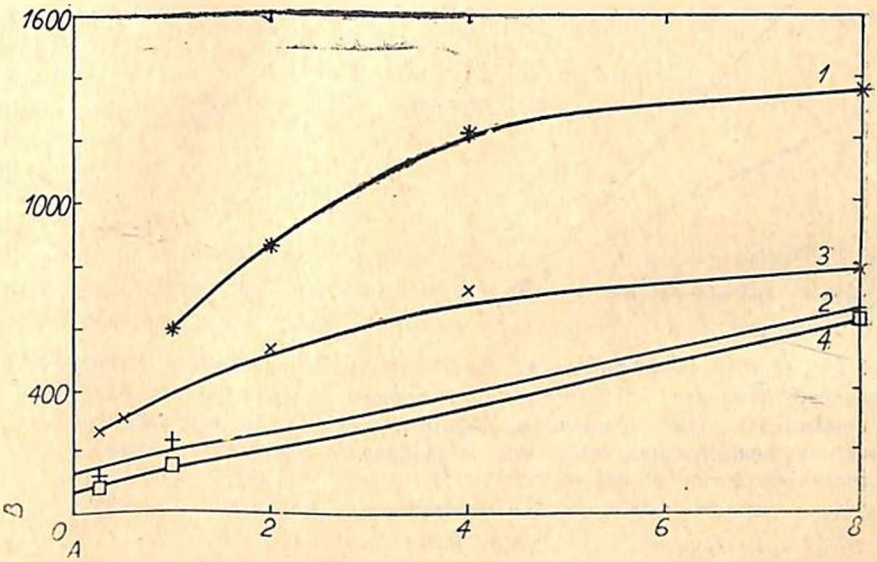


Рис. 1. Действие фосфолипазы A_2 на связывание [^{3}H]хинуклидинилбензилата синаптосомами головного мозга взрослых крыс. По оси абсцисс—концентрация свободного [^{3}H]хинуклидинилбензилата, по оси ординат—концентрация связанного [^{3}H]хинуклидинилбензилата, *1,2*-специфическое и неспецифическое связывание лиганда (контроль); *3,4*—специфическое и неспецифическое связывание лиганда после обработки фосфолипазой A_2 (1 мкг/мл). А—концентрация свободного лиганда (нМ), В—концентрация связанного лиганда (фмоль/мг белка)

опытов по влиянию фосфолипазы A_2 (1 мкг/мл) на специфическое и неспецифическое связывание синаптосомами головного мозга взрослых крыс [^{3}H] хинуклидинилбензилата. На рис. 2 *а* приведены результаты того же опыта в координатах Хофсти-Скетчарда. В использованной системе координат экспериментальные точки удовлетворительно укладываются на одну прямую линию, что позволяет говорить о гомогенности пулов холинорецепторов. Под влиянием фосфолипазы

A_2 снижается концентрация мест связывания и величина K_d. Как видно из данных, приведенных в табл. 1, происходит достоверное снижение плотности мест связывания лиганда на 42% и значительное (на 46%), но статистически недостоверное (по Стьюденту) снижение величины K_d. Однако непараметрическая статистическая обработка результатов показывает достоверное различие между контрольной и опытной группами. Такое однонаправленное снижение двух основных параметров связывания лиганда приводит к тому, что величина эффективности связывания $E = B_{max}/K_d$ [8] изменяется значительно меньше, чем основные параметры.

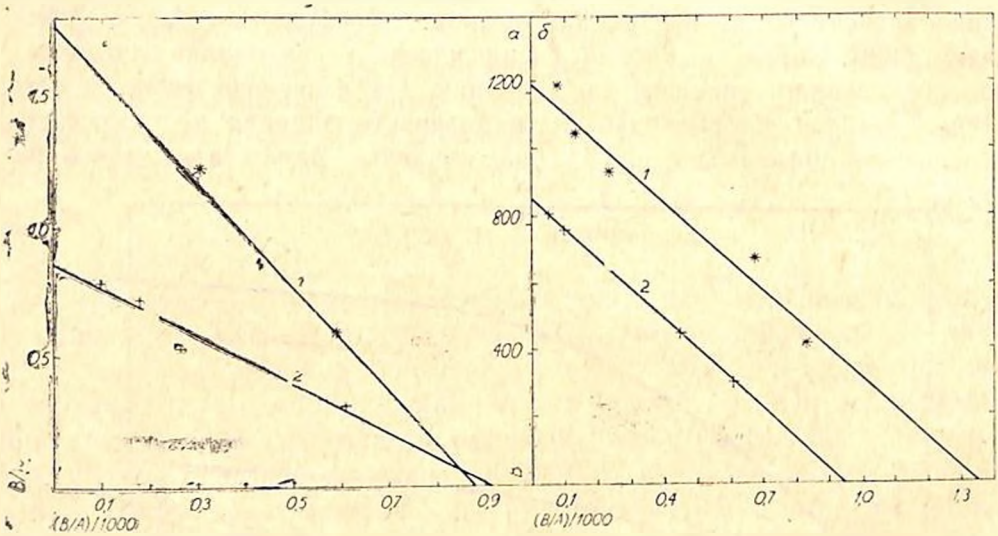


Рис. 2. Действие фосфолипазы A_2 на специфическое связывание [^{3}H]хинуклидинилбензилата синаптосомами головного мозга взрослых *(а)* и 15-дневных *(б)* крыс (координаты Хофсти-Скетчарда). По оси абсцисс— отношение концентраций связанного и свободного лиганда. *1*—контроль, *2*—после обработки фосфолипазой A_2 (1 мкг/мл). А—концентрация свободного лиганда (нМ), В—концентрация связанного лиганда (фмоль/мг белка)

На рис. 2, *б* показан график связывания [^{3}H] хинуклидинила синаптосомами мозга 15-дневных крыс. Также как у взрослых крыс места связывания лиганда представлены одним пулом. Видно, что способность синаптосом мозга молодых крыс связывать [^{3}H] хинуклидинил отличается от взрослых только количественно. У них достоверно меньше мест связывания лиганда (B_{max}) и выше к нему сродство (табл. 1). Фосфолипаза A_2 в концентрации 1 мкг/мл вызывает достоверное снижение плотности мест связывания и не оказывает существенного влияния на величину K_d. Величина эффективности связывания лиганда E уменьшается на 27%, а B_{max} на 20%, то есть примерно в равной степени.

Общая закономерность связывания синаптосомами мозга крысы блокатора β-адренорецепторов [^{3}H] дигидроалпренолола сходна со связыванием [^{3}H] хинуклидинила. Наблюдается типичная кривая на-

сыщения с выходом на плато. Однако в координатах Хофсти-Скетчарда обнаруживается четко выраженный кооперативный эффект [9] с коэффициентом Хилла, равным 2. На рис. 3, *а* представлены результаты опыта по действию фосфолипазы A_2 на связывание [^{3}H] дигидроалпренолола синаптосомами мозга взрослых крыс. Из графика следует, что места связывания лиганда представлены одним пулом, а равный двум коэффициент Хилла позволяет предположить, что к одному месту связывания присоединяются две молекулы лиганда.

Таблица 1

Влияние фосфолипазы A_2 (ФЛ-A_2) на связывание [^{3}H] хинуклидинилбензилата синаптосомами мозга взрослых и 15-дневных крыс

Крысы		Контроль	ФЛ-A_2, 1 мкг/мл
Взрослые (6 опытов)	Kd нМ	1,91±0,29	1,93±0,12
	B_{max} фмоль/мг	1730±120	897±43*
	$E = B_{max}/2Kd$	453	435
15-дневные (6 опытов)	Kd нМ	0,91±0,04	1,01±0,09
	B_{max} фмоль/мг	1129±17	912±34*
	$E = B_{max}/2Kd$	620	451

Примечание. *$p<0,05$ (по Стьюденту).

Общий характер связывания лиганда синаптосомами 15-дневных крыс такой же, как и у взрослых. Существенно отличается плотность мест связывания. У взрослых она выше почти в 7 раз, выше у них также Kd—более, чем в 8 раз (табл. 2).

Таблица 2

Влияние фосфолипазы A_2 (ФЛ-A_2) на связывание [^{3}H] дигидроалпренолола синаптосомами мозга взрослых и 15-дневных крыс

Крысы		Контроль	ФЛ-A_2
Взрослые (6 опытов)	Kd нМ	8,81±5,43	9,53±0,97
	B_{max} фмоль/мг	1928±97	1640±12*
	$E=B_{max}/2Kd$	109	86
15-дневные (6 опытов)	Kd нМ	1,05±0,32	1,3[illegible]±0,57
	B_{max} фмоль/мг	276±40	392±54
	$E=B_{max}/2Kd$	131	152

Примечание. *$p<0,05$ (по Стьюденту).

В синаптосомах взрослых крыс фосфолипаза A_2 в концентрации 1 мкг/мл вызывает (рис. 3, *а*) сдвиг прямой влево параллельно контрольной. Это указывает на снижение концентрации мест связывания лиганда без изменения сродства. Из средних данных, приведенных в табл. 2, видно, что фосфолипаза A_2 достоверно снижает плотность мест связывания [^{3}H] дигидроалпренолола. Величина Kd в этих условиях практически остается неизменной.

Несколько другие результаты получены при действии фосфолипазы A_2 на синаптосомы мозга 15-дневных крыс. На рис. 3, *б* видно, что в этих условиях происходит увеличение угла наклона прямой. Это указывает на повышение концентрации мест связывания лиганда. Фосфолипаза A_2 в синаптосомах 15-дневных крыс не вызывает достоверных (по Стьюденту) изменений в параметрах, характеризующих связывание лиганда (табл. 2). Однако наблюдается четкая тенденция к увеличению мест связывания лиганда. По данным непараметрической статистики, эти изменения достоверны.

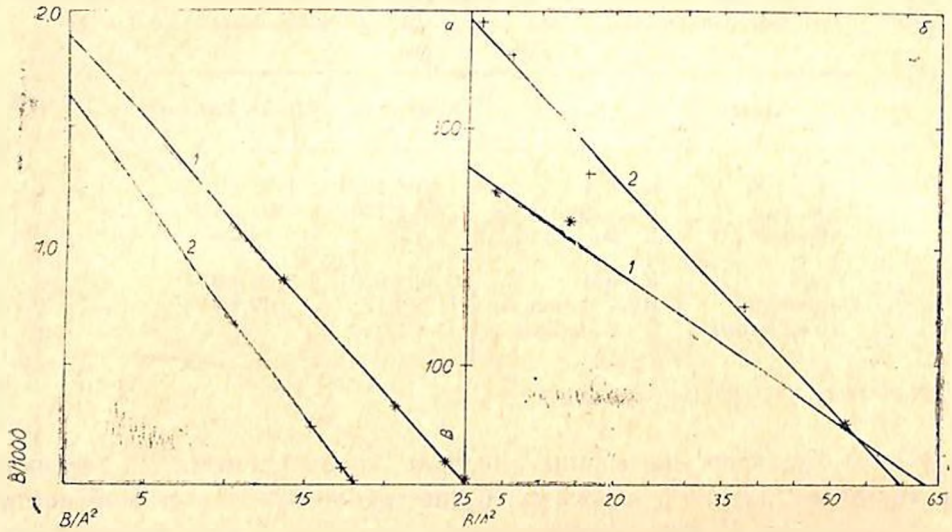


Рис. 3. Действие фосфолипазы A_2 на специфическое связывание [^{3}H]дигидроалпренолола синаптосомами головного мозга взрослых (*а*) и 15-дневных (*б*) крыс (координаты Хофсти-Скетчарда)

Обсуждение результатов

По количественным характеристикам места связывания специфических лигандов синаптосомами коры мозга взрослых и 15-дневных крыс достоверно отличаются. При этом концентрация мест связывания [^{3}H] дигидроалпренолола у взрослых крыс больше в 7 раз, а [^{3}H] хинуклидинила в 1,5 раза. Величина K_d больше в 8 и 2 раза соответственно. Общий интегральный показатель связывания лигандов—эффективность (E) у взрослых и молодых крыс отличается меньше. Эффективность связывания [^{3}H] дигидроалпренолола у 15-дневных крыс выше в 1,2 раза, а [^{3}H] хинуклидинила в 1,4 раза.

Приведенные данные показывают, что по использованным характеристикам места связывания специфических адрено- и холиноблокаторов у взрослых и молодых крыс достоверно различаются по своим функциональным свойствам, что позволяет говорить о возрастной динамике функциональных свойств мембран нервных клеток.

По характеру действия на способность синаптосом связывать радиолиганды фосфолипаза A_2 напоминает бесконкурентные ингиби-

торы [9]. Из данных табл. 1 и 2 видно, что достоверно под влиянием фосфолипазы A_2 снижается концентрация мест связывания лигандов. Однонаправленное изменение величины K_d не всегда выявляется по параметрическому критерию Стьюдента, но достоверно по непараметрической ранговой корреляции и кластерному анализу. Действие фосфолипазы A_2 на синаптосомы 15-дневных крыс вызывает менее выраженные изменения в способности связывать [^{3}H] дигидроалпренолол (табл. 2). Величина ингибиторной константы (K_i) при действии на связывание [^{3}H] хинуклидинила составляет 4,20 и 2,08 мкг/мл для 15-дневных и взрослых крыс соответственно. Ингибиторное действие фосфолипазы A_2 на связывание [^{3}H] дигидроалпренолола слабее величины K_i для взрослых крыс 5,69 мкг/мл, а на синаптосомах 15-дневных крыс получена вместо ингибирования связывания небольшая его активация (табл. 2).

Нет никаких оснований связывать эффект фосфолипазы A_2 с прямым действием на специфические адрено- и холинорецепторы мембраны мозга крыс. Более вероятным можно считать ее действие на липидный слой мембраны, что вызывает конформационные перестройки мембраны, следствием которых являются полученные изменения параметров кинетики связывания лигандов. Представленные данные хорошо согласуются с работой Кээмбрэ и соавт. [10], в которой показана способность не зменной фосфолипазы A_2 ингибировать связывание [^{3}H] хинуклидинила микросомной фракцией мозга крыс. Ранее были получены данные о нарушении фосфолипазой A_2 физиологических адренергической и холинергической реакций [3, 4]. На связь этого эффекта с действием фосфолипазы A_2 на фосфолипиды мембраны прямо или косвенно указывает ряд данных литературы. Считается, что фосфолипидный бислой в значительной степени определяет функциональное состояние мембраны нервных клеток [11], а фосфолипиды участвуют в трансмембранной передаче медиаторного воздействия [12]. Фосфолипаза A_2 снижает микровязкость мембран синаптосом мозга крысы и вызывает деполяризацию мембран [13]. Продукт гидролиза фосфолипидов лизолецитин обладает холинолитическими свойствами [14]. От состава, текучести и окисляемости липидов мембраны мозга зависит чувствительность ЦНС крыс к раздражающим факторам [15].

Результаты проведенных экспериментов и анализ литературных данных показывает, что специфическая активность адрено- и холинорецепторов и мест связывания их блокаторов в значительной степени определяется функциональным состоянием цитоплазматической мембраны, в которой они расположены. Функциональные перестройки мембраны в процессе развития животных или вызванные мембраноактивной фосфолипазой A_2 приводят к сдвигам в специфической активности адрено- и холинорецепторов и, как следствие, к изменению в адренергической и холинергической медиаторных реакциях.

THE EFFECT OF PHOSPHOLIPASE A_2 ON m-CHOLINO- AND BETA-ADRENOBLOCKER BINDING BY RAT BRAIN SYNAPTOSOMES

MANUKHIN B. N., KICHIKULOVA T. P., MOSKOVKIN G. N.

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

Significant differences between brain synaptosomes of 15-day old and adult rats were detected in B_{max} and K_d for the binding of [^{3}H] quinuclidynyl benzylate and [^{3}H] dihydroalprenolol, specific blockers of m-cholino- and beta-adrenoreceptors.

Phospholidase A_2 (1 μg/ml), a membrane-active component of the Middle Asian cobra (*Naja Naja oxiana*) venom, reduced A_{max} and K_d for the [^{3}H] quinuclidynyl benzylate and [^{3}H] dihydroalprenolol binding by synaptosomes.

Our data suggest that functional modifications of membranes taking place during development or induced by phospholipase A_2 modulate the specific activity of adreno- and cholinoreceptors and as a result adrenergic and cholinergic responses are disturbed.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Угрюмов М. В.* Нейроэндокринная регуляция в онтогенезе, М., Наука, 1989.
2. *Jacobson M.* Developmental neurobiology, N. Y., Plenum Press, 1978.
3. *Манухин Б. Н., Кичикулова Т. П., Бердыева А. Т.* Физиол. журн. СССР, т. 73, № 9, с. 1175—1181, 1987.
4. *Кичикулова Т. П., Бердыева А. Т., Манухин Б. Н.* Физиол. журн. СССР, т. 74, № 6, с. 791—797, 1988.
5. *Глебов Р. Н., Крыжановский Г. Н.* Функциональная биохимия синапсов, М., Медицина, 1978.
6. *Московкин Г. Н., Кичикулова Т. П., Манухин Б. Н.* Нейрохимия, т. 8, № 3, с. 346—351, 1989.
7. *Hajos F.* Brain Res., v. 93, № 2, p. 485—489, 1975.
8. *Манухин Б. Н.* Физиология адренорецепторов (под ред. Т. М. Турпаева), М., Наука, 1968.
9. *Диксон М., Уэбб Э.* Ферменты (под ред. В. К. Антонова, А. Е. Браунштейна). М., Мир, 1982.
10. *Кээмбрэ Т. А., Лангел Ю. Л., Ринкен А. А., Тяхепылд Л. Я., Ярв Я. Л.* Действие протеаз и фосфолипазы A_2 на мембраносвязанный холинорецептор мозга крыс, Нейрохимия, т. 3, № 2, с. 107—115, 1984.
11. *Крепс Е. М.* Липиды биологических мембран, Л., Наука, 1981.
12. *Hirata F., Axelrod J.* Phospholipid Methylation and Signal Transmission. Science, v. 209, № 4461, p. 1082—1090, 1980.
13. *Брусованик В. И., Ерин А. Н., Селищева А. А., Горбунов Н. В., Тюрин В. А., Прилипко Л. Л., Каган В. Е.* Нейрохимия, т. 5, № 1, с. 3—10, 1986.
14. *Звездина И. Д., Проказова Н. В., Вавер В. А., Турпаев Т. М.* Физиол. журн. СССР, т. 56, № 11, с. 1600—1605, 1970.
15. *Чернявская Л. И., Архипова Г. В., Бурлакова Е. Б.* Нейрохимия, 1989, 8, № 2, с. 249—258, 1989.

Поступила 12. IX. 1990

НЕЙРОХИМИЯ
т. 9, № 4, 1990

УДК 539.193:577.153

КОНФОРМАЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АММОНИЕВЫХ И СУЛЬФОНИЕВЫХ СУБСТРАТОВ С АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗОЙ НЕРВНОЙ ТКАНИ

РОЗЕНГАРТ Е. В., ШЕСТАКОВА Н. Н.

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

Методом молекулярной механики проведен теоретический конформационный анализ с расчетом всех устойчивых конформаций 9 субстратов АХЭ, аналогов АХ и ацетилгомохолина (АГХ) с различной структурой онневой группировки. На основании анализа конформационно-функциональных отношений в группе триалкиламмониевых соединений в отличие от ранее изученных триметиламмониевых аналогов АХ [1] показано, что потенциально продуктивными для гидролиза под действием АХЭ могут быть не только *транс-транс* конформеры по фрагменту молекулы C(O)—O—C—C—N. Впервые осуществлен расчет всех устойчивых конформеров сульфониевых аналогов АХ и АГХ. На основании квантовохимических расчетов методом ППДП/2 сделано заключение, что различия в распределении электронных плотностей на атомах и молекулах АХ и его диметил- и метилэтилсульфониевых аналогов незначительны. Предложена модель взаимодействия онневой группировки субстрата с анионным центром АХЭ, позволившая объяснить различия в скоростях гидролиза аммониевых и сульфониевых субстратов.

АХЭ нервной ткани играет ключевую роль в процессе функционирования нервно-мышечного синапса, осуществляя гидролиз медиатора АХ, а также является мишенью действия фосфорорганических соединений и холинергически активных веществ. В этой связи исследование структуры активного центра АХЭ содержит целый ряд информационных аспектов. Во-первых, это биоорганический аспект—изучение механизма каталитического действия фермента. Во-вторых, сравнительно-энзимологический аспект—сопоставление свойств родственных ферментов у разных животных с учетом внутривидовых и межвидовых различий. В-третьих, нейрохимический аспект—сравнение структуры узнающих участков АХЭ и рецепторных компонентов синапса. В-четвертых, прикладной аспект—использование сведений об особенностях строения каталитической поверхности АХЭ различного происхождения для конструирования специфических ингибиторов, потенциальных избирательных пестицидов и холинергических активных лекарственных препаратов. Наиболее доступным и информативным методом для подобных исследований является сопоставление струк-

туры субстратов и ингибиторов АХЭ с их эффективностью [2]. Шлифовка этого метода шла по пути усовершенствования количественной меры эффективности как за счет повышения чувствительности и точности определения параметров ферментативной реакции, так и с помощью кинетических изысканий в способах определения индивидуальных констант этого процесса. Описание же структуры эффекторов за прошедшие десятилетия продолжало оставаться чисто визуальным. Даже в недавней работе [3] размеры алкильного радикала в молекуле фосфорорганического ингибитора оцениваются числом метиленовых групп. Наиболее эффективным методом исследования пространственной структуры низкомолекулярных конформационно гибких соединений (а этой характеристике соответствуют все холинэстеразные эффекторы) является теоретический конформационный анализ в атом-атомном приближении (метод молекулярной механики) [1, 4—7]. Этот метод позволяет продемонстрировать множественность во взаимном расположении структурных элементов эффектора, дает возможность оценивать вероятность существования молекулы в той или иной конформации («заселенность») и делает осуществимым переход к реальному определению расстояний между функциональными группами эффектора.

Весьма плодотворным оказалось применение метода теоретического конформационного анализа структурно-функциональных отношений в приложении к субстратам АХЭ. На основе расчета устойчивых конформаций 23 триметиламмониевых производных АХ с разной структурой этиленового «мостика» между ацильной и катионной частями молекулы сделан вывод, что при гидролизе под действием АХЭ продуктивной является полностью вытянутая конформация АХ [1, 8—10].

В настоящей работе мы обратились к субстратам АХЭ с различной структурой катионной группировки—триалкиламмониевым и диалкилсульфониевым производным АХ, а также к ацетилгомохолину (АГХ) и его метилэтилсульфониевому аналогу. Представляло интерес оценить влияние структуры онниевой группировки на выбор продуктивной конформации субстрата при гидролизе под действием АХЭ.

Методы расчетов

Теоретический конформационный анализ осуществлялся методом молекулярной механики по универсальной конформационной программе [11]. Устойчивые конформации отыскивались путем минимизации энергии с варьированием значений торсионных и валентных углов при постоянных длинах связей. Конформационная энергия представлялась как сумма невалентных, электростатических и торсионных взаимодействий, энергии деформации валентных углов. Длины связей приняты такие, как в работе Шестаковой и соавт. [1]. Параметры потенциальных функций взяты из работы Momany и соавт. [12]. Распределение электронных плотностей рассчитывали ме-

тодом ППДП/2 [13]. Для оценки вероятности нахождения молекулы в каждой устойчивой конформации рассчитывали их заселенности (P, %), как в работе [1].

При описании конформаций торсионных углов были приняты стандартные обозначения: символы *t*, *g* и g^- означают соответственно *транс-*, *гош*$^+$- и *гош*$^-$-конформации.

Взаимное расположение ацильной и катионной группировок для соединений с двумя метиленовыми группами—соединения (I)—(VII) определяется конформациями торсионных углов фрагментов C—C(O)—C—C^3, C(O)—O—C^3—C^2 и O—C^3—C^2—X, где X=$\overset{+}{N}$ или $\overset{+}{S}$, а для соединений с тремя метиленовыми группами—соединения (VIII) и (IX)—конформациями фрагментов C—C(O)—O—C^1, C(O)—O—C^1—C^3, O—C^1—C^3—C^2 и C^1—C^3—C^2—X. Расчеты, проведенные методом молекулярной механики, показали, что для всех исследованных структур энергетически более выгодным, а следовательно и более вероятным, является транс-расположение фрагмента C—C(O)—O—C. Поскольку энергия с цис-расположением этого фрагмента более чем на 3 ккал/моль выше, вкладом таких конформеров можно пренебречь. На этом основании при описании конформации структур данного ряда подразумевается, что фрагмент C—C(O)—O—C находится в транс-положении. Для обозначения конформации молекулы использовали последовательность символов, первый из которых отражает геометрию фрагмента C(O)—O—C^3—C, а последующие—конформации следующих фрагментов по направлению от ацильной части к ониевой группировке. В расчетах учитывали также конформационную подвижность катионных группировок. Для сравнения в таблицах приведены суммарные заселенности конформаций ацетоксиметиленовых фрагментов структур. В качестве характеристики скорости гидролиза субстратов использовались литературные данные о величинах активности каталитического центра a_c [14] или бимолекулярной константы K_{II}, представляющей собой отношение активности каталитического центра к константе Михаэлиса [15, 16].

Результаты и обсуждение

Ранее было показано, что молекула АХ имеет 7 устойчивых практически равновероятных конформаций: *gg*, *gt*, *tg*, *tt*, *tg*$^-$, *g*$^-$*t*, *g*$^-$*g*$^-$, причем продуктивной для гидролиза под действием АХЭ является *tt* [1]. Для триметиламмониевых производных АХ продуктивными являются конформации, совместимые с *tt*$^-$-конформацией АХ по взаимному расположению ацильной и катионной групп, а значит и расстояния между карбонильным углеродом и азотом (L_1, А) и между карбонильным кислородом и азотом (L_2, А) у них соответственно равны. Конформационный анализ аммониевых субстратов с различной структурой ониевой группировки (табл. 1, соединения (I)—(V)), показал, что для данной группы соединений имеет место некоторая дифферен-

цнация энергии, а следовательно и перераспределение по сравнению с АХ (соединение (I)) заселенности устойчивых конформаций по ацетоксиэтильному фрагменту. Однако минимумы энергии имеют почти такие же координаты, как у АХ, то есть устойчивыми остались те же 7 конформаций, с соответствующими значениями L_1 и L_2. Значения сигма-зарядов на атоме N, рассчитанные по методу индукцион-

Таблица 1

Кинетические параметры гидролиза под действием АХЭ a_c (%), заселенность устойчивых конформеров относительно ацетоксиэтильного фрагмента триалкиламмониевых субстратов $CH_3-C(O)-O-CH_2-CH_2-R$ и коэффициенты корреляции между заселенностью каждой устойчивой конформацией и $(a_c)_{отн}$

№	$-\overset{+}{R}$	a_c, %	$\tau_{C^2C^3}$								
			gg	gt	gg^-	tg	tt	tg^-	g^-g	g^-t	g^-g^-
I	$-\overset{+}{N}(CH_3)_3$	100	17,8	11,4	0,2	13,5	11,3	13,5	0,2	11,4	17,8
II	$-\overset{+}{N}(CH_3)_2C_2H_5$	103	18,9	12,4	0,8	12,4	11,7	12,3	0,8	12,5	18,0
III	$-\overset{+}{N}(CH_3)_2CH_3$	87	18,3	13,4	0,6	12,6	11,9	12,2	0,6	13,4	18,3
IV	$-\overset{+}{N}(C_2H_5)_3$	64	18,4	14,0	0,3	11,7	10,5	11,7	0,4	14,0	18,6
V	$-\overset{+}{N}(CH_3)_2[H\,CH_3]$	84	17,5	13,7	0,6	12,2	12,2	12,3	0,6	13,7	17,4
	коэффициент корреляции		0,1	0,8	0,3	0,75	0,64	0,70	0,2	−0,8	−0,5

ных параметров, свидетельствуют, что распределение электронных плотностей на атомах азота у представленных соединений практически не изменяются и равны 0,1 е. Вращение вокруг связи C^2-N у этих соединений не встречает особых затруднений, конформации с *t*-, *g*- и *g*⁻-расположением фрагмента C^3-C^2-N-C практически равновероятны. Без особенностей происходит вращение вокруг простых связей у алкильных радикалов в ониевой группировке. Однако при подсчете коэффициентов корреляции между кинетическим параметром a_c и заселенностью каждой из устойчивых конформаций оказалось, что в этом ряду субстратов не наблюдается приоритета *tt*⁻-конформации, как это имело место для триметиламмониевых аналогов АХ [1]. Более того, коэффициенты корреляции для tg^- и tg-конформаций несколько выше, чем для *tt*⁻-конформации (табл. 1). Заметим, что три метильных заместителя у АХ равномерно экранируют центральный атом азота катионной группировки. «Толщина» такой оболочки порядка 2 Å (линейный размер метильной группы). Как видно из таблицы 1, увеличение «толщины» оболочки вокруг N (соединения (II)—(V)) приводит к понижению скорости гидролиза под действием АХЭ.

А что будет при уменьшении «толщины» оболочки? Это можно рассмотреть на примере третичного АХ, диметиламиноэтилацетата.

Было показано [18], что его конформационные возможности по ацетоксиэтильному фрагменту такие же, как и у АХ. Однако при физиологических pH это соединение протонировано, в связи с чем образуется внутримолекулярная водородная связь—C=O...H—$\overset{+}{N}$, смещающая конформационное равновесие в сторону свернутых форм, не способных к гидролизу. По всей видимости, именно наличие этих форм в популяции устойчивых конформеров определяет уменьшение скорости гидролиза диметиламиноэтилацетата. Таким образом, исследование третичного АХ не дает ответа на поставленный вопрос.

Таблица 2

Кинетический параметр гидролиза под действием АХЭ ($lg\ K_{II}$) и энергия (ккал/моль) конформаций относительно ацетоксиэтильных фрагментов для производных $CH_3C(O)OCH_2CH_2$—R

№	—R	lgK_{II}	Энергия, ккал/моль								
			$\tau_1\tau_2$								
			gg	gt	gg^-	tg	tt	tg^-	g^-g	g^-t	g^-g^-
I	$-\overset{+}{N}(CH_3)_3$	7,7	1,2	0,7	3,4	0,8	0,0	0,8	3,4	0,7	1,2
VI	$-\overset{+}{S}(CH_3)_2$	7,3	0,9	1,0	1,2	0,5	0,3	0,0	2,4	0,9	0,7
VII	$-\overset{+}{S}(CH_3)C_2H_5$	7,0	1,2	1,1	1,1	0,7	0,4	0,1	2,3	1,0	0,8

Тогда мы обратились к сульфониевым соединениям, поскольку протонирование 3 координационной серы маловероятно. Были проанализированы сульфониевые аналоги АХ (табл. 2, соединения (VI), и (VII)). Для того, чтобы убедиться в возможности использования сульфониевых субстратов в качестве модели, были проведены расчеты распределения электронных плотностей на атомах квантовохимическим методом ППДП/2 у соединений (I), (VI) и (VII). Как видно из рисунка, заряды на атомах в ацильной части остаются без изменений, что указывает на одинаковую прочность сложноэфирной связи. Следует отметить, что помимо различия величин зарядов на онниевых атомах наблюдается утрата симметрии как в самой конфигурации катионной группировки, так и в распределении на ней электронной плотности. Если в случае АХ (рис., *а*) катионная группировка представляет собой сферу с равномерно распределенным зарядом, то в случае сульфониевых соединений (рис., *б* и *в*) это диполь эллипсоидной формы.

Проведенный конформационный анализ соединений (VI) и (VII) не выявил существенных отличий в конформационных возможностях ацетоксиэтильных фрагментов по сравнению с АХ (табл. 2). Расстояния между функционально значимыми атомами ацильной части и центра онниевого атома (L_1 и L_2) в случае сульфониевых соединений возрастает только на 0,2 А. Однако скорости гидролиза сульфониевых субстратов (соединения (VI) и (VII)) составляют 48 и 25% от скорости гидролиза АХ. Попытка объяснить это снижение только из-

менением эффективного объема катионной группировки [15] несостоятельна, поскольку объем метилэтилсульфониевой группы практически равен объему триметиламмониевой группы.

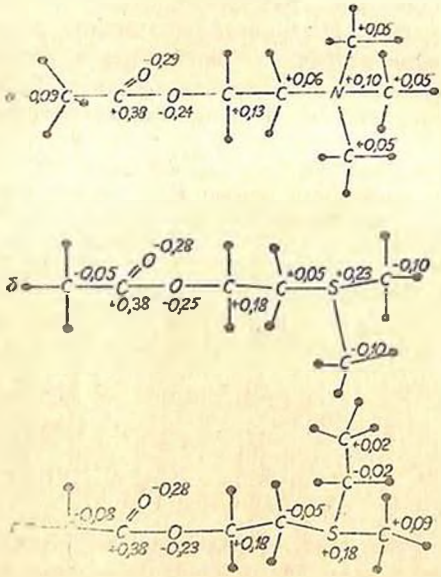


Рис. Распределение зарядов на атомах, рассчитанное методом ППДП/2 для tt-конформаций по ацетоксиэтильному фрагменту молекул субстратов АХЭ: *а*—АХ (соединение (I)); *б*—соединение (VI); *в*—соединение (VII)

Таким образом, эффект от уменьшения «толщины» оболочки вокруг онниевого атома на примере сульфониевых субстратов также сопровождается снижением скорости гидролиза под действием АХЭ. Поскольку расстояние между эстеразным и анионным центрами соответствует полностью вытянутой конформации АХ, можно предположить, что в случае сульфониевых соединений карбонильная группа не «дотягивается» и в силу этого не попадает в зону атаки гидроксила серина эстеразного центра АХЭ. В связи с этим было интересно проанализировать конформационные аспекты взаимодействия с АХЭ «удлиненного» соединения, у которого ацетоксиэтильный фрагмент заменен на ацетоксипропильный $CH_3C(O)OCH_2CH_2CH_2S(CH_3)C_2H_5$ (соединение (IX)), а также его триметиламмониевый аналог АГХ, $CH_3C(O)OCH_2CH_2CH_2N(CH_3)_3$ (соединение (VIII)). Такая пара представляет интерес тем, что скорость ферментативного гидролиза сульфониевого соединения ($\lg K_{II}=5{,}5$) оказалась выше, чем у аммониевого аналога ($\lg K_{II}=5{,}1$) [16]. Был проведен конформационный анализ обоих соединений, результаты расчетов приведены в табл. 3 и 4. Как видно из таблиц, конформационные возможности ацетоксипро-

нильного фрагмента у этой пары соединений различаются: некоторые энергетически неустойчивые для АГХ (соединения (VIII)) конформации являются устойчивыми для его сульфониевого аналога (соединение (IX)). Конформационная подвижность сульфониевой головки сохраняется: все возможные комбинации t^--, g^-- и g^--конформаций фрагментов $C^3-C^2-\overset{+}{S}-C$ и $C^2-S-C-C$ практически равновероятны. Ранее было показано [1], что продуктивными у АГХ (соединение (VIII)) являются ggt^- и $g^-g^-t^-$-конформеры как совместимые с tt^--конформацией АХ по расположению карбонильного углерода, карбонильного кислорода и $\overset{+}{N}$. Их суммарная заселенность составляет 18% от общего числа устойчивых конформеров. Как показали расчеты, у сульфониевого соединения (IX) подобная совместимость с tt^--конформацией АХ наблюдается для 20% устойчивых конформеров, причем не только для ggt^-- и $g^-g^-t^-$-конформаций, но и для ggg^-, gg^-t^-, tgg^-, tg^-g^-, g^-gt^-- и $g^-g^-g^-$-конформеров, которые для АГХ (соединение (VIII)) являются неустойчивыми. Несколько большая суммарная заселенность конформаций, совместимых с tt-конформацией АХ в какой-то мере может объяснить более высокую скорость гидролиза соединения (IX) по сравнению с АГХ. Однако, как уже отмечалось выше, следует учитывать конформационные возможности катионных групп и особенности их взаимодействия с анионным центром АХЭ. У соединения (IX) имеются конформеры ttg и ttg^-, у которых расстояния L_1 и L_2 равны 5,4 и 5,7 А соответственно. Заселенность этих конформеров составляет 8,1%. Если S у этих конформеров обращен к анионному центру неэкранированной стороной, то смещение $\overset{+}{S}$ в полости анионного участка позволит карбонильному углероду попасть в зону атаки гидроксила серина эстеразного центра. Заселенность

Таблица 3

Энергия (E, ккал/моль) и расстояния между функционально значимыми атомами карбонильным углеродом и азотом (L_1, А) и между карбонильным углеродом и азотом (L_2, А) для гомо-соединения

(VIII) $CH_3C(O)OCH_2CH_2CH_2N(CH_3)_3$

τ_1	Параметр	$\tau_2\tau_3$								
		gg	gt	gg^-	tg	tt	tg^-	g^-g	g^-t	g^-g^-
g	E	4,9	0,5	6,1	5,3	0,6	5,4	6,0	1,4	5,3
	L_1	4,6	5,0	4,5	5,4	5,7	5,6	4,2	4,7	4,5
	L_2	5,2	5,3	5,1	5,1	5,[illegible]	5,5	4,[illegible]	4,6	4,1
t	E	4,3	0,1	5,5	4,6	0,0	4,7	5,4	0,1	4,4
	L_1	4,8	5,7	4,7	5,8	6,3	5,8	4,7	5,7	4,8
	L_2	5,1	6,5	5,5	5,8	6,7	5,9	5,4	6,5	5,4
g^-	E	5,3	1,4	6,0	5,3	0,6	5,[illegible]	6,0	0,5	5,0
	L_1	4,5	4,7	4,2	5,6	5,7	5,4	4,5	5,0	4,6
	L_2	4,1	4,6	4,4	5,5	5,4	5,1	5,1	5,3	5,2

таких конформеров составляет 2,5%. Таким образом, суммарная доля продуктивных конформеров соединения (IX) существенно выше, чем у его триметиламмониевого аналога (VIII), что коррелирует с параметрами их ферментативного гидролиза (величины lg K_{II}, соответственно, 5,5 и 5,1).

Таблица 4

Энергия (E, ккал/моль) и расстояния между функционально значимыми атомами карбонильным углеродом и серой (L_1, Å) и между карбонильным углеродом и серой (L_2, Å) для гомо-соединения

(IX) $CH_3C(O)OCH_2CH_2CH_2\overset{+}{S}(CH_3)C_2H_5$

τ_1	Параметр	$\tau_2\tau_3$								
		gg	gt	gg^-	tg	tt	tg^-	g^-g	g^-t	g^-g^-
g	E	1,3	1,4	3,6	1,1	1,5	3,8	1,7	2,3	5,6
	L_1	4,9	5,2	3,2	4,9	5,7	5,6	3,0	5,0	4,6
	L_2	5,5	5,4	3,8	4,4	5,4	5,7	3,4	4,9	4,1
t	E	0,7	0,9	3,1	0,7	0,[illegible]	3,2	0,0	0,9	2,9
	L_1	4,7	6,0	4,0	5,4	6,4	5,5	3,9	5,9	4,9
	L_2	5,1	6,7	5,0	5,4	6,8	5,6	4,9	4,7	5,4
g^-	E	1,7	2,2	6,2	1,4	0,5	3,7	0,4	1,5	3,4
	L_1	3,6	5,0	4,4	5,6	5,7	5,0	3,5	5,1	4,9
	L_2	3,0	4,9	4,8	5,7	5,5	4,5	4,2	5,3	5,4

Сорбцию субстрата в активном центре АХЭ можно представить в виде следующей гипотетической модели. Молекула АХ в продуктивной tt^--конформации располагается в активном центре таким образом, что $\overset{+}{N}$ находится на расстоянии метильной группы от анионного пункта. Замена метильной группы на другие алкилы приводит к «утолщению» оболочки вокруг онниевого атома и так меняет габариты tt-конформера, что если аммониевая группа обращена к анионному центру «утолщенной» стороной, то карбонильный углерод смещается за зону действия гидроксила серина эстеразного центра и такая сорбция становится непродуктивной. В случае сульфониевых субстратов, где алкильное окружение $\overset{+}{S}$ несимметрично, возможен подход $\overset{+}{S}$ к анионному центру неэкранированной стороной, что так же приводит к непродуктивной сорбции, но уже за счет того, что карбонильный углерод не «дотягивается» до эстеразного центра. Это может быть частично компенсировано за счет конформаций с большим значением расстояний L_1 и L_2 у ацетоксипропильного соединения (IX). В рамках этой модели получает объяснение тот факт, что переход от этиленового к пропиленовому «мостику» у сульфониевых соединений (соединения (VII) и (IX)) сопровождался снижением величины K_{II} на 1,5 порядка, а в случае АХ и АГХ (соединения (I) и (VIII)), где невозможна компенсация за счет уменьшения «толщины» оболочки, это снижение составило 2,5 порядка.

Так, исследования конформационно-функциональных отношений для субстратов АХЭ, различающихся природой и структурой катионной группировки, дали новые представления о взаимодействии онниевых эффекторов с активным центром АХЭ нервной ткани.

CONFORMATIONAL ASPECTS OF INTERACTION BETWEEN AMMONIUM AND SULFONIUM SUBSTRATES AND NERVE TISSUE ACETYLCHOLINE ESTERASE

ROZENGART E. V., SHESTAKOVA N. N.

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

We have used molecular mechanics for theoretical conformational analysis including calculation of all stable conformations of nine substrates of acetylcholine esterase (AChE), acetylcholine analogs and acetylhomocholine with different structure of the onium group. On the basis of this analysis we demonstrate that not only trans-trans conformers in C(O)-O-C-C-N fragment of the molecule can be potentially productive in hydrolysis. This is different from the case of trimethylammonium ACh analogs studied previously. For the first time we have performed calculations of all stable conformers of ACh and acetylhomocholine sulfonium analogs. Quantum chemical calculations allowed the conclusion that there are only small differences in the distribution of electron densities on atoms of the ACh molecule and molecules of its dimethyl- and methylethyl sulfonium analogs. A model for the interaction of the onium group of the substrate with the anionic site of AChE has been proposed. This model allows to explain differences in hydrolysis rates of ammonium and sulfonium substrates.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Шестакова Н. Н., Розенгарт Е. В., Хованских А. Е., Жоров Б. С., Говырин В. А.* Биоорган. химия, т. 15, № 3, с. 335—344, 1989.
2. *Садыков А. С., Розенгарт Е. В., Абдувахабов А. А., Асланов Х. А.* Холинэстеразы. Активный центр и механизм действия, Ташкент, Фан, 1976.
3. *Абдувахабов А. А., Григорьева Г. М., Тилябаев З.* Нейрохимия, т. 7, № 4, с. 592—596, 1988.
4. *Дашевский В. Г.* Конформации органических молекул, М., Химия, 1982.
5. *Жоров Б. С., Розенгарт Е. В., Говырин В. А., Бровцына Н. Б., Хромов-Борисов Н. В.* Молекуляр. биол., т. 9, № 6, с. 820—827, 198[illegible]
6. *Жоров Б. С., Розенгарт Е. В., Говырин В. А., Бровцына Н. Б., Хромово-Борисов Н. В.* Докл. АН СССР, т. 231, № 1, с. 215—218, 1976.
7. *Розенгарт Е. В., Жоров Б. С.* Журн. эволюц. биохимии и физиологии, т. 25, № 2, с. 189—194, 1989.
8. *Шестакова Н. Н., Розенгарт Е. В., Жоров Б. С.* — В сб.: Химия физиологически активных веществ, с. 92—94, Нальчик, 1988.

9. *Шестакова Н. Н., Розенгарт Е. В., Хованских А. Е., Жоров Б. С., Говырин В. А.*—В сб.: Химия и применение элементорганических соединений, с. 53—61. Л., 1988.

10. *Zhorov B. S., Rozengart E. V., Shestakova N. N.*—In: III-d Intern. meeting on cholinesterases, p. 1-6. Le Grande Motte, France, 1990.

11. *Жоров Б. С.* Автометрия, № 1, с. 23—25, 1975.

12. *Momany F. A., Carruthers L. M., McGuire R. F., Sheraga H. A.* J. Phys. Chem. v. 78, № 16 p. 1595-1602, 1974.

13. *Маслов В. Г.* Журн. струк. химии, т. 18, № 2, с. 414—415, 1977.

14. *Бресткин А. П., Розенгарт Е. В., Абдувахабов А. А., Садыков А. А.* Успехи химии, т. LII, вып. 10, с. 1624—1647, 1983.

15. *Cohen S. G., Elkind J. L., Chishti S. B., Giner J.—L. P., Reese H., Cohen J. B.* J. Med. Chem. № 27, p. 1613—1617, 1984.

16. *Яра Я. Л., Кесватера Т. А., Лавиксаар А. А.* Реакционная способность органических соединений, т. XIII, вып. 4(48), с. 509—514, 1976.

17. *Жоров Б. С., Розенгарт Е. В., Говырин В. А., Касымов А. К., Абдувахабов А. А., Касымов Ш. К., Асланов Х. А., Садыков А. С.* Докл. АН СССР, т. 228, № 6, с. 1460—1463, 1976.

Поступила 29. V. 1990

НЕЙРОХИМИЯ
т. 9, № 4, 1990

УДК 577.157

ВЗАИМОСВЯЗЬ АКТИВНОСТИ γ-ГЛУТАМИЛТРАНСФЕРАЗЫ И ТРАНСПОРТНОЙ СИСТЕМЫ ВОЗБУЖДАЮЩИХ НЕЙРОМЕДИАТОРНЫХ АМИНОКИСЛОТ

ТУРШЯН Г. А., АКОПЯН Г. Е., САФРАЗЯН С. С., АПРИКЯН Г. В.

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

Серин в присутствии бората ингибирует активность γ-глутамилтрансферазы и захват возбуждающих нейромедиаторных аминокислот—глутаминовой и аспарагиновой. С другой стороны, конкурентный ингибитор захвата глутаминовой и аспарагиновой кислот—N-ацетил-l-аспарагиновая кислота является сильным природным ингибитором активности γ-глутамилтрансферазы. Полученные результаты указывают на возможную роль γ-глутамилтрансферазы в транспорте возбуждающих нейромедиаторных аминокислот через синаптическую мембрану.

γ-Глутамилтрансферазе КФ 2.3.2.2. (5-глутамил) пептид: аминокислота 5-глутамилтрансфераза (ГГТФ) придается определенная роль в транспорте аминокислот, пептидов и аминов через клеточные мембраны, хотя отсутствуют прямые доказательства [1]. Имеются только сведения о том, что в культуре клеток глии и нейронов мозга куриных эмбрионов существует взаимосвязь между захватом глутаминовой кислоты и активностью этого фермента [2]. Из литературных данных видно, что наибольшая активность ГГТФ сосредоточена в почечной ткани и поджелудочной железе [3]. Примечательно, что выраженная активность фермента обнаружена в лактирующей молочной железе [4]. Наши исследования показали, что ГГТФ активность головного мозга сосредоточена главным образом в синаптосомной фракции, что может указывать на ее отношение к синаптической передаче [6].

Настоящая работа посвящена выяснению возможной роли ГГТФ в захвате нейромедиаторных аминокислот синаптосомами головного мозга белых крыс. По имеющимся литературным данным серин в присутствии бората оказывает сильное ингибирующее действие на активность ГГТФ [3, 7]. Представляло интерес изучение сдвигов в степени захвата медиаторных аминокислот в аналогичных условиях. В связи с ранее установленным в нашей лаборатории фактом ингибирования захвата нейромедиаторных аминокислот клеточными популяциями и синаптосомами головного мозга N-ацетил-l-аспарагиновой кислотой (NAA) [8] было изучено её действие на активность ГГТФ.

Материалы и методы

В качестве экспериментальных животных использовали белых крыс линии *Wistar*, содержащихся на обычном пищевом рационе вивария. Синаптосомы из головного мозга выделяли по методу Hajos [9]. Конечный осадок синаптосом суспендировали в следующей среде поглощения: 0,32 М сахароза на 0,1 М трис-HCl буфере, pH 7,4, NaCl—127, KCl—5, $CaCl_2$—2,7, $MgSO_4$—1,3, глюкоза—11,1 мМ. Активность ГГТФ определяли по методу Meister и соавт. [7].

Захват нейромедиаторных аминокислот — глутаминовой (ГК) и аспарагиновой кислот (АК) изучали в атмосфере воздуха при 37° в течение 20 мин. Пробы содержали 0,9 мл среды поглощения, 0,1 мл синаптосомной суспензии, содержащей 100 мкг белка, 0,05 мкКи/мл соответствующих меченных [^{14}C] аминокислот и 10^{-6} М аминоуксусную кислоту (АУК) для подавления трансаминирования. Серин и борат добавляли в конечной концентрации 5 мМ, а N-ацетиласпартат (NAA) — 10^{-3} и $3 \cdot 10^{-3}$ М. Реакцию останавливали добавлением 1 мл холодной среды поглощения. Синаптосомы осаждали центрифугированием при 1300g в течение 15 мин при 4°. Осадок промывали дважды 3 мл инкубационной смеси, осаждали как указано выше и растворяли в 0,7 мл 98%-ного диметилсульфоксида. Радиоактивность измеряли, используя сцинтилляционную жидкость Брея, на жидкостном сцинтилляционном счетчике «Intertechnique-4221» (Франция). Степень захвата аминокислот выражали в распад/мин/мг белка. Белок определяли по методу Lowry и соавт. [10]. В опытах использовали [^{14}C] АК (140 мКи/ммоль), [^{14}C] ГК (200 мКи/ммоль) «Chemipro» ЧССР, NAA (98,82%) АУК („Sigma", США).

Результаты и обсуждение

Данные табл. 1 показывают, что активность ГГТФ в синаптосомах головного мозга белых крыс составляет 2,12 ± 0,077 нМ п-нитроанилина/мин·мг белка. Добавление серина в концентрации 5 мМ не

Таблица 1

Действие серина и бората на γ-глутамилтрансферазную активность (нмоль п-нитроанилина/мин/мг белка) в синаптосомной фракции белых крыс

Контроль	2,12±0,08 (6)
Серин 5 мМ	2,23±0,134 (6) $p > 0,5$
Борат 5 мМ	3,35±0,141 (6) $p < 0,001$
Серин + борат	0 (6)

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3 в скобках указано количество опытов.

оказывает заметного влияния на активность фермента. При добавлении бората в той же концентрации не только не ингибируется ферментативная активность, но и заметно активируется. Указанное повышение активности ГГТФ можно объяснить увеличением ионов Na при добавлении бората [7]. Совместное добавление серина и бората в тех же концентрациях приводит к 100%-ному ингибированию активности фермента. Полученные нами данные в отношении действия ука-

Таблица 2

Действие серина и бората на поглощение [^{14}C] ГК и [^{14}C] АК (распад/мин/мг белка) синаптосомами мозга белых крыс

Условия эксперимента	ГК	% ингибирования	АК	% ингибирования
Контроль	179354,0±6777,33 (12)		102059,8±8792,58 (7)	
Серин 5 мМ	89802,91±3487,91 (6) $p<0,001$	49,93	424 7,42±5 97,.6 (7) $p<0,001$	58,5
Борат 5 мМ	1503·0,6±5869,42 (9) $p\leq0,01$	16,8	91533,63±12063,63 (7) $p<0,2$	10,4
Серин + борат 5 мМ	9125 ,54±5053,07 (9) $p<0,001$	49,7	45545,03±685 ,01 (7) $p<0,001$	55,5

занных соединений в синаптосомах голового мозга согласуются с данными литературы, указывающими, что серин сам по себе не оказывает заметного влияния на активность фермента из почек крыс, тогда как в присутствии бората ингибирует ее активность в весьма высокой степени. Авторы считают, что для действия серина, ингибитора ГГТФ, обязательно присутствие бората. Так, в среде трис-HCl и веронала серин не действует на активность ГГТФ [3]. В дальнейшем в наших экспериментах мы исходили из того, что если фермент имеет отношение к транспорту аминокислот, то ингибиторы фермента окажут аналогичное действие на высокоаффинный захват нейромедиаторных аминокислот.

Таблица 3

γ-Глутамилтрансферазная активность в (нмоль п-нитроанилина/мин/мг белка) синаптосомной фракции мозга белых крыс в присутствии N-ацетиласпартата

Условия эксперимента	Активность фермента	% ингибирования
Контроль	1,755±0,164 (6)	
N-ацетиласпартат 10^{-3} М	0,47 ±0,015 (6) $p<0,001$	72,95
N-ацетиласпартат $3\cdot10^{-4}$М	0,244±0,073 (6) $p<0,001$	86,05

Результаты исследований, приведенные в табл. 2, показывают, что добавление серина в конечной концентрации 5 мМ в весьма высокой степени ингибирует захват ГК (на 49,93%) и АК (на 58,5%).

Хотя борат также оказывает ингибирующее действие на захват ГК (на 16,8%) и АК (на 10,4%), это действие по сравнению с серином незначительно. При одновременном добавлении к инкубационной среде серина и бората в тех же концентрациях захват ГК и АК ингибируется в той же степени, как в присутствии серина. Таким образом, серин оказывает сильное ингибирующее действие на захват ГК и АК как в отсутствие, так и в присутствии бората, а на активность ГГТФ— только в присутствии бората. Для выяснения этого вопроса необходимы дополнительные исследования.

Как было отмечено выше, нейроспецифическое соединение головного мозга NAA, количество которой составляет 100—200 мг% является ингибитором захвата ГК и АК синаптосомами головного мозга [8]. В связи с полученными нами результатами о возможной взаимосвязи активности ГГТФ и высокоаффинного захвата возбуждающих нейромедиаторных аминокислот представляло интерес изучение влияния NAA на активность указанного фермента в синаптосомах головного мозга.

Как видно из данных табл. 3, NAA в концентрации 10^{-3} и $3 \cdot 10^{-3}$ М ингибирует активность ГГТФ соответственно на 72,95 и 83,05%.

Исследования, проведенные нами по изучению ГГТФ в субклеточных фракциях мозга, показали наличие значительной активности фермента в синаптосомной фракции. Последующие исследования в отношении изучения активности фермента в онтогенезе показали, что в мозгу она достаточно повышается со дня рождения животного и достигает максимума в зрелом возрасте [5]. Наличие значительной активности ГГТФ в синаптосомной фракции головного мозга подтверждает гипотезу Meister и соавт. о транспортной функции γ-глутамильного цикла [7].

Таким образом, нами обнаружен новый ингибитор ГГТФ в головном мозгу—NAA, который является нейроспецифическим соединением. Полученные данные указывают, что ГГТФ имеет непосредственное отношение к транспорту возбуждающих нейромедиаторных аминокислот в синаптосомах головного мозга.

RELATIONSHIP BETWEEN γ-GLUTAMYLTRANSFERASE ACTIVITY AND THE TRANSPORTATION SYSTEM OF THE EXITATORY AMINO ACID NEUROTRANSMITTERS

TURSHIAN G. A., HAKOPIAN G. E., SAFRAZIAN S. S., APRIKIAN G. V.

Institute of Biochemistry of the Armenian Acad. Sci., Yerevan

γ-Glutamiltransferase (GGTF)-inhibitor serine borate proved to be an effective inhibitor of exitatory amino acids i. e., glutamic (GA) and aspartic (AA) acids, uptake. On the other hand, N-acetyl-L-aspartic acid

that is a competitive inhibitor of GA and AA uptake, has been find to be the effective natural inhibitor of GGTF activity. The data obtained points out the important role of GGTF in the transfer of the exitatory amino acid neurotransmitters trouh synaptic membrane.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Orlowski M., Meister A.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 67, p. 1248—1252. 1970.
2. *Hajkova B., Lisy V., Pearce B., Murphy S., Stasting F.* Proc. of the Fifth Meeting of European Society for Neurochemistry, Abstracts (ed. E. S. Vizi, K. Magyar), p. 119, 1984.
3. *Revel J. P., Ball E. G.* J. Biol. Chem., v. 234, p. 577—582, 1959.
4. *Hanes C. S., Hird F. Y. R., Tisherwood F. A.* Biochem. J., v. 51, p. 25-- 5. 1952.
5. *Туршян Г. А., Акопян Г. Е., Сафразян С. С., Априкян Г. В.* Биол. журн. Армении, т 42, № 2, с. 153—156, 1988.
6. *Туршян Г. А., Акопян Г. Е., Сафразян С. С.* Нейрохимия, т. 3, № 1, с. 47—50, 1984.
7. *Meister A., Tate S. S., Ross L. L.*—In: Enzymes of Biological Membranes (ed. A. Martonosi), p. 315--347, Plenum Press, New York, 1976.
8. *Априкян Г. В., Кнарян В. А., Шагинян В. А., Ахвердян Э. С.* Нейрохимия, т. 6, № 1, с.71—76, 1987.
9. *Hajos F.* Brain Res., v. 93, p. 485—489, 1975.
10. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. S.* J. Biol. Chem. v. 193, p. 265—275, 1951.

Поступила 17. XI. 1990

НЕЙРОХИМИЯ
т. 9, № 4, 1990

УДК 591.105/591.444+547.466

ВЛИЯНИЕ ТРИЙОДТИРОНИНА И ЙОДИРОВАННОГО МАСЛА НА ТИРЕОИДНУЮ И АМИНОКИСЛОТНУЮ ОБЕСПЕЧЕННОСТЬ ГОЛОВНОГО МОЗГА У МОРСКИХ СВИНОК

ТУРЯНИЦА И. М., ПАЩЕНКО А. Е., РОСТОКА Л. М., МАРГИТИЧ В. М., ФЕДОРОВИЧ Т. М., ГОРЗОВ И. П., БОБИК Ю. Ю., ПОБЕРЕЖНИК М. В.
Ужгородский государственный университет

Изучено влияние трийодтиронина и йодированного масла на тиреоидную и аминокислотную обеспеченность ткани головного мозга у морских свинок. Установлен ряд совпадений и отличий в направленности и выраженности их биохимических эффектов. Показано более мягкое влияние йодированного масла на тиреоидный гомеостаз, поскольку его введение обеспечивает сохранение концентрации T_3 в пределах физиологической нормы, что является оптимальной адаптивной реакцией тиреоидной системы на инъекцию препарата. Выявлено, что под влиянием йодированного масла, вероятно, в процессе белкового синтеза, происходит более выраженная утилизация свободных аминокислот тканью мозга, чем после инъекции T_3, что позволяет говорить о возможном тироксиноподобном эффекте йодированного масла на аминокислотный метаболизм ткани мозга.

Значение тиреоидных гормонов в обеспечении развития организма, особенно в его критические периоды, и функционировании ЦНС общеизвестно [1—3]. Считается установленным факт влияния тиреоидных гормонов практически на все основные звенья метаболизма [4—7]. Следует иметь в виду, что T_3 биологически более активен, чем T_4, его уровень определяет активность метаболических процессов в общесоматических тканях. Причем ключевым звеном в реализации физиологического эффекта тиреоидных гормонов на уровне клетки является взаимодействие T_3 с ядерным рецепторным комплексом [8, 9]. При этом механизмы действия гормонов щитовидной железы, роль йода, входящего в их состав, а также вопросы регуляции тиреоидного гомеостаза все еще недостаточно изучены [10], лишь отдельные публикации касаются тироксиноподобного эффекта негормонального йода [11, 12].

Целью работы явилось изучение тиреоидного гомеостаза у морских свинок в физиологических условиях после парентерального введения трийодтиронина и йодированного масла и влияния их на аминокислотную обеспеченность ткани головного мозга.

Материалы и методы

В опытах использовали 20 морских самцов свинок массой 450—500 г, которых разделили на 3 группы. Первую группу составили ин-

тактные животные, вторую группу—морские свинки, получавшие трийодтиронин в дозе 100 мкг/кг, а третью—животные, которым вводили йодированное подсолнечное масло (ИМ) в количестве 60 мкг/кг веса. Следовательно, животные второй и третьей группы получали препараты в эквимолярных по йоду количествах. Препараты вводили глубоко интраглютеально. Через 4 ч животных декапитировали, собирали кровь и извлекали мозг.

В сыворотке крови исследовали содержание тиреотропного гормона (ТТГ), тироксина (T_4), трийодтиронина (T_3), реверсивного трийодтиронина (pT_3), тироксинсвязывающую способность (ТСС) и индекс свободного тироксина ($ИСТ_4$) радиоиммунологическим методом с помощью тест-набора фирмы «Byk-Mallincrodt» (ФРГ). Подсчеты импульсов производили на сцинтилляционном колодезном счетчике типа «Гамма» (ВНР). В ткани мозга изучали распределение общего йода (ОЙ) и его фракций: связанный с белками йод (СБЙ) и неорганические йодиды (НЙ) по методу Barker и соавт. [13] в модификации Г. С. Степанова [14]. Количественное определение свободных аминокислот проводили методом одномерной нисходящей хроматографии на обессоленной бумаге FN-I (ГДР) [15]. Полученные результаты обрабатывали методом вариационной статистики по Фишеру-Стьюденту [16].

Результаты и обсуждение

Как видно из табл. 1, инъекция животным T_3 вызывает достоверное снижение уровня ТТГ в сыворотке крови, вероятно, по механизму отрицательной обратной связи. На этом фоне происходит уменьшение

Таблица 1

Тиреоидный статус сыворотки крови у морских свинок через 4 ч после введения йодсодержащих соединений (n=5)

Показатели	Контроль	Инъекция T_3	Инъекция ИМ
ТТГ (мед/л)	1.69±0.09	1.31±0.08*	1.39±0.09*
T_3 (нмоль/л)	1.42±0.05	1.91±0.05*	1.52±0.05
T_4 (нмоль/л)	81.6±2.6	69,7±2,6*	116,6±6.3*
pT_3 (нмоль/л)	0.299±0.005	0.34±0.01	0,42±0,01*
ТСС	0.92±0.01	1.36±0.01	0,98±0.03*
$ИЗТ_4$	88,20±1.53	56,3±5,2	117,5±8,4*

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3 *$p<0,05$; различия по сравнению с контролем достоверны

содержания T_4, очевидно, за счет снижения стимуляции ТТГ щитовидной железы. Важно указать, что при этом количество гормонально неактивного pT_3 возрастает. Это обстоятельство, по-видимому, является дополнительным фактором, обуславливающим уменьшение пула T_4 за счет активации его трансформации в неактивную форму гормона—pT_3. Понятно, что концентрация T_3 в условиях его дополнительного введения в циркулирующей крови высока. Следует указать

на достоверное увеличение ТСС, что создает предпосылки для связывания транспортными белками избытка тиреоидных гормонов, уменьшая тем самым биологический эффект последних. Вследствие этого также снижается $ИСТ_4$—важный показатель циркулирующего в крови свободного T_4.

Следовательно, нагрузка животных экзогенного T_3 вызывает целый ряд компенсаторных реакций в тиреоидной системе, в определенной мере нивелирующий избыточное содержание этого гормона на уровне гипоталамус-гипофиз-щитовидная железа, транспорта тиреоидных гормонов и направленности их обмена в периферических тканях-мишенях.

Большой интерес представляют исследования, связанные с раскрытием роли различных йодсодержащих соединений в формировании тиреоидного статуса организма и влияния их на разные стороны метаболизма. Так, инъекция йодированного масла приводит к достоверному снижению уровня ТТГ. Несмотря на это, содержание T_4 резко возрастает. При этом следует указать, что концентрация T_3 сохраняется в пределах физиологической нормы, а уровень $рT_3$ увеличивается. Учитывая последнее обстоятельство, можно предположить возможность усиления деградации T_4 по пути его метаболической инактивации. Обращает на себя внимание и тот факт, что ТСС при этом достоверно повышается, хотя $ИСТ_4$ все же остается высоким. Не исключено, что введение йодированного масла вызывает не только выброс транспортных белков и рост ТСС, но и интенсивное трансйодирование, что и обеспечивает высокую концентрацию свободной формы T_4 в условиях низкого выброса в кровь ТТГ. Следовательно, организм морских свинок на введение йодированного масла реагирует одинаково, как и в случае инъекции T_3, несмотря на определенные количественные различия. Вместе с тем, если учесть данные [17] о различии биохимических эффектов T_3 и T_4 и возможной катаболической направленности их в случае выраженного роста концентрации последнего [18], можно предположить более мягкое метаболическое воздействие йодированного масла в сравнении с таковым в случае дополнительного введения T_3.

Следует также указать, что парентеральное введение T_3 приводит к резкому увеличению пулов ОЙ, СБЙ, НЙ, что, очевидно, связано с интенсивной утилизацией избытка гормона тканью мозга, о чем свидетельствуют высокие уровни НЙ (табл. 2).

Важно указать, что при инъекции ИМ отмечаются сдвиги подобной направленности, однако, отличающиеся меньшей выраженностью изменений, за исключением показателей НЙ, уровень которого соизмерим с таковым у морских свинок, получавших T_3. Эти данные подтверждают наше предположение о более мягком воздействии йодированного масла на тиреоидный гомеостаз. Следует указать, что мозг не является тканью-мишенью для тиреоидных гормонов, поскольку в нем не выявлены рецепторы для последних [19]. Тем более интерес-

ным является сравнительное изучение влияния T_3 и ИМ на формирование фондов свободных аминокислот ткани мозга (табл. 3).

Таблица 2

Распределение йодистых фракций в ткани мозга под влиянием йодсодержащих препаратов (n=5)

Параметры	Контроль	Нагрузка T_3	Нагрузка ИМ
Общий йод (мкг%)	1,98±0,51	10,0±0,25*	5,33±0,37*
Связанный с белками йод (мкг%)	1,40±0,13	7,56±0,60*	2,83±0,19*
Неорганический йод (мкг%)	0,8[illegible]±0,06	2,42±0,71*	2,17±0,[illegible]5*

Введение трийодтиронина вызывает разнонаправленные сдвиги аминокислотного пула ткани мозга. Так, концентрации значительной части свободных аминокислот уменьшаются (цистеин с цистином, орнитин, лизин, аргинин, аланин, метионин, валин, лейцин с изолейцином), а меньшей—глицина, глутаминовой кислоты, тирозина, триптофана увеличиваются. Важно указать, что под влиянием йодированного масла происходит снижение уровней большинства свободных аминокислот за исключением глицина, пролина, триптофана, метионина, фенилаланина. Интересно, что при этом статистически достоверно увеличивается лишь содержание триптофана.

Таблица 3

Влияние парентерального введения йодсодержащих соединений на аминокислотную обеспеченность ткани мозга (ммоль/кг, n=5)

Аминокислоты	Контроль	Инъекция T_3	Инъекция ИМ
Цис с Цист	2,510±0,151	1,280±0,388*	0,560±0,051*
Орн	0,680±0,045	0,180±0,027*	0,200±0,026*
Лиз	0,910±0,094	0,19[illegible]±0,088*	0,200±0,016*
Гис	0,760±0,097	0,990±0,194	0,320±0,033*
Арг	1,800±0,181	0,180±0,034*	0,130±0,021*
Асп	2,240±0,232	1,690±0,241	0,790±0,071*
Сер	1,000±0,081	0,770±0,086	0,200±0,034*
Гли	0,730±0,055	2,520±0,185*	1,060±0,172
Глу	1,410±0,073	2,910±0,286*	0,870±0,035*
Тре	2,090±0,160	2,370±0,208	0,560±0,051*
Ала	4,730±0,412	2,790±0,113*	1,730±0,113*
Про	1,520±0,141	1,8[illegible]0±0,274	1,580±0,226
Тир	0,550±0,049	0,830±0,054*	0,240±0,030*
Трип	1,850±0,169	4,870±0,29[illegible]*	2,670±0,099*
Мет	1,060±0,147	0,250±0,053*	0,500±0,071
Вал	1,160±0,062	0,29[illegible]±0,026*	0,340±0,075*
Фен	0,620±0,085	0,840±0,201	0,720±0,131*
Лей с Илей	0,710±0,098	0,240±0,051	0,330±0,071*

Следовательно, можно предположить, что под влиянием йодированного масла происходит более выраженная утилизация свободных аминокислот, вероятно, в процессе белкового синтеза, в пользу чего свидетельствуют данные работ [11, 12], указывающих на то, что йод, как и гормоны щитовидной железы, независимо друг от друга стимулируют включение свободных аминокислот в процесс биосинтеза бел-

ка. При этом показано, что ICL вызывает этот эффект немедленно, без латентного периода и более выраженно, чем T_3 и T_4 [10].

Таким образом, установлены важные факты совпадения и отличия в направленности и выраженности биохимического эффекта экзогенного T_3 и ИМ на состояние тиреоидного гомеостаза организма морских свинок и фонды свободных аминокислот ткани мозга. Выявлены некоторые компенсаторные реакции, направленные на уменьшение метаболического стресса, вызываемого нагрузкой животным йодсодержащих препаратов: уменьшение уровня ТТГ в циркулирующей крови— важного фактора торможения функциональной активности щитовидной железы; компенсаторное увеличение ТСС, являющееся дополнительным обстоятельством уменьшения пула свободных форм гормонов и ,в первую очередь, обладающих биологическим эффектом; интенсификация деградации T_4 по инактивирующему метаболическому пути в pT_3. Установлено более мягкое влияние ИМ на тиреоидный гомеостаз, поскольку парентеральное введение последнего обеспечивает сохранение концентрации T_3 в пределах физиологической нормы, что является оптимальной адаптивной реакцией тиреоидной системы на инъекцию препарата.

В сравнении с T_3, ИМ вызывает более значимое уменьшение пулов большинства свободных аминокислот, в том числе и незаменимых, что, вероятно, может свидетельствовать в пользу усиления белковосинтетических процессов в исследуемой ткани. Можно сделать вывод о возможном тироксиноподобном эффекте йодированного масла на аминокислотный метаболизм ткани мозга.

THE EFFECT OF TRIIODOTHYRONINE AND IODINATED OIL ON THE THYROID AND AMINO ACID PROVIDING OF GUINEA—PIG BRAIN

TURYANITSA I. M., PASHCHENKO A. E., ROSTOKA L. M., MARGITICH V. M., FEDOROVICH T. M., GORZOV I. P., BOBIK Y. Y., POBEREJNIK M. V.

Ujgorod State University

The effect of triiodothyronine and iodinated oil on the thyroid and amino acid providing of guinea-pig brain tissue has been studied a number of coincidences and differences in the direction and expressivity of their biochemical effects has been established. The milder effect of iodinated oil on thyroid homeostasis is explained by the provision of T_3 concentration within the limits of biological norme that is the optimal adaptive reaction of thyroid system to the preparation administration. Under the influence of iodinated oil (rather due to the process of protein synthesis) the more expressed utilization of free amino acids by the brain tissue, than after T_3 injection has been revealed. It allows to say about the possible thyroxine-like effect of the iodinated oil upon the brain tissue amino acid metabolism.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Саркисов Д. С., Гельфанд Б. В., Туманов В. П.* — В кн.: Нервная система (под ред. Д. С. Саркисова), с. 343—364. М., Медицина, 1987.
2. *Алешин Б. В., Губский В. И.*—В кн.: Гипоталамус и щитовидная железа, с. 8—10. М., Медицина, 1983.
3. *Шрейбер В.* Патофизиология желез внутренней секреции, с. 185—223. Прага, Авиценнум, 1987.
4. *Туракулов Я. Х.* Вестн. АМН СССР, № 7, с. 54—61, 1980.
5. *Кучеренко Н. Е., Германюк Я. Л., Васильев А. Н.* Молекулярные механизмы гормональной регуляции обмена веществ. Киев, Вища школа, 1986.
6. *Смит Д., Фронцо Р. А.* Почечная эндокринология (под ред. М. Дж. Данна), с. 543—551; М., Медицина, 1987.
7. *Földes J. A.* Klinikai endocrinologia, Budapest: Medicina könyvkiadó, k. I, o. 213—21 , 198 .
8. *Теппермен Дж., Теппермен Х.* Физиология обмена веществ и эндокринной системы (под ред. Я. И. Ажипы), с. 274—317. М., Мир, 1989.
9. *Трапкова А. А., Верещагина Г. В.* Мед. реф. журн. Эндокринология, № 3, с. 7—10, 1990.
10. *Рачев Р. Р., Димитров М. И., Филлипова Е. Х.* Вопр. мед. химии, № 1, с. 26—36, 1979.
11. *Рачев Р. Р., Ещенко Н. Д.* Тиреоидные гормоны и субклеточные структуры. М., Медицина, 1975.
12. *Taurog A., E ans E.* Endocrinology, № 5, p. 91 . 925, 1967.
13. *Barker S. B., Humphrey M. J., Soley M. H.* J. Clin Invest., v. 30, № 4, p. 55 1 (2, 1951.
14. *Степаков Г. С.* Лаб. дело, № 10, с. 594—599, 1965.
15. *Пасхина Т. С.* Современные методы в биохимии, с. 162—180. М., Медицина, 1964.
16. *Ойвин И. А.* Патол. физиология и эксперим. медицина, № 4, с. 76—85, 1960.
17. *Серкс М., Оппенгеймер Дж.* Взаимодействие гормонов с рецепторами (под ред. Дж. Леви). М., Мир, 1979.
18. *Керимов Э. Э.* Стоматология, № 6, с. 47—51, 1989.
19. *Кэтт К. Дж., Люфо М. Л.* Эндокринология и метаболизм (под ред. Ф. Фелига, Дж. Д. Бакстера, А. Е. Бродуса, Л. А. Фромена), т. 1, с 191—193. М., Медицина, 1985.

Поступила 19. III. 1990

НЕЙРОХИМИЯ
т. 9, №4, 1990

УДК 615.01.011—615.015

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ НЕЙРОСПЕЦИФИЧЕСКОГО БЕЛОК-ГОРМОНАЛЬНОГО КОМПЛЕКСА В ОРГАНИЗМЕ КРЫСЫ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ИНФАРКТОМ МИОКАРДА

ГАБРИЕЛЯН С. К., СРАПИОНЯН Р. М., АБЕЛЯН Ж. Г., СААКЯН С. А., СААКЯН Ф. М., ГАЛОЯН А. А.

Институт биохимии АН Армении, Ереван

Методом радиоиммунологического анализа изучено распределение нейроспецифического кардиоактивного белок-гормонального комплекса (белок-нейрогормон «С»—БНС) у крыс с экспериментальным инфарктом миокарда (ИМ). Указанная сердечная патология сопровождается опустошением БНС в мозгу, в особенности в гипоталамусе и мозжечке (в 80 и 12 раз) и одновременно значительным (примерно в 6—340 раз) увеличением в ряде висцеральных органов и периферической крови. Суммированные данные свидетельствуют также об убывающей последовательности уровня БНС в висцеральных органах у крыс с ИМ: селезенка > сердце > скелетная мышца > печень > почки > поджелудочная железа > легкие. Полученные данные позволяют заключить о возникновении при ИМ нового гомеостатического уровня БНС.

Результаты многолетних исследований [1, 2] трех белок-гормональных комплексов (БГК), обнаруженных нами более 25 лет тому назад в гипоталамусе ряда млекопитающих, позволили прийти к выводу, что они являются теми биохимическими системами, которые способны осуществить химическую регуляцию метаболизма и функций не только мозга, но и ряда висцеральных органов, в особенности сердца [3]. При диссоциации этих комплексов было установлено, что они состоят из неидентифицированных в настоящее время гликопротеинов [4] и низкомолекулярных нековалентносвязанных с последними кардиоактивных гликопептидов [5], структурно родственных с кардиоактивными нейрогормонами «К», «С», «Г», ранее обнаруженными в том же регионе мозга [6]. Следует отметить, что отдиссоциированные гликопротеины в свою очередь являются предшественниками целого ряда новых биоактивных гликопептидов, в том числе и кардиоактивных [7]. Физиологическое действие этих соединений характеризуется избирательностью и высокой активностью: они расширяют периферические сосуды, стабилизируют кровяное давление, усиливают кровоток, повышают проницаемость капилляров, участвуют в процессах микроциркуляции [8], повышают ударный минутный объем и частоту сердечных сокращений [9].

Разработка соответствующих иммунохимических [10] и радиоим-

мунологических (РИ) методов [11] позволила установить нейроспецифичность указанных БГК, выявив искомые комплексы с убывающей иммунореактивностью в структурах мозга в следующей последовательности: гипоталамус, мозжечок, кора больших полушарий, продолговатый мозг. В значительно меньших количествах (на три порядка по сравнению с нервной тканью) БГК-подобные иммунореактивности были выявлены в сердечной, скелетной мышцах, селезенке, печени, сыворотке крови. Одновременно применение метода РИА создавало возможность изучения динамики распределения этих БГК при патологических состояниях, в частности деструкции сердечной мышцы.

Целью настоящего исследования явилось изучение количественного содержания в мозгу и регионального распределения одного из специфических комплексов гипоталамуса—белок-нейрогормон «С» (БНС) в норме и в условиях моделирования у крыс экспериментальной ишемии миокарда (ЭИМ).

Материалы и методы

Опыты проводили на 70 белых беспородных крысах-самцах массой 160—200 г. Экспериментальную ИМ вызывали путем перевязки нисходящей ветви левой коронарной артерии. О максимальном развитии ИМ к 4-му дню судили по регистрации ЭКГ на аппарате 6 НЕК-3 (электроды игольчатые, крыса не фиксирована). У животных регистрировали ЭКГ в 3 стандартных отведениях. Записи производили до окклюзии венечной артерии, через 5 мин после окклюзии и перед забоем животных. Уже через несколько минут после окклюзии левой коронарной артерии у крыс были заметны выраженные ишемические изменения: в стандартных отведениях на ЭКГ возникает значительный подъем сегмента ST и увеличивается зубец T. Позднее, через 3 суток после окклюзии венечной артерии на ЭКГ наблюдаются признаки развившейся ИМ: как правило, отмечается комплекс QS или глубокий зубец Q. В качестве контроля использовали интактных и ложнооперированных животных. Ложная операция состояла в торакотомии и подведении лигатуры под артерию без затягивания лигатуры.

Через 4 дня после перевязки коронарной артерии у декапитированных животных выделяли различные регионы мозга (кора больших полушарий мозга, гипоталамус, мозжечок, продолговатый мозг) и ряд висцеральных органов (сердце, легкие, печень, почки, селезенка, поджелудочная железа, скелетная мышца). Ткани гомогенизировали водой в соотношении 1 : 2 (масса : объем) и центрифугировали при 5000 об/мин. Из надосадочной жидкости белки осаждали сульфатом аммония в пределах 70—100%. Полученные осадки растворяли в веронал-мединаловом буфере (pH 8,6) и диализовали против воды в течение 48 ч. Лиофилизированные порошки тканевых экстрактов и сыворотки крови использовали в качестве антигена БНС [2]. Антисыворотку к БНС, выделенному из гипоталамуса, получали путем

иммунизации кроликов смесью этого комплекса с полным адъювантом Фрейнда по ранее разработанной схеме [10].

Радиоиммунологический анализ проводили с антисывороткой, реагирующей строго специфично с БНС. Метод основан на выявлении комплекса БНС-антитело с помощью хлорамина Т [12] против БНС, меченного ^{125}J. Йодированный БНС отделяли гель-фильтрацией через сефадекс G-25 с элюированием 0,05 М фосфатным буфером, содержащим 1%-ный БСА. Эксперименты проводили по методу Bolton, Hunter [13] с нашими модификациями [10]. Радиоактивность препаратов БНС измеряли на сцинтилляционном счетчике SL 4221 (Франция), рассчитывая величину, характеризующую зависимость между радиоактивностью и количеством связанного БНС. Полученные данные обрабатывали статистически с применением t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Оценка специфичности полученной к бычьему БНС кроличьей сыворотки, разведенной 1 : 1000, была проведена по результатам двойной иммунодиффузии в агаровом геле. По единственной выявленной дуге преципитации мы могли судить об антигенной гомогенности БНС, а по отсутствию таких дуг преципитации при использовании двух других БГК в качестве антигена—о его достаточно высокой специфичности.

В данной работе в качестве антигенного комплекса БНС, как было уже описано выше, были использованы частично очищенные и лиофильно высушенные экстракты тканей крысы, выход которых колебался от 0,1 до 0,3% от сырой массы. При перекрестном иммуноэлектрофорезе кроличья антисыворотка к бычьему БНС положительно реагировала с водорастворимыми антигенными комплексами из мозга интактных животных и крыс с ИМ, что доказывало отсутствие ее видовой специфичности. Реакция преципитации, однако, не выявилась в случае использования в качестве антигенов экстрактов тканей висцеральных органов. Учитывая этот факт, в дальнейшем мы применили более чувствительный метод выявления БНС—РИА с использованием антигена, меченного ^{125}J. Пригодность иммунной сыворотки для РИ экспериментов оценивали по ее способности конкурировать с [^{125}J] БНС за связывание с немеченым антигеном. Так, было показано, что доза немеченого БНС, ингибирующего 50% связывание [^{125}J] БНС составляет примерно 50 нг.

Как уже отмечалось, БНС преимущественно локализован в мозгу. Нейроспецифичность БНС можно установить хотя бы по тому факту, что его содержание в нервной ткани (табл. 1) на три порядка превышает содержание в других тканях (табл. 2). Однако в самом мозгу БНС распределен неравномерно. Наивысшее его содержание отмечается в гипоталамусе, почти вдвое оно меньше в мозжечке, существенно уменьшается количество БНС в коре больших полушарий и про-

долговатом мозгу. Сопоставление определяемых концентраций ИР-БНС в висцеральных органах свидетельствовало об органной специфичности этого биополимера. В убывающей последовательности содержание БНС выявляется в сердце, скелетной мышце, селезенке, печени. В остальных исследуемых тканях (легкие, почки, поджелудочная железа) нам не удалось обнаружить ИР—БНС. В крови определяемое

Таблица 1

Содержание БНС в мозгу у крыс (M±m, n=4)

Регионы мозга	Уровень БНС на 1 г сырой ткани	
	интактные крысы	крысы с ЭИМ*
Кора больших полушарий	110,0±5,0	57,0±1,7
Гипоталамус	150,0±30,0	71,00±2,05
Мозжечок	840±15,0	69,0±4,2
Продолговатый мозг	50±2,0	73,0±6,9

Примечание. *$p<0,001$ по сравнению с контролем.

Таблица 2

Количество БНС в различных висцеральных органах (M±m, n=8)

Органы	Уровень БНС на 1 г сырой ткани	
	интактные крысы	крысы с ЭИМ*
Сердце	0,42±0,09	79,0±8,2
Легкие	0	63,0±4,2
Почки	0	77,0±3,4
Печень	0,08±0,01	65,0±5,6
Селезенка	0,23±0,08	79,0±4,7
Поджелудочная железа	0	75,0±6,2
Скелетная мышца	0,41±0,07	69,0±5,7

Примечание. *$p<0,001$ по сравнению с контролем

количество ИР—БНС оказалось равным 10 нг/мл крови, что позволило допустить возможность выброса этого комплекса в общую циркуляцию аналогично нейрофизиновым комплексам [14] при различных условиях, стимулирующих выход кардиотропного нейрогормона «С» [6]. Дальнейший целенаправленный транспорт БНС к органам-мишеням, в частности к сердцу, свидетельствует о его участии в регуляции соответствующих метаболических процессов. В связи с этим было целесообразно изучить распределение БНС при различных сердечных патологиях, в особенности при ИМ.

Как показали результаты исследований в модельных экспериментах у крыс на 4-е сутки после перевязки нисходящей ветви левой коронарной артерии в гипоталамусе и мозжечке происходит резкое уменьшение БНС (табл. 1)—примерно в 20 и 12 раз соответственно.

Слабее уменьшается содержание БНС в коре больших полушарий мозга—в 2 раза. В продолговатом мозгу, наоборот, наблюдается некоторое увеличение содержания БНС. ИМ не только ускоряет высвобождение БНС из мозга, приводя к увеличению его содержания в крови, но и значительно повышает его содержание в ряде органов и тканей. Из висцеральных органов максимальный уровень БНС отмечается в селезенке, примерно в 340 раз превосходящий исходный (табл. 2). Значительное и примерно одинаковое (в 160 и 170 раз) повышение содержания БНС выявляется также в сердце и скелетной мышцах, а также в печени, легких, почках и поджелудочной железе. Данные, приведенные в табл. 2, позволяют заключить об убывающей последовательности уровня иммунореактивного БНС в висцеральных органах у крыс с ИМ: селезенка > сердце > скелетная мышца > печень > почки > поджелудочная железа > легкие. Резкое увеличение содержания БНС в селезенке и сердце у крыс с ИМ по сравнению с таковыми у интактных животных и одновременно опустошение в мозгу предполагает, по-видимому, возникновение при этой патологии нового гомеостатического уровня этого нейроспецифического белок-гормонального комплекса. На основании этих данных можно судить о его реальном участии в метаболических процессах в этих органах при ИМ, направленном в частности, на повышение периферического тканевого, в особенности, миокардиального кровотока. Несомненно, факт увеличения содержания БНС в сыворотке крови, сердце и ряде висцеральных органов недостаточно информативен для установления его влияния при ИМ. Однако, учитывая резкое увеличение БНС в сердце, можно, по-видимому, считать его маркером повреждения миокарда. Кроме того, нельзя не учесть высокую биологическую активность БНС, а именно: эффективное коронарорасширяющее действие, значительное улучшение кровоснабжения сердца в условиях ИМ и, следовательно, увеличение доставки кислорода к сердцу, регуляция обменных процессов в этом органе, и наконец, непосредственное влияние на изолированные клетки сердечной мышцы. Приведенные факты позволяют предположить, что БНС стабилизируют и приостанавливает некротические процессы в миокарде.

DETERMINATION OF THE CONTENT OF NEUROSPECIFIC PROTEIN-HORMONAL COMPLEX IN ORGANISM OF RATS WITH THE EXPERIMENTAL MYOCARDIAL INFARCTION

GABRIELIAN S. K., SRAPIONIAN R. M., ABELIAN Zh. G., SAHAKIAN S. A., SAHAKIAN F. M., GALOYAN A. A.

Institute of Biochemistry, Armenian Academy of Sciences, Yerevan

By means of radioimmunoassay method the distribution of neurospecific cardioactive protein-hormonal complex (protein-neurohormone "C"—PNC) in rats with experimental myocardial infarction (MI) has

been studied. The cardiac pathology mentioned is accompanied by devastation of PNC in brain, especially in hypothalamus and cerebellum (80 and 12-folf, correspondingly) and by its simultaneous (c. 6—340 fold) increase in a number of visceral organs and in peripheral blood. The data summarized is indicative of decreasing sequence of PNC levels in visceral organs of rats with MI: spleen >heart>skeletal muscle>liver> kidney>pancreas >lungs. The data obtained permit to suggest the uppearance of new homeostatic level of PNC at MI.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Галоян А. А., Срапионян Р. М.* Докл. АН АрмССР, т. 42, № 4, с. 210—213, 1966.
2. *Срапионян Р. М., Саакян С. А., Галоян А. А.* Вопр. биохимии мозга, (под ред. Бунятяна Г. Х.), Ереван, Изд-во АН АрмССР, т. 11, с. 97—104, 1976.
3. *Galoyan A. A., Srapionian R. M.* Neurochem. Res., v. 8, № 12, p. 1511—1535, 1983.
4. *Срапионян Р. М.* Нейрохимия, т. 6, № 1, с. 109—116, 1987.
5. *Галоян А. А., Срапионян Р. М., Медведев Ф. А.* Докл. АН АрмССР, т. 66, № 5, с. 302—306, 1978.
6. *Галоян А. А.* Вопр. биохимии мозга, Ереван, Изд-во АН АрмССР; т. 13, с. 89—98, 1978.
7. *Срапионян Р. М., Саакян С. А., Медведев Ф. А., Галоян А. А.* Докл. АН АрмССР, т. 70, №3, с. 182—186, 1980.
8. *Ростомян М. А., Абрамян С. С., Галоян А. А.* Кровообращение, т. 4, с. 3—8, 1977.
9. *Halle W., Srapionian R. M., Oehme P., Galoyan A. B.* Acta Biol. Med Germ. v. 35, p. 265—267, 1976.
10. *Срапионян Р. М., Абелян Ж. Г., Галоян А. А.* Вопр. биохимии мозга, Ереван, Изд-во АН АрмССР, № 2, с. 20—24, 1985.
11. *Срапионян Р. М., Абелян Ж. Г., Галоян А. А.* Укр. биох. журн., т. 61, № 3, с. 53—58, 1989.
12. *Greenwood F. G., Hunter W. M., Glower J. S.* Biochem. J., v. 89, p. 114, 1963.
13. *Bolton A. E., Hunter W. M.* Biochem. J, v. 133, p. 529, 1973.
14. *Lang R. E., Huttle W.* Acta endocrinology, v. 94, suppl. № 34, p. 56—57, 1980.

Поступила 26 XII. 1990

НЕЙРОХИМИЯ
т. 9, № 4, 1990

УДК 577.112:547.963

РЕГУЛЯЦИЯ СОКРАЩЕНИЯ ГЛАДКОЙ МУСКУЛАТУРЫ ПЕПТИДНЫМИ ФАКТОРАМИ ГИПОТАЛАМУСА

ЗАКАРЯН Т. Р., БАРХУДАРЯН Н. А., ШУВАЛОВА Л. А., ОСТРОВСКАЯ М. В., ШАРОВА Н. П., ГАЛОЯН А. А.

Институт биохимии АН Армении, Ереван

Исследовано воздействие коронаросуживающих пептидных факторов гипоталамуса на активность киназы легких цепей миозина (КЛЦМ), выделенной из гладкой мускулатуры желудка кур и кальмодулинчувствительной ФДЭ сАМР, выделенной из гипоталамуса быка. Обнаружено, что пептидные факторы гипоталамуса вызывают Ca^{2+}-независимую активацию этих ферментов в присутствии кальмодулина. Высказывается предположение, что и в условиях *in vivo* пептидные факторы гипоталамуса могут принимать участие в Ca^{2+}-независимой регуляции активности КЛЦМ и ФДЭ сАМР, обеспечивая при этом сокращение гладкой мускулатуры, путем Ca^{2+}-независимого связывания с кальмодулином, являясь, по-существу эндогенными заменителями Ca^{2+}.

За последние годы в нашей лаборатории накоплен большой фактический материал, подтверждающий предложенную ранее Галояном А. А. концепцию о существовании в мозгу Ca^{2+}-независимой пептидной системы регуляции активности Ca^{2+}-кальмодулинзависимых ферментов [1—2]. Галояном и сотруд. установлено, что в гипоталамусе крупного рогатого скота образуются 2 группы пептидных факторов, вызывающих Ca^{2+}-независимую активацию Ca^{2+}-кальмодулинзависимых ферментов: одна из них стимулирует Ca^{2+}-независимую активацию кальмодулинчувствительной ФДЭ сАМР в 6—10 раз в отсутствие Ca^{2+} и кальмодулина [3], а другая, к которой относятся выделенные нами ранее 5 коронаросуживающих пептидных факторов [4], вызывает Ca^{2+}-независимую активацию КЛЦМ скелетной мышцы кролика—Ca^{2+}-кальмодулинчувствительного фермента, ответственного за фосфорилирование легких цепей миозина [5]. Однако необходимо отметить, что стимулирующее действие этой группы пептидных факторов гипоталамуса ($ПФ_{1-5}$) на активность КЛЦМ имеет место только при наличии в инкубационной среде кальмодулина [5]. Методом ферментзависимого иммуносорбентного анализа (ELISA) было обнаружено, что $ПФ_{1-5}$ ингибируют образование иммунокомплекса кальмодулин-антитело путем Ca^{2+}-независимого связывания с кальмодулином [6—8]. Ранее нами было показано, что $ПФ_{1-5}$ оказывают стимулирующее воздействие (на 20—25%) на сократительную функцию

изолированной аорты кролика в K^+-деполяризующем растворе, содержащем 40 мМ KCl [5, 9]. Как известно, в гладкой мускулатуре КЛЦМ играет ключевую роль в запуске мышечного сокращения [10], поэтому представлялось целесообразным изучить воздействие $ПФ_{1-5}$ на активность КЛЦМ, выделенной из гладкой мускулатуры, а также изучить воздействие ПФ на активность кальмодулинчувствительной ФДЭ cAMP, учитывая, что факторы изменяющие активность КЛЦМ, оказывают обычно аналогичное [11] воздействие на активность ФДЭ cAMP; кроме того, изучение влияния вышеуказанных пептидных факторов гипоталамуса на активность ФДЭ cAMP дало бы возможность для сравнения механизма регуляторного действия этих пептидов с механизмом действия С-модулинов на один и тот же фермент.

Целью данной работы было исследование воздействия коронаросуживающих пептидных факторов гипоталамуса на активность КЛЦМ из гладкой мускулатуры желудка кур и на активность кальмодулинчувствительной ФДЭ cAMP из гипоталамуса быка.

Материалы и методы

Коронаросуживающие пептидные факторы гипоталамуса выделяли по методу Галояна и соавт. [4].

Высокоочищенные препараты КЛЦМ получали по методу Dabrowska и соавт. [12—13] из желудка кур. Фосфорилирование легких цепей (ЛЦ) миозина гладкой мускулатуры желудка кур с M_r 20 кД проводили в течение 25 мин при 25° в инкубационной среде, содержащей 70 мкг очищенного миозина, 20 мМ фосфатного буфера, pH 8,0, 12,5 мМ $MgCl_2$, 0,1 мМ $CaCl_2$, 10 мМ ATP, 1,5 мМ КЛЦМ и 4,5 мМ кальмодулина. Включение фосфата в ЛЦ миозина регистрировали при электрофорезе в ПААГ в присутствии 8 М мочевины по методу Perrie и соавт. [14]. Относительное содержание фосфорилированных ЛЦ в миозине определяли при анализе денситограмм гелей электрофореза, окрашенных Кумасси R-250.

Количество белка определяли по методу Lowry и соавт. [15].

Выделение ФДЭ cAMP проводили по методу Бобрускина и соавт. [16]. Для определения влияния ПФ на активность фермента в инкубационную смесь, объемом 100 мкл, содержащую 25 мМ трис-HCl буфер, pH 7,0, 1 мМ $MgCl_2$, 3 мкМ cAMP, [^{3}H] cAMP (0,1 мкКи) и достаточное количество фермента добавляли от 0,025 до 0,05 мкг ПФ.

В работе использованы следующие реактивы: ATP („Sigma", США), $MgCl_2$, $CaCl_2$, ацетонитрил („Merck", ФРГ), ЭГТА, Кумасси R-250, акриламид, бисакриламид, ТЕМЕД, персульфат аммония, Дауэкс 50W×8, Амберлит CG—400, 100—200 меш („Serva", ФРГ), сефадекс G-10, фенил-сефароза, сефакрил S-200 („Pharmacia", Швеция), TSK ДЭАЭ 650 М („Toyo Soda", Япония), остальные реактивы марок х. ч. и ос. ч. („Союзхимреактив", СССР).

Результаты и обсуждение

При исследовании влияния $ПФ_{1-3}$ на активность КЛЦМ, выделенной из гладкой мускулатуры желудка кур, было выявлено, что при добавлении их в инкубационную среду в концентрации 0,05 М в отсутствие Ca^{2+} (при наличии в инкубационной среде 1 мМ ЭГТА) происходит активация фермента от 100 до 200% соответственно, по сравнению с контролем, не содержащем 1 мМ ЭГТА и ПФ (таблица). Стимулирующее действие $ПФ_{1-3}$ на активность высокоочищенного препарата КЛЦМ имело место только при наличии в инкубационной среде кальмодулина.

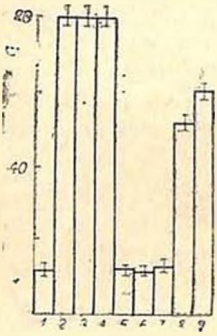


Рис. Влияние пептидных факторов ($ПФ_3$ и $ПФ_4$) гипоталамуса на активность Ca^{2+}-кальмодулинзависимой ФДЭ cAMP. По оси абсцисс: *1*—0,1 мМ $CaCl_2$+3 мкМ ФДЭ cAMP (контроль 1); *2*—0,1 мМ $CaCl_2$+3 мкМ ФДЭ cAMP+4,5 мкМ кальмодулина (K_2—контроль 2); *3*—K_2+0,05 мкМ $ПФ_3$; *4*—K_2+0,05 мкМ $ПФ_4$; *5*—K_1+0,05 мкМ $ПФ_3$; *6*—K_1+0,05 мкМ $ПФ_4$; *7*—1 мМ ЭГТА+3 мкМ ФДЭ cAMP+4,5 мкМ кальмодулина (K_3—контроль 3); *8*—K_3+0,05 мкМ $ПФ_3$; *9*—K_3+0,05 мкМ $ПФ_4$. По оси ординат — активность ФДЭ cAMP (нмоль гидролизованного cAMP/мин)

Эти данные аналогичны результатам, полученным нами ранее при изучении воздействия $ПФ_{1-3}$ на активность КЛЦМ, выделенной из скелетной мышцы кролика, с той лишь разницей, что степень активации КЛЦМ, выделенной из гладкой мускулатуры под воздействием $ПФ_{1-3}$ значительно выше [5]. Эти результаты коррелируют также с полученными нами ранее данными о стимулирующем воздействии $ПФ_{1-3}$ на сократительную функцию изолированной аорты кролика [5, 9]. Данные, полученные с помощью метода ELISA о связывании ПФ с кальмодулином (как в присутствии Ca^{2+}, так и в его отсутствие) позволили заключить, что коронаросуживающие пептидные факторы гипоталамуса осуществляют свое воздействие на активность КЛЦМ, выделенной как из гладкой, так и из скелетной мускулатуры путем связывания с молекулой кальмодулина и образования комплекса кальмодулин-пептидный фактор, который, связываясь с каталитической субъединицей фермента, вызывает его активацию. Учитывая тот факт, что в гладкой мускулатуре КЛЦМ ответственна за запуск мышечного сокращения [10], можно сказать, что получены новые доказательства регуляторного воздействия коронаросуживающих ПФ гипоталамуса на сократительную функцию гладкой мускулатуры.

При изучении действия $ПФ_3$ и $ПФ_4$ на активность Ca^{2+}-кальмодулинзависимой ФДЭ cAMP было обнаружено, что ПФ в отсутствие Ca^{2+} стимулирует активность фермента приблизительно в 4 раза по сравнению с контролем, не содержащем пептидных факторов. Необходимо отметить,

что в присутствии Ca^{2+} мы не наблюдали активирующего эффекта ПФ (рисунок), а в отсутствие Ca^{2+} активирующий эффект пептидов имел место только в присутствии в инкубационной среде кальмодулина. Очевидно, что как и в случае КЛЦМ, Ca^{2+}-независимое воздействие пептидных факторов на ФДЭ cAMP осуществляется путем их связывания с молекулой кальмодулина. ПФ, по-видимому, являют-

Таблица 1

Активирование киназы легких цепей миозина (КЛЦМ), выделенной из гладкой мускулатуры желудка кур под воздействием коронаросуживающих пептидных факторов гипоталамуса (ПФ)

Соединения	Относительная активность %
Ca^{2+}	0
Ca^{2+} + кальмодулин	100
Ca^{2+} + ПФ $_{1, 2, 4, 5}$	0
ЭГТА + кальмодулин	0
ЭГТА + кальмодулин + $ПФ_1$	100
ЭГТА + кальмодулин + $ПФ_2$	110
ЭГТА + кальмодулин + $ПФ_3$	150
ЭГТА + кальмодулин + $ПФ_4$	180
ЭГТА + кальмодулин + $ПФ_5$	200

Примечание. Исследуемые соединения использовали в следующих концентрациях кальмодулин—4,5 мкМ, $CaCl_2$—0,1 мМ, ЭГТА—1 мМ; КЛЦМ гладкой мышцы—1,5 мкМ; ПФ $_{1-5}$—0,05 мкМ. За 100%-ную активность фермента принимали такое количество КЛЦМ, которое вызывало в течение 25 мин при 25° фосфорилирование легких цепей миозина на 50%.

ся аллостерическими регуляторами кальмодулина; их связывание с кальмодулином, в зависимости от концентрации ПФ, вероятно, может приводить структуру кальмодулина в различные активные конформационные состояния. К такому выводу мы пришли при исследовании методом ELISA влияния различных концентраций ПФ на образование иммунокомплекса кальмодулин-антитело в присутствии и в отсутствие Ca^{2+}, а также при изучении совместного эффекта ПФ и известного антагониста кальмодулина трифторперазина на образование иммунокомплекса [6].

Сравнение механизма действия ПФ и С-модулинов [3] выявило существенную разницу в механизме активирующего воздействия на Ca^{2+}-кальмодулинчувствительную ФДЭ cAMP. В то время как ПФ осуществляют свое воздействие путем связывания с молекулой кальмодулина и образования активного комплекса кальмодулин-пептидный фактор, являясь, по-видимому, эндогенными заменителями Ca^{2+}, С-модулины, обладая высоким сродством к ФДЭ cAMP [3], активируют фермент как в отсутствие Ca^{2+}, так и кальмодулина.

Помимо этих двух групп пептидных факторов, образующихся в гипоталамусе крупного рогатого скота, в настоящее время известен и ряд других факторов, вызывающих Ca^{2+}-независимую активацию ФДЭ cAMP и других чувствительных к кальмодулину систем [17—19].

Таким образом, на основании полученных данных можно заключить, что коронаросуживающие пептидные факторы гипоталамуса можно причислить к числу Ca^{2+}-независимых регуляторов в клетке, которые, по-видимому, и в условиях *in vivo* могут принимать участие в регуляции активности КЛЦМ, ФДЭ cAMP и, возможно, других Ca^{2+}-кальмодулинзависимых систем (при низком внутриклеточном уровне содержания Ca^{2+}) путем Ca^{2+}-независимого связывания с кальмодулином, обеспечивая при этом и регуляцию сокращения гладкой мускулатуры, являясь, вероятно, эндогенными заменителями Ca^{2+}.

В недавно проведенных исследованиях (Галоян А. А., Бархударян Н. А., Лотшпайх Ф., 1990 г., неопубликованные данные) по выяснению первичной структуры гипоталамических коронаросуживающих пептидных факторов было обнаружено, что 3 из них являются фрагментами 33—37 (Val-Val-Tyr-Pro-Trp), 33—38 (Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr) и 32—38 (Leu- Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr) β-цепи бычьего гемоглобина.

REGULATION OF SMOOTH MUSCLE CONSTRICTION BY HYPOTHALAMIC PEPTIDE FACTORS

ZAKHARYAN T. R., BARKHOUDARYAN M. A., SHUVALOVA L. A., OSTROVSKAYA M. V., SHAROVA N. P., GALOYAN A. A.

Institute of Biochemistry, Armenian Academy of Sciences, Yerevan

The effect of hypothalamic coronaroconstrictory peptide factors on the activity of myosin light chain kinase (MLCK) isolated from chicken stomach smooth muscle and on that of calmoduline-sensitive cAMP PDE isolated from bovine hypothalamus has been investigated. The Ca^{2+}-independent activation of these enzymes by hypothalamic peptide factors in presence of calmodulin has been obtained. It was suggested that hypothalamic peptide factors are also able to participate in vivo in Ca^{2+}-independent regulation of MLCK and cAMP PDE providing in this case the smooth muscle constriction by means of Ca^{2+}-independent binding with calmodulin. In principle it points out that these compounds are endogenous substitutors of Ca^{2+}.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Галоян А. А., Гурвиц Б. Я.* Нейрохимия, т. 5, № 4, с. 420—422, 1986.
2. *Галоян А. А.* Нейрохимия, т. 6, № 1, с. 3—9, 1987.
3. *Галоян А. А., Бобрускин И. Д., Гурвиц Б. Я., Абрамян Г. Э.* Нейрохимия, т. 8, № 1, с. 78—86, 1989.
4. *Галоян А. А., Бархударян Н. А., Валко К., Закарян Т. Р.* Нейрохимия, т. 7, № 4, с. 519—524, 1988.
5. *Бархударян Н. А., Закарян Т. Р., Шувалова Л. А., Чаилян С. Г., Алексанян А. Р., Галоян А. А.* Нейрохимия, т. 8, № 4, с. 485—491, 1989.
6. *Бархударян Н. А., Хорват Л., Галоян А. А., Овади Ю.* Нейрохимия, т. 9, № 2, с. 188—195, 1990.

7. *Horvath L., Barkhudaryan N., Galoyan A., Ovadi J.* 20th Meeting FEBS, Budapest, Hungary, p. 27, 1990.
8. *Horvath L., Barkhudaryan N., Galoyan A., Ovadi J.* FEBS Lett., v. 276, № 1, 2, p. 197–200, 1990.
9. *Barkhudaryan N., Zakaryan T., Aleksanyan A., Sharova N., Shuralova L., Chailyan S., Galoyan A.* 8th ESN Meeting, Leipzig, DDR, p. 21, № 4, 1990.
10. *Marston S. B.* Prog. Biophys. Molec. Biol. v. 41, p. 1–41, 1982.
11. *Hidaka H., Asano M., Tanaka T.* Mol. Pharmacol., v. 20, p. 571–578, 1981.
12. *Dabrowska R., Aromatorio D., Sherry J. H. F., Hartshorne D.* J. Biochem. Biophys. Res., Commun., v. 78, p. 1263–1272, 1977.
13. *Dabrowska R., Sherry J. M. F., Aromatorio D., Hartshorne D. J.* Biochemistry, v. 17, p. 253–258, 1978.
14. *Perrie W. T., Perry S. V.* Biochem. J., v. 119, № 1, p. 31–38, 1970.
15. *Lowry O. H., Rosebrough H. J., Farr L. A., Rannda!l R. I.* J. Biol. Chem v. 193, p. 265–275, 1971.
16. *Бобрускин И. Д., Шайхин С. М., Муратова М. В., Баранова Л. А., Северин Е. С.* Биохимия, т. 52, вып. 8, с. 1344–1352, 1987
17. *Wolff D. J., Brostrom C. O.* Atch. Biochem. and Biophys., v. 173, p. 720–731, 1976.
18. *Дудкин С. М., Алахов В. Ю., Северин С. Е., Швец В. И.* Докл. АН СССР, т. 276, № 6, с. 1510–1513, 1984.
19. *Branford White C. J., Parker G., Dawson J. M., Fraser A.* Biochem. Soc., Transl., v. 9, p. 417–418, 1981.

Поступила 2. IX. 1990

НЕЙРОХИМИЯ
т. 9, № 4, 1990

УДК 616.008.939+633.2.02

Ca^{2+}-НЕЗАВИСИМАЯ РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ КАЛЬМОДУЛИНЗАВИСИМОЙ ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ ИЗ МОЗГА БЫКА С-МОДУЛИНАМИ

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

Институт биохимии им. Г. Х. Бунятяна АН Армении, Ереван
*МГУ им. М. В. Ломоносова

Показано, что С-модулины являются Ca^{2+}-независимыми аллостерическими регуляторами активируемой кальмодулином ФДЭ мозга быка. Установлено, что взаимодействие С-модулинов с ферментом происходит по центрам, отличным от каталитического и кальмодулинсвязывающего. Взаимодействие С-модулинов с ФДЭ характеризуется кажущейся K_d комплекса порядка 10^{-9} М и приводит к увеличению максимальной скорости гидролиза сАМР в $\sim$ 10 раз. При этом образование комплекса (ФДЭ·С-модулин) не влияет на сродство субстрата к ферменту. Показано, что действие С-модулинов и кальмодулина на активность ФДЭ носит аддитивный характер, причем в их присутствии не изменяется константа активации фермента, но заметно возрастает максимальная скорость гидролиза сАМР. Установлено также, что стимуляция активности ФДЭ при совместном действии С-модулинов и кальмодулина значительно подавляется в присутствии антагониста кальмодулина— трифторперазина. Полученные в настоящей работе результаты позволяют предположить о существовании на поверхности ФДЭ С-модулинсвязывающего участка, отличающегося от каталитического и кальмодулинсвязывающего центров фермента.

ФДЭ циклических нуклеотидов—ключевой фермент метаболизма клетки, регулирующий уровень вторичного мессенджера сАМР [1]. В мозгу этот фермент представлен несколькими формами, одна из которых, Ca^{2+}-кальмодулинзависимая (КМ-зависимая), является наиболее изученной [2—5]. Характерной особенностью КМ-зависимой ФДЭ является наличие специфического аллостерического центра, взаимодействующего с КМ в присутствии Ca^{2+}. Образование комплекса (Ca^{2+}·КМ·ФДЭ) приводит к значительному увеличению скорости гидролиза циклических нуклеотидов [6, 7]. Предполагается, что регуляция активности ФДЭ под действием КМ *in vivo* находится в прямой зависимости от внутриклеточного уровня Ca^{2+} [8]. В этой связи особый интерес представляют КМ-подобные, но Ca^{2+}-независимые регуляторные системы, способные при определенных условиях, в особенности при лимитированном уровне содержания Ca^{2+}, компенсировать многие функции, осуществляемые КМ.

В настоящее время известен ряд факторов, вызывающий Ca^{2+}-независимую активацию ФДЭ. К их числу относятся жирные кислоты и

фосфолипиды [9], бактериомодулин [10], ограниченный протеолиз [11], сульфгидрильные реагенты [12], некоторые простагландины [13] и многие другие соединения.

Принципиально важным было открытие Галояном и соавт. новых Ca^{2+}-независимых активаторов ФДЭ, обнаруженных в составе кардиотропного нейрогормона «С» [14]. Активаторы были названы С-модулинами ввиду их высокой биологической активности, коррелирующей с модуляцией активности ФДЭ. Было высказано предположение, что С-модулины в совокупности с другими органотропными факторами в составе препарата нейрогормона «С», образуют высокоэффективный комплекс, индуцирующий активность нейрогормона «С» [15].

Известно, что нейрогормон «С» является универсальным регулятором многих внутриклеточных процессов [15], уровня циклических нуклеотидов и Ca^{2+} [16—18], захвата и высвобождения нейромедиаторов из синаптических окончаний [19], регуляции гликолиза [20, 21]. Кроме того, установлено влияние нейрогормона «С» на сердечную деятельность и коронарное кровообращение [22].

Возможное участие С-модулинов в этих и других процессах делает их объектом всесторонних исследований. Известно, что эти активаторы являются низкомолекулярными соединениями, по-видимому, пептидной природы [14], способными Ca^{2+}-независимым путем стимулировать активность ФДЭ. Однако изучение механизмов регуляции активности фермента под действием С-модулинов остается на сегодняшний день актуальной задачей.

В настоящей работе предпринята попытка подхода к обсуждаемой проблеме. Проверена возможность существования комплекса ФДЭ с С-модулинами и исследованы изменения физико-химических параметров фермента при его образовании как в присутствии, так и в отсутствие КМ.

Материалы и методы

В работе были использованы следующие препараты: cAMP, ЭГТА („Calbiochem", США), [^{3}H]cAMP („Amercham", Англия), трис, NaN_3 („Serwa", ФРГ), трифторуксусная кислота, ацетонитрил („Fluka", Швейцария), β-меркаптоэтанол („Merk", ФРГ), анионообменная смола Dowex 1×2, 50—100 меш („Serva", ФРГ), хромато графические сорбенты фенил-сефароза („Pharmacia", Швеция), ДЭАЭ TSK Toyopearl 650 M („Toyo Soda", Япония). Остальные реактивы производства „Союзхимреактив", СССР, квалификации ос. ч. Уровень радиоактивности проб определяли с помощью жидкостного сцинтилляционного спектрометра типа „Intertechnique" (Франция) с использованием сцинтиллятора ЖС—7А („Союзхимреактив" СССР). ВЭЖХ проводили на хроматографе „Altex-Beckman" (США) с применением колонок С—18, 4,6×250 мм („Ultrasphere ODS", США), TSK ДЭАЭ 3SW 21,5×150 мм („LKB", Швеция) и колонки для гель-фильтрации „Spherogel" TSK 2000, SW, 7,5×600 мм („Altex-Beckman", США).

Очистка Ca^{2+}-КМ-зависимой ФДЭ из мозга быка. Препарат ФДЭ получали по методу Бобрускина и Шайхина [23]. Мозг (400 г) гомогенизировали с помощью гомогенизатора типа «Политрон» в 25 мМ трис-HCl буфере, pH 7,0, содержащем 1 мМ ацетат магния, 3 мМ дитиотреитол или β-меркаптоэтанол, 0,1 мМ азид-Na. Гомогенат центрифугировали на центрифуге «Beckman G-21» (ротор JA-14) при 22000g в течение 60 мин. Супернатант подвергали ИОХ на колонке ДЭАЭ TSK; элюцию осуществляли с помощью буфера А, содержащего 25 мМ трис-HCl, pH 7,0. 200 мМ NaCl, 1 мМ $MgCl_2$, 1 мМ дитиотреитол, 0,1 мМ азид-Na. Элюат наносили на колонку с фенил-сефарозой, с которой фермент связывался в присутствии Ca^{2+} (1 мМ) и элюировался буфером В, содержащим 0,2 мМ ЭГТА.

Далее фермент подвергали ионообменной ВЭЖХ на колонке ДЭАЭ TSK 3SW, элюцию с которой осуществляли линейным градиентом концентраций NaCl (100—350 мМ). На последней стадии очистки фермент подвергали гель-фильтрации методом ВЭЖХ. Элюцию осуществляли буфером, содержащим 25 мМ трис-HCl, pH 7,0, 2 мМ ЭГТА, 0,1 М NaCl. Белок определяли по поглощению в УФ-спектре при 280 нм.

Очистка КМ. КМ выделяли по методу Gopalakrishna, Anderson [24], с некоторыми модификациями [23]. Дальнейшую очистку осуществляли методом ионообменной ВЭЖХ на колонке TSK ДЭАЭ, с которой КМ элюировали, используя линейный градиент концентраций NaCl (150—350 мМ) в 25 мМ трис-HCl буфере, pH 7,0. Элюат подвергали диализу против дистиллированной воды, после чего лиофилизировали. Выделенный таким образом КМ оказался гомогенным в 15%-ном ПААГ в присутствии 0,1%-ного ДДС-Na по данным электрофореза, проведенного по методу Laemmli [25].

Очистка С-модулинов. Препарат кариотропного нейрогормона «С», выделенный из магноцеллюлярных ядер гипоталамуса быка [26], подвергали дальнейшей очистке с помощью обратнофазовой ВЭЖХ по методу, предложенному нами ранее [14]. Исходный препарат нейрогормона «С» наносили на колонку С-18. Элюцию осуществляли в режиме линейного градиента ацетонитрила в воде (0—30%) со скоростью 1 мл/мин. Выход продукта контролировали по поглощению в УФ-области 210—220 нм. После лиофилизации пробы, проявляющие способность активировать ФДЭ, подвергали повторной рехроматографии. Чистоту препаратов С-модулина проверяли при помощи гель-проникающей ВЭЖХ на колонке TSK SW-2000, уравновешенной 0,05 М натрий-фосфатным буфером, pH 7,0, содержащим 0,1 мМ ЭГТА. Элюцию проводили тем же буфером со скоростью 0,3 мл/мин.

Выход продукта регистрировали по поглощению при 210—220 нм.

Определение активности ФДЭ. Активность ФДЭ определяли по методу Thompson, Appleman [27], основанному на измерении концентрации [^{3}H] аденозина в реакционной среде, образующегося в результате двухстадийной реакции гидролиза [^{3}H]cAMP и [^{3}H]5′-AMP с

участием ФДЭ и 5′-нуклеотидазы змеиного яда соответственно. Образовавшийся продукт отделяли от негидролизированных субстратов внесением в инкубационную смесь водной суспензии анионообменной смолы «Dowex». После центрифугирования определяли уровень радиоактивности супернатанта.

Результаты представлены в относительных единицах активности (ОЕА), рассчитанных по проценту гидролизованного cAMP в мин с учетом остаточной радиоактивности проб в отсутствие фермента и уровня неспецифической сорбции аденозина на ионообменнике при полном гидролизе субстрата в присутствии избытка фермента.

Результаты и обсуждение

Ранее было показано наличие в составе нейрогормона «С» трех термостабильных С-модулинов [14]. Характерная для всех трех модуляторов Ca^{2+}-независимая стимуляция активности ФДЭ исследована нами на С1. Установлено, что активация фермента увеличивается с ростом концентрации С-модулина и переходит на постоянный уровень в области насыщающих концентраций (рис. 1, *а*). График, представ-

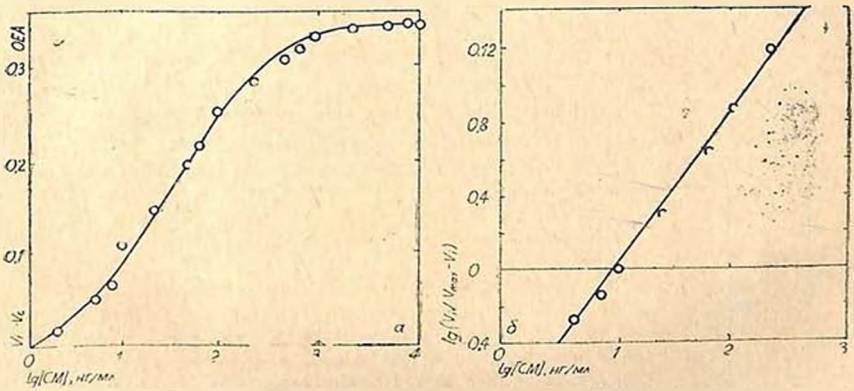
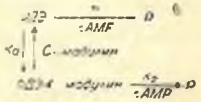


Рис. 1. Зависимость начальной скорости гидролиза cAMP от концентрации С-модулина (*1*) и кальмодулина (*2*). Опыты проводили в логарифмических координатах (*а*) и в координатах Хилла (*б*) в присутствии 0,2 мМ ЭГТА или Ca^{2+} соответственно. По оси абсцисс—логарифм концентрации активаторов (*А*), выраженный в нг/мл, по оси ординат—скорость гидролиза cAMP при концентрации субстрата 5 мкМ, выраженная в относительных единицах активности (ОЕА), где Va и Vo—скорость реакции в присутствии и в отсутствие активатора соответственно

ленный в координатах Хилла (рис. 1, *б*), свидетельствует о высоком сродстве С-модулина к ФДЭ, так как кажущаяся K_a комплекса (С-модулин·ФДЭ) составляет $2 \cdot 10^{-9}$ М. Значение величины n_H, равное 1, указывает на отсутствие кооперативности при взаимодействии фермента с С-модулином.

На рис. 2 представлен график зависимости активности ФДЭ от концентраций субстрата (cAMP) в координатах Лайнуивера-Бэрка под действием С-модулина. Эксперимент проведен в присутствии 0,2 мМ ЭГТА и С-модулина в двух фиксированных концентрациях (100 и 1000 нг/мл). Из графика следует, что величина эффективной константы сродства субстрата к молекуле ФДЭ, равная ~ 100 мкМ, не меняется при увеличении концентрации активатора на порядок. Вместе с тем, значение V_{max} претерпевает 6-кратное увеличение. Таким образом, связывание С-модулина во всем диапазоне представленных концентраций cAMP, по всей видимости, происходит неконкурентно по отношению к активному центру на молекуле ФДЭ. Схему активации можно представить следующим образом:



где k_1—константа скорости в отсутствие С-модулина, k_0—константа скорости при насыщающих его концентрациях, Ка—константа активации, Р—продукт реакции.

На рис. 3 представлен график зависимости активности ФДЭ под действием КМ от концентраций активатора в присутствии двух фиксированных концентраций С-модулина. Как видно из графика, в присутствии С-модулина наблюдается активация фермента, степень которой мало меняется при увеличении его концентрации. Повышение

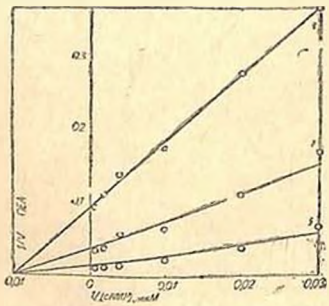


Рис. 2. Зависимость начальной скорости гидролиза cAMP от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера-Бэрка при различных концентрациях С-модулина в нг/мл: *1*—0, *2*—100, *3*—1000. Измерения выполнены в присутствии 0,2 мМ ЭГТА

концентрации С-модулина на порядок не изменяет точки перегиба кривой на оси абсцисс. Представленный на рис. 3, *б* график в координатах Хилла, отражающий ту же зависимость, показывает, что добавление С-модулина в реакционную смесь не приводит к изменению эффективной константы активации ФДЭ под действием КМ.

Можно предположить, что связывание С-модулина и КМ с молекулой ФДЭ носит неконкурентный характер. При этом степень активации ФДЭ под действием КМ в сочетании с С-модулином выше, чем тот же параметр для активации ФДЭ комплексом (Ca^{2+}·КМ). Сле-

довательно, влияние С-модулина и КМ на активность ФДЭ носит аддитивный характер. О возможном существовании комплекса (КМ·ФДЭ·С-модулин) свидетельствует тот факт, что при насыщающих концентрациях КМ в присутствии С-модулина графики зависимости активности ФДЭ от концентраций КМ выходят на уровень, превышающий максимальную величину степени активации ФДЭ под действием КМ в отсутствие С-модулина (рис. 3).

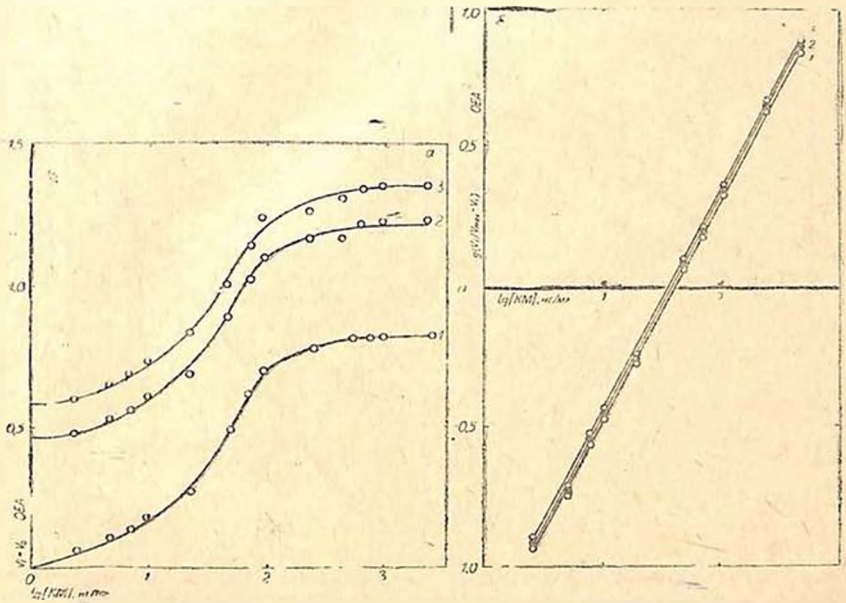


Рис. 3. Зависимость начальной скорости гидролиза cAMP от концентрации кальмодулина при различных концентрациях С-модулина в логарифмических координатах *(а)* и в координатах Хилла *(б)*: *1*—0, *2*—100, *3*—1000 нг/мл. По оси абсцисс—логарифм концентрации кальмодулина, выраженной в нг/мл, по оси ординат—скорость гидролиза cAMP при концентрации субстрата 5 мкМ, выраженной в ОЕА. Измерения выполнены в присутствии 2 мМ Ca^{2+}. Обозначения те же, что и на рис. 1

Аналогичную картину можно наблюдать на рис. 4, *а*, где представлена зависимость активности ФДЭ под действием С-модулина от концентраций последнего при двух фиксированных концентрациях КМ. Увеличение степени активации фермента и отсутствие изменения точек перегиба с изменением концентрации КМ на порядок очевидны, что показано и на рис. 3, *а*. Тот же график, представленный в координатах Хилла (рис. 4, *б*) свидетельствует о том, что КМ влияет на кинетические параметры реакции, катализируемой комплексом С-модулин—ФДЭ, посредством незначительного изменения сродства С-модулина к ферменту.

Последним в этой серии является эксперимент по изучению влия-

ния антагониста КМ—трифторперазина на активность комплекса (Ca^{2+}·КМ·ФДЭ·С-модулин). Результаты представлены на рис. 5, из которого следует, что в присутствии 100 мкМ трифторперазина наблюдается ингибирование комплекса (Ca^{2+}·КМ·ФДЭ·С-модулин) до уровня, превышающего величину максимальной активности комплекса (Ca^{2+}·КМ·ФДЭ) в присутствии антагониста. Трифторперазин тормо-

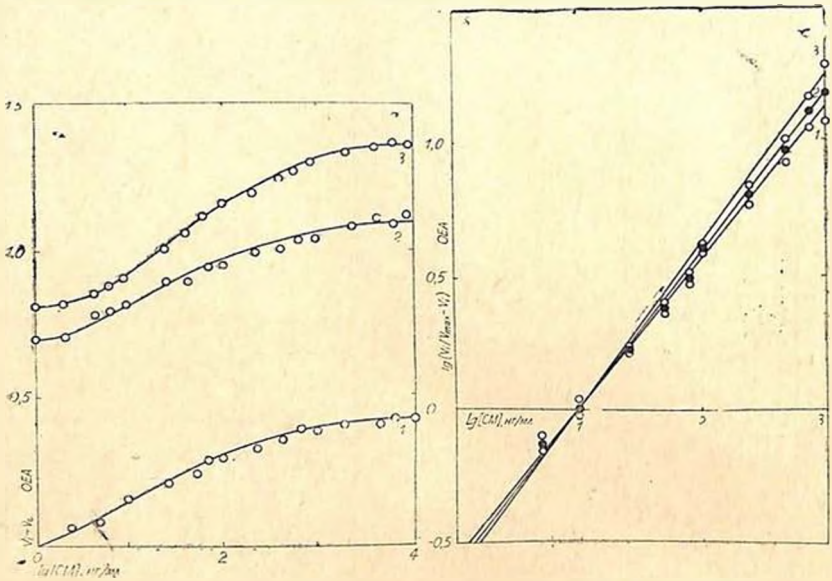


Рис. 4. Зависимость начальной скорости гидролиза cAMP от концентрации С-модулина при различных концентрациях кальмодулина в логарифмических координатах *(а)* и в координатах Хилла *(б)*: *2*—100, *3*—1000 нг/мл. По оси абсцисс—логарифм концентрации С-модулина, выраженной в нг/мл, по оси ординат—скорость гидролиза cAMP при концентрации субстрата 5 мкМ, выраженной в ОЕА. Измерения выполнены в присутствии 2 мМ Ca^{2+}. Обозначения те же, что и на рис. 1

зит также стимуляцию активности фермента С-модулином. Однако в отличие от 90%-ного ингибирования в случае комплекса (Ca^{2+}·КМ·ФДЭ), трифторперазин лишь частично (на 40%) снижал активность комплекса (С-модулин·ФДЭ). Следовательно, можно предположить, что инактивация комплекса (Ca^{2+}·КМ·ФДЭ·С-модулин) антагонистом КМ осуществляется за счет блокирования КМ и частичного торможения активирующего действия С-модулина.

Таким образом, из экспериментальных данных настоящей работы следует, что С-модулины могут выполнять роль Ca^{2+}-независимых аллостерических активаторов КМ-чувствительной ФДЭ из мозга быка.

Неконкурентное связывание с молекулой ФДЭ относительно субстрата cAMP является общим свойством С-модулинов. Иначе говоря,

сродство субстрата к активному центру на молекуле ФДЭ не претерпевает сколь-нибудь существенных изменений. Этот вывод согласуется с имеющимися на сегодняшний день литературными данными относительно Ca^{2+}-независимой активации КМ-чувствительной ФДЭ из мозга на примере жирных кислот [28, 29].

Некоторыми исследователями [30] предлагается гипотетическая модель взаимодействия Ca^{2+}-независимых модуляторов с ферментом посредством КМ-связывающего центра на молекуле ФДЭ. В условиях наших экспериментов, обсуждаемых выше, данная модель не подтвер-

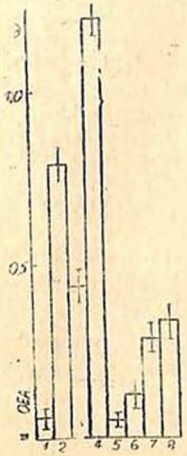


Рис. 5. Влияние трифторперазина (ТФП) на активность ФДЭ. Базальная активность ФДЭ (*1*), активация ФДЭ под действием Ca^{2+}-кальмодулина (*2*), С-модулина (*3*), С-модулина и (Ca^{2+}·КМ) (*4*). Те же параметры в присутствии 100 мкМ трифторперазина (5, 6, 7 и 8). Измерения проводили при концентрации субстрата (cAMP) 5 мкМ

дилась. Более того, из результатов экспериментов по определению активности ФДЭ в присутствии С-модулина и комплекса (Ca^{2+}·КМ) следует, что С-модулинсвязывающий центр не перекрывается с КМ-связывающим участком на молекуле фермента, то есть возможно существование комплекса (Ca^{2+}·КМ·ФДЭ·С-модулин). Иными словами, конкуренция С-модулина за центр связывания КМ на поверхности фермента маловероятна, поскольку сродство КМ к аллостерическому регуляторному участку ФДЭ не подвергается изменениям под влиянием С-модулина (рис. 3, *а, б*). В присутствии КМ неконкурентный по отношению к С-модулину характер взаимодействия с ФДЭ проявляется во всем диапазоне представленных концентраций С-модулина.

Таким образом, можно предположить наличие на поверхности ФДЭ некоторого центра, способного взаимодействовать с С-модулинами. Такое взаимодействие направлено на увеличение максимальной скорости гидролиза cAMP как в присутствии, так и в отсутствие КМ. При этом подобное взаимодействие не изменяет сродства субстрата к активному центру ФДЭ.

Авторы выражают благодарность М. В. Муратовой, А. С. Белову (МГУ, кафедра биохимии) за техническое содействие.

CALCIUM-INDEPENDET MODULATION OF BOVINE BRAIN CALMODULIN- ENSITIVE PHOSPHODIESTERASE-ACTIVITY BY C-MODULINS

GALOYAN A. A., *BOGRUSKIN I. D., GURVITS B. Ya., ABRAHAMYAN G. E.

Institute of Biochemistry, Armenian of Sciences, Yerevan
*Moscov State University

The bovine hypotalamus contained heat-stable factors posses-sing cardiotropic action and stimulating Ca^{2+}/CaM-sensitive phosphodiesterase activity 6—10 fold in the absence of calcium ions.

Kinetic analysis of the stimulating effect of one of such activaters demonstrated, that C-modulin mimicked the regulation of phosphodiesterase activity by calmodulin. The apparent dissociation constant of the activater-enzyme complex—was $2 \cdot 10^{-9}$ M and hill coefficient (n_H) averaged 1.

The binding of C-modulin to the enzyme was accompanied by the significant increase of the maximal rate of cAMP hydrolisis and was incompetitive respect in cAMP (K_m=100 mM).

The activating of C-modulins on phosphodiesterase beard additve character in presence of Ca^{2+}/CaM and caused an insignificant improvement in K_a for calmodulin activation ammounted to $3,3 \cdot 10^{-9}$ M.

The data presented testity that C-modulins are Ca^{2+}-independent allosteric activators of Ca^{2+}/CaM-sensitive phosphodiesterase from bovine brain.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Sutheriand E. W., Rall T. W.* J. Biol. Chem., v. 232, p. 1077—1091, 1958.
2. *La Porte D. S., Tocano W. A., Storm D. R.* Biochemistry, v. 18, p. 2820—282, 1979.
3. *Kincaid R. L., Manganiello V. C., Vangen M.* J. Biol. Chem., v. 256, p. 11345—11350, 1981.
4. *Sharma R. K., Wang T. H., Wirch E., Wang J. H.* J. Biol. Chem., v. 255, p. 5916—5923, 1980.
5. *Ho H. C., Wirch E., Wang J. H.* J. Biol. Chem., v. 252, p. 43—50, 1977.
6. *Lin Y. M., Lin Y. P., Cheung W. Y.* FEBS Lett., v. 49, p. 359—362, 1975.
7. *Teshima Y. M., Kakiuchi S.* Biochem. and Biophys. Res. Communs., v. 56, p. 489—495, 1974.
8. *Huang C. Y., Chau V., Chock P. B.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 78, p. 871—874, 1981.
9. *Wolf D. L., Brostrom C. O.* Arch. Biochem. and Biophys., v. 173, p. 720—731, 1976.
10. *Дудкин С. М., Алахов В. Ю., Северин С. Е., Швец В. И.* Докл. АН СССР, т. 276, № 6, с. 1510—1513, 1984.
11. *Krinks M. N., Hasch J., Rhoads A., Klee C. B.*—In: Adv. in Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Res. (eds. S. I. Strada, W. J. Thompson), v. 16, p. 31—47, Raven Press., N. Y., 1984.
12. *Cheung W. Y., Lim Y. M.*—In: Methods in Enzymology, Part. C. Academic Press, N. Y., London, v. 38, p. 223—239, 1974.

13. *Hamet P., Franks D. J., Tremblay J., Coquil J. F.* J. Biol Chem., v. 61, p. 1158—1163. 1983.
14. *Галоян А. А., Бобрускин И. Д., Гурвиц Б. Я., Абрамян Г. Э.* Нейрохимия, т. 8, № 1, с. 78—86, 1989.
15. *Галоян А. А.* Нейрохимия, т. 6, № 1, с. 3—9, 1987.
16. *Галоян А. А., Гурвиц Б. Я.* Вестник Академии Мед. наук СССР, т. 9, с. 64—69, 1982.
17. *Галоян А. А., Гурвиц Б. Я., Погосян М. А.*—В кн.: Вопросы биохимии мозга, Ереван, Изд. АН АрмССР, т. 11, с. 89—93, 1976.
18. *Гурвиц Б. Я., Сарибекян Г. А., Сомова Е. С., Галоян А. А.* Докл. АН АрмССР, т. XVI, с. 220—225, 1978.
19. *Галоян А. А., Чифликян М. Д., Мурадян М. Ш., Едигарян А. К., Абрамян С. С.* Нейрохимия, т. 5, № 1, с. 45—48, 1986.
20. *Парсаданян Г. К., Абелян Ж. Г., Галоян А. А.* Докл. АН АрмССР, т. 66, с. 164—167, 1978.
21. *Сраппонян Р. М., Саакян С. А., Абелян Ж. Г., Галоян А. А.* Вопр. биохимии мозга, г. Ереван, Изд. АН АрмССР, т. 3, с. 36—42, 1976.
22. *Галоян А. А., Алексанян С. С.* Докл. АН АрмССР, т. 58, с. 183—186, 1974.
23. *Бобрускин И. Д., Шайхин С. М., Муратова М. В., Баранова Л. А., Северин Е. С.* Биохимия, т. 52, вып. 8, с. 1344—1352, 1987.
24. *Gopalakrishna R., Anderson W. B.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 104 p. 830—836. 1982.
25. *Laemmly U. K.* Nature, v. 227, p. 680—683, 1970.
26. *Галоян А. А.* Вопр. биохимии мозга, т. 13, с. 9—38, 1978.
27. *Thompson W. J., Appleman M. M.* Biochemistry, v. 10 p. 311—316, 1971.
28. *Cheung W. C., Lynch T. J., Wallance P. W.* Adv. Cycl. Nucl. Res., v. 9, p. 233—251. 1978.
29. *Games S. L.* FEBS Lett., v. 99, p. 39—42, 1979.
30. *Gietzen K., Sador F. I., Bader H.* Biochem J., v. 3, p. 541—548, 1982.

Поступила 28. X. 1990

НЕЙРОХИМИЯ
т. 9, № 4, 1990

УДК 612.06+612.821.7

ВЛИЯНИЕ 2-ЭТИЛ-6-МЕТИЛ-3-ОКСИПИРИДИНА НА СОСТОЯНИЕ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА И ЕГО НЕЙРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ПРИ НАРУШЕНИИ СНА

ТАРАНОВА Н. П., НИЛОВА Н. С., *ВОРОНИНА Т. А., *НЕРОБКОВА Л. Н., *МАРКИНА Н. В.

Институт физиологии им. И. П. Павлова АН СССР, Ленинград
*Научно-исследовательский институт фармакологии АМН СССР, Москва

Показано, что препарат 2-этил-6-метил-3-оксипиридин в дозе 100 мг/кг, не вызывая каких-либо нейрофизиологических сдвигов, оказывал ингибирующее действие на активность процессов ПОЛ в синаптосомах головного мозга у контрольных крыс. При лишении крыс парадоксальной фазы сна в течение 24 ч ингибирующее действие препарата на пероксидацию липидов значительно усиливалось, что коррелировало с нормализацией поведенческих и электрофизиологических сдвигов, вызванных нарушением сна. Предполагается, что антиоксидантный эффект 2-этил-6-метил-3-оксипиридина играет важную роль в реализации его антистрессорного действия и защитного эффекта при нарушении сна.

Фармакологически активные производные 3-оксипиридина (3-ОП) представляют собой новый класс психотропных веществ, обладающих широким спектром биологического действия [1, 2]. Механизмы действия 3-ОП еще недостаточно изучены. В модельных системах *in vitro* была показана антиокислительная активность 3-ОП по отношению к метил-олеату [1] и способность этих соединений реагировать со свободными радикалами [3]. Кроме того, продемонстрировано модулирующее и модифицирующее действие 3-ОП на биологические мембраны различных тканей [4—7]. По-видимому, именно с этими свойствами и связаны лечебные эффекты препаратов группы 3-ОП. Эксперименты показали анксиолитическое, антистрессорное, противогипоксическое, седативное и антиамнестическое действие препаратов этой группы [8]. Однако прямых исследований действия 3-ОП на систему ПОЛ нервной ткани в условиях *in vivo* не имеется.

В связи с тем, что одним из основных эффектов 3-ОП является антистрессорное действие, целью настоящей работы было комплексное нейрофизиологическое и нейрохимическое исследование влияния одного из производных 3-ОП, а именно 2-метил-6-метил-3-оксипиридина (ЭМ-3-ОП) на ряд показателей ПОЛ головного мозга и функций ЦНС у крыс в норме и при нарушениях, вызванных лишением парадоксальной фазы сна (ПФС).

Задачей настоящего исследования было выявление возможной корреляции между влиянием ЭМ-3-ОП на систему ПОЛ и его поведенческими и нейрофизиологическими эффектами.

Материалы и методы

Опыты ставили на белых крысах-самцах линии *Wistar* массой 160—180 г. Лишения животных ПФС достигали путем помещения крыс на кубики, окруженные водой [9]. Фракцию синаптосом из коры больших полушарий получали методом Hajos [10]. В синаптосомах коры определяли содержание первичных (диеновые конъюгаты), вторичных (малоновый диальдегид—МДА, ТБК-активные продукты) и конечных (основания Шиффа) продуктов ПОЛ. Кроме того, в опытах *in vitro* изучали динамику неферментативного аскорбатзависимого индуцированного ПОЛ по приросту МДА. Детали всех использованных методик исследования ПОЛ описаны ранее [11, 12].

Параллельно проводили исследование нейрофизиологических эффектов препарата. В течение 5 ч в условиях свободного поведения животных проводили запись ЭЭГ и ЭМГ на электроэнцефалографе «Нейрограф-18» с последующей обработкой на нейрокомпьютере BAS-161 («О.Т.Е. «Biomedica», Италия), как описано ранее [13]. Обучение крыс проводили по методике условной реакции пассивного избегания (УРПИ) [14]. Степень эмоциональности определяли по шкале, предложенной Brady, Nauta [15] и модифицированной Гарибовой и соавт. [16], суммируя число баллов по отдельным тестам. Ориентировочно-исследовательское поведение оценивали по тесту «открытого поля», суммируя количество отдельных показателей в течение 2 мин.

Эксперименты проводили на 4 группах животных: 1—контроль (без введения препарата и без депривации ПФС); 2-лишение ПФС в течение 24 ч; 3—введение препарата без депривации ПФС; 4—введение препарата и лишение ПФС в течение 24 ч.

Препарат ЭМ-3-ОП вводили внутрибрюшинно (50 мг/кг) перед началом опыта и через 12 ч после помещения крыс на площадки. Животным, не подвергавшимся лишению ПФС (группа 3), препарат вводили по той же схеме. Контрольные животные (группа 1) и крысы, подвергнутые лишению ПФС без введения препарата (группа 2), получали инъекции физиологического раствора.

Результаты и обсуждение

Результаты опытов по влиянию ЭМ-3-ОП *in vivo* на содержание продуктов ПОЛ в синаптосомах коры в норме и на фоне лишения ПФС в течение 24 ч приведены в табл. 1. Введение препарата контрольным животным вызывало достоверное уменьшение содержания диеновых конъюгатов на 24% и оснований Шиффа на 23%. Угнетение процессов ПОЛ под влиянием препарата свидетельствует об антиоксидантном действии ЭМ-3-ОП на синаптические структуры перв-

ной ткани *in vivo* и хорошо согласуется с данными, полученными на модельных системах и мембранных структурах *in vitro* [1, 3]. Депривация ПФС в течение 24 ч сама по себе также приводила к угнетению процессов ПОЛ в синаптосомах на стадии образования диеновых конъюгатов (снижение содержания на 24%) и на стадии образования шиффовых оснований (уменьшение на 27%), что подтверждает аналогичные исследования, выполненные нами ранее [11].

Таблица 1

Содержание продуктов ПОЛ *in vivo* в синаптосомах коры головного мозга крыс при лишении ПФС 24 ч на фоне введения 2-этил-6-метил-3-оксипиридина

Продукты ПОЛ	Контроль	Лишение ПФС 24 ч	Контроль + препарат	Лишение ПФС 24 ч + препарат
	1	2	3	4
Диеновые конъюгаты (нмоль/мг липидов)	4,6±0,22 (10)	3,5±0,21* (9)	3,5±0,31* (11)	3,1±0,22* (11)
ТБК-активные продукты (нмоль/мг белка)	21±21 (9)	136±13 (9)	182±10 (9)	19[illegible]±11 (9)
Основания Шиффа (усл. ед./мг липидов)	56,4±3,4 (10)	41,3±3,6* (9)	43,2±3,[illegible]* (10)	30,[illegible]±[illegible],6** (9)

Примечание. *—достоверно по отношению к 1 ($p<0,05$), **—достоверно по отношению к 2 ($p<0,05$). Здесь и в табл. 2, 3 в скобках—число опытов.

В условиях нарушения сна действие препарата на уровень ПОЛ в синаптосомах заметно усиливалось (табл. 1). Особенно это сказывается на содержании шиффовых оснований: дополнительное уменьшение концентрации этих соединений при лишении ПФС на фоне введения препарата по сравнению с влиянием одного нарушения сна составляет 27% и является достоверным. Тенденция к усилению эффектов ЭМ-3-ОП при лишении ПФС наблюдалась и для диеновых конъюгатов, но в этом случае дополнительное уменьшение содержания диеновых конъюгатов на 11% при совместном влиянии лишения ПФС и фармпрепарата было статистически недостоверно. Уменьшение содержания шиффовых оснований и диеновых конъюгатов при введении ЭМ-3-ОП на фоне лишения ПФС по сравнению с интактным контролем составляет соответственно 46 и 33%.

Уменьшение уровня ПОЛ под влиянием ЭМ-3-ОП на фоне лишения ПФС является, по всей видимости, одним из механизмов антистрессорного действия препарата, так как по литературным данным неустойчивость крыс к стрессу развивается в условиях дисбаланса уровня ПОЛ и антиоксидантной активности нервной ткани [17], а адаптация к стрессу сопровождается уменьшением уровня свободнорадикального окисления липидов в головном мозгу [18].

В параллельных опытах проводили исследование нейрофизиологических эффектов ЭМ-3-ОП. Показано, что введение препарата контрольным животным не влияло на степень эмоциональности крыс. Ли-

шение ПФС в течение 24 ч, а также введение ЭМ-3-ОП на фоне лишения ПФС тоже не меняли этот показатель.

Установлено, что введение ЭМ-3-ОП не влияет на поведение в открытом поле. Нарушение сна приводит к увеличению тревожности, то есть к усилению двигательной активности крыс, регистрируемой этим тестом. Введение ЭМ-3-ОП на фоне лишения ПФС нормализует двигательную активность крыс в открытом поле.

Интересные результаты были получены при изучении влияния ЭМ-3-ОП на фоне нарушения сна на воспроизведение УРПИ, которую применяли как наиболее простую условно-рефлекторную модель, характеризующую способность животных к запоминанию и воспроизведению информации. Критерием этой способности является латентное время захода в темную камеру при воспроизведении реакции: до обучения крысы заходят в темный отсек практически сразу, но после обучения при воспроизведении реакции (тестировании) время захода туда животных значительно увеличивается. Результаты экспериментов представлены в табл. 2. При тестировании введение

Таблица 2

Влияние препарата 2-этил-6-метил-3-оксипиридина на латентное время захода крыс в темный отсек при выработке условной реакции пассивного избегания (УРПИ)

Воспроизведение УРПИ	Контроль	Лишение ПФС 24 ч	Контроль препарат	Лишение ПФС 24 ч+ препарат
	1	2	3	4
Латентное время захода в темный отсек при воспроизведении УРПИ, с	57,7±9,1 (10)	4,4±1,5* (10)	71,5±8,6 (10)	67,5±7,4 (10)

Примечание. *—достоверно по отношению к 1 ($p<0,05$).

ЭМ-3-ОП контрольным животным не изменяло латентное время захода в темный отсек по сравнению с виварным контролем. Лишение ПФС в течение 24 ч заметно и достоверно снижало латентное время захода, что свидетельствует об амнезии, вызванной нарушением сна. Введение ЭМ-3-ОП животным, подвергнутым лишению ПФС, возвращает латентное время захода до уровня виварного контроля. Таким образом, эти результаты демонстрируют сильное антиамнестическое действие препарата ЭМ-3-ОП, сравнимое с эффектом ноотропов [14]. Можно предположить, что ЭМ-3-ОП по механизму действия близок к ноотропам, но в то же время отличается от классического антистрессорного препарата—транквилизатора феназепама, который не устранял амнезию, вызванную депривацией ПФС [14].

Анализ спектров электрической активности сенсомоторной коры и дорзального гиппокампа показал угнетение гиппокампального тета-ритма в особенности его фазического компонента при лишении крыс ПФС. Введение ЭМ-3-ОП крысам, подвергнутым лишению ПФС,

вызывало синхронизацию тета-ритма, который регистрируется не только в гиппокампограммах, но и в кортикограммах, с выраженностью обоих его компонентов. Синхронизация ЭЭГ в диапазоне тета-ритма под влиянием ЭМ-3-ОП отражает, по-видимому, возникновение новых возможностей для образования и упрочения условных связей. Подобные эффекты ЭМ-3-ОП на поведенческие и электрофизиологические показатели в норме и при лишении ПФС четко воспроизводятся независимо от времени года и популяции животных [13].

Отмеченное нами антистрессорное и антиоксидантное действие ЭМ-3-ОП связано, по-видимому, с мембранотропным эффектом препарата, т. е. с его способностью взаимодействовать с синаптическими мембранами и вызывать их конформационные перестройки. Определенное подтверждение этому было получено в опытах *in vitro* при исследовании влияния препарата на индуцированное аскорбатзависимое ПОЛ в синаптосомах нормальных и лишенных ПФС крыс.

Результаты исследования динамики индуцированного аскорбатзависимого ПОЛ в синаптосомах коры через 24 ч после введения препарата, а также влияние лишения ПФС на этот процесс показаны в табл. 3. Из результатов следует, что само по себе введение препа-

Таблица 3

Динамика аскорбатзависимого неферментативного индуцированного ПОЛ синаптосом коры головного мозга крыс при введении животным 2-этил-6-метил-3-оксипиридина на фоне лишения ПФС в течение 24 ч по приросту МДА в нм/мг белка

Время инкубации	Контроль	Лишение ПФС 24 ч	Контроль + препарат	Лишение ПФС + 24 ч + препарат
	1	2	3	4
5 мин	4,5±0,38 (13)	4,6±0,28 (13)	4,5±0,39 (13)	4,8±0,28 (13)
10 мин	6,5±0,34 (13)	6,4±0,37 (13)	7,0±0,50 (13)	7,2±0,44 (13)
15 мин	7,1±0,32 (12)	7,7±0,44 (13)	8,0±0,53 (13)	8,3±0,47* (13)
20 мин	9,2±0,42 (13)	9,6±0,53 (13)	10,5±0,81 (13)	11,1±0,72** (10)

Цифры в скобках—число опытов; *—достоверно по отношению к 1 ($p<0,05$). **—достоверно по отношению к 2 ($p<0,05$).

рата или лишение ПФС не влияло на прирост МДА при индукции ПОЛ за 5, 10, 15 и 20 мин инкубации. Наблюдали лишь тенденцию к усилению индуцированного ПОЛ при лишении крыс ПФС, а также в группе контрольных животных, получивших препарат. Однако введение ЭМ-3-ОП крысам, подвергнутым нарушению сна, приводило к активации процессов неферментативного индуцированного ПОЛ в конце инкубации проб—через 15 и 20 мин. Увеличение прироста МДА по отношению к контролю—крысам, содержавшимся в обычных клетках и не получавших препарат, составляло 17 и 24% и было статистически достоверно. Несколько меньшую активацию индуцированного

in vitro ПОЛ наблюдали у крыс, подвергнутых лишению ПФС и получавших препарат по сравнению с крысами, лишенными ПФС и не получивших предварительно ЭМ-3-ОП. Однако и здесь в конце инкубации проб *in vitro* (через 20 мин) увеличение прироста МДА в присутствии препарата составляло 19% и было статистически достоверно ($p=0,05$).

Таким образом, в отличие от опытов *in vivo*, где введение препарата на фоне лишения ПФС вызывало дополнительное ингибирование уровня ПОЛ, в опытах *in vitro* мы наблюдали активацию процессов ПОЛ в синаптосомах из коры головного мозга крыс, получивших ЭМ-3-ОП и подвергнутых лишению ПФС, по сравнению с виварным контролем, а также с крысами, лишенными ПФС и не получившими препарат. Вероятно, условия реализации процессов свободнорадикального окисления в условиях *in vivo* и *in vitro* могут отличаться. Следует помнить, что при индукции *in vitro* процессы ПОЛ могут происходить в условиях нарушения естественного контроля со стороны антиоксидантной системы и поэтому липиды—субстраты ПОЛ могут окисляться с другой скоростью. Возможно, что одной из точек приложения действия фармпрепарата *in vivo* является не только взаимодействие со свободными радикалами, но также активация системы ферментов антиоксидантной защиты, приводящая к дополнительному угнетению ПОЛ в нервной ткани при лишении животных ПФС в течение 24 ч. Сохранение быстро окисляемых липидов в результате ингибирования ПОЛ *in vivo* может также приводить к более активному их использованию при индукции ПОЛ *in vitro*.

Вместе с тем активация процессов индуцированного ПОЛ под влиянием препарата в опытах *in vitro* свидетельствует о том, что предварительное введение препарата способствует лучшему сохранению структуры и свойств синаптических мембран при длительных сроках инкубации *in vitro* в присутствии индуктора, а также к изменению геометрии центров радикалообразования при индукции процессов ПОЛ и увеличению прироста МДА в индуцированном *in vitro* процессе ПОЛ. Особенно чувствительными к действию препарата оказываются синаптосомы из головного мозга крыс, лишенных ПФС, возможно потому, что лишение ПФС само по себе вызывает функционально-структурные сдвиги синаптических мембран [19, 20]. Мы полагаем, что эти результаты по влиянию предварительного введения препарата ЭМ-3-ОП на уровень ПОЛ свидетельствуют о мембранотропном действии этого препарата на мембранные структуры нервной ткани.

Таким образом, в настоящем исследовании установлено антиоксидантное действие препарата ЭМ-3-ОП и показано, что облегчение перенесения последствий нарушения сна и нормализация нейрофизиологических функций в присутствии ЭМ-3-ОП коррелирует с еще более глубоким ингибированием уровня ПОЛ в синаптосомах мозга *in vivo*. В основе ингибирования процессов ПОЛ, по-видимому, могут лежать не только антиоксидантные свойства препарата, но и возмож-

ность активации им ферментов антиоксидантной защиты, а также способность ЭМ-3-ОП связываться биологическими мембранами и вызывать их структурно-функциональные перестройки.

Следует отметить, что влияние производных 3-ОП на процессы ПОЛ не является единственной точкой приложения их действия. Множественность эффектов препаратов и сложность картины их физиологического влияния на ЦНС требуют дальнейшего многостороннего исследования нейрохимических механизмов действия препаратов этого типа.

THE EFFECT OF 2-ETHYL-6-METHYL-3-HYDROXYPYRIDINE ON LIPID PEROXIDATION IN BRAIN AND ITS NEUROPHYSIOLOGICAL EFFECTS UNDER REM-SLEEP DEPRIVATION

TARANOVA N. P., NILOVA N. S., VORONINA T. A., NEROBKOVA L. N., MARKINA N. V.

Pavlov Institute of Physiology, USSR Academy of Sciences, Leningrad and Research Institute of Pharmacology, USSR Academy of Medical Sciences, Moscow

Antistressor drug 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine inhibits lipid peroxidation in synaptosomes of control rats at a dose of 100 mg/kg. However, there was no change in electrophysiological characteristics of brain. Owing to the fact that this drug might normalize the behavioral and electrophysiological disturbances induced by REM-sleep deprivation, we propose that the antioxidant action of 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypiridine plays an important role in realization of the antistress protective effect under sleep deprivation.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Смирнов Л. Д., Дюмаев К. М.* Хим.-фармац. журн., т. 16, с. 412—428, 1982.
2. *Дюмаев К. М., Воронина Т. А., Смирнов Л. Д., Вальдман А. В.* Вест. АМН СССР, № 11, с. 3—7, 1984.
3. *Михаджинова Д. Р., Кузьмин В. И., Смирнов Л. Д., Шарпатый В. А.* Изв. АН СССР, серия химич., № 10, с. 2216—2218, 1981.
4. *Меерсон Ф. З., Павлова В. В.* Вопр. мед. химии, т. 26, с. 827—831, 1980.
5. *Бурлакова Е. Б., Кайранс Ч. Б., Молочкина Е. М., Хохлов А. П.* Вопр. мед. химии, т. 30, с. 66—72, 1984.
6. *Смирнов Л. Д., Дюмаев К. М.* Вест. АМН СССР, № 11, с. 89—94, 1984.
7. *Жердев В. П., Сариев Е. К., Дворяninов А. А., Воронина Т. А., Смирнов Л. Д.* Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 101, с. 325—326, 1986.
8. *Вальдман А. В., Воронина Т. А., Смирнов Л. Д., Дюмаев К. М.* Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 99, с. 60—62, 1985.
9. *Jouvet D., Vimont P., Delorme F., Jouvet M.* C. R. Soc. biol., v. 158, p. 756—759, 1964.
10. *Hajos F.* Brain. Res., v. 93, p. 485—489, 1975.
11. *Таранова Н. П., Нилова Н. С.* Физиол. журн., т. 72, с. 1065—1069, 1986.
12. *Таранова Н. П., Нилова Н. С.* Нейрохимия, т. 7, с. 259—263, 1988.

13. *Соколова Н. Е., Таранова Н. П., Воронина Т. А., Неробкова Л. Н., Маркина Н. В.* Нейрохимия, т. 7, с. 483—492, 1988.
14. *Маркина Н. В., Неробкова Л. Н., Воронина Т. А.* Журн. ВНД, т. 36, с. 963—967, 1986.
15. *Brady J. V., Nauta W. J. J.* Compar. and Physiol. Psychol., v. 6, p. 336, 1953.
16. *Гарибова Т. Л., Рожанец В. В., Рахманкулова И. Х., Воронин К. Э., Цонева-Тютюнкова Н., Стефанова Д., Тимофеева С. Э., Вальдман А. В.* Медико-биологическая информация, Болгария, № 4, с. 8, 1985.
17. *Гуляева Н. В., Хоничева Н. М., Обидин А. Б.* Нейрохимия, т. 6, с. 259—262, 1987.
18. *Айрапетянц М. Г., Гуляева Н. В.* Вест. АМН СССР, № 11, с. 49—55, 1988.
19. *Демин Н. Н.* Нейрохимия, т. 1, с. 20—27, 1982.
20. *Нилова Н. С.* Цитология, т. 26, с. 1396—1400, 1984.

Поступила 26. XI. 1989

НЕЙРОХИМИЯ
т. 9, № 4, 1990

УДК 612.8.015+616.988.2

ИНТЕНСИВНОСТЬ МЕТАБОЛИЗМА ОБЩИХ ЛИПИДОВ, ГАЛАКТОЦЕРЕБРОЗИДОВ И СУЛЬФОЦЕРЕБРОЗИДОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ОСТРОМ И ХРОНИЧЕСКОМ ЛНМ КОРОНАВИРУСНОМ ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТЕ У МЫШЕЙ

АННАНЕПЕСОВ Х. Н., ЧАЕВА Л. С., КОНОВАЛОВ Г. В., МАПОРОВА Л. П.

Туркменский государственный медицинский институт, Ашхабад,
лаборатория биохимии нервной системы и обмена веществ ЛГУ
Институт экспериментальной медицины, Ленинград

Изучена интенсивность метаболизма общих липидов, галактоцереброзидов и сульфоцереброзидов головного мозга при остром и хроническом ЛНМ коронавирусном энцефаломиелите у мышей. В острой стадии заболевания обнаружены существенные нарушения метаболизма общих липидов и гликолипидов, выразившиеся в уменьшении их содержания на 15% и в резком снижении включения радиоактивного предшественника 2[^{14}C] ацетата как в общие липиды (в 10 раз), так и в цереброзиды и сульфоцереброзиды (на 55—68%). При хроническом энцефаломиелите не выявлено изменения содержания указанных липидов, однако интенсивность включения радиоактивного предшественника в цереброзиды с нормальными жирными кислотами снижена на 65%, а в сульфоцереброзиды—на 20%.

В последние годы вновь обсуждается возможная роль вирусов в этиопатогенезе рассеянного склероза и ряде других медленно прогрессирующих демиелинизирующих заболеваний НС [1]. Одной из удачных экспериментальных моделей демиелинизирующего процесса вирусной природы является энцефаломиелит, вызываемый ЛНМ штаммом коронавирусов. Последний позволяет воспроизвести острую, подострую и хроническую форму вирусной демиелинизации [2]. В работах Коновалова и соавт., детально изучена неврологическая симптоматика, проведены вирусологические и морфологические исследования, характеризующие различные стадии развития демиелинизирующего поражения [3]. Показано, что при острой вирусной инфекции демиелинизация возникает как результат функциональной недостаточности преимущественно глиальных клеток. В хронической стадии заболевания наблюдалось периодическое обострение патологического процесса с последующими ремиссиями [4].

Ранее было изучено содержание фосфолипидов, цереброзидов и сульфоцереброзидов НС при остром ЛНМ энцефаломиелите [5]. Однако данные по изменению количества изучаемых липидов еще не могут дать ответа о нарушении их метаболизма под влиянием экспе-

риментальной демиелинизации. В этом отношении большое значение имеют исследования, проводимые с использованием радиоактивного предшественника, позволяющие определить интенсивность включения радиоактивной метки. Таким образом, особенности обмена липидов ЦНС при коронавирусной демиелинизации практически не исследованы.

Изучение влияния ЛНМ коронавирусов на метаболизм липидов нервной ткани представляет и самостоятельный интерес. Известно [6], что различные вирусы имеют характерную биохимию внутриклеточного паразитирования, определяющую особенности взаимодействия вируса и клетки-хозяина.

В настоящей работе исследовано содержание и интенсивность обмена общих липидов, цереброзидов и сульфоцереброзидов в ЦНС при остром и хроническом энцефаломиелите с помощью радиоактивного 2 [^{14}C] ацетата.

Материалы и методы

В работе использовали мышей линии СЗН, зараженных интрацеребрально в возрасте 4-х недель ЛНМ штаммом коронавируса мышиного гепатита. Это приводило к развитию хронического рецидивирующего заболевания энцефаломиелита, в котором на основании клинико-морфологических данных выделен острый период (5—13-ый день после заражения), подострая стадия (14—30-й день после инфицирования) и хроническая стадия (4—5 месяцев после заражения). Острый период заболевания сопровождался парезами и развитием спастических судорог. У мышей с хронической формой вирусной демиелинизации отчетливых неврологических симптомов не проявлялось.

В экспериментах использовали животных, находящихся в остром периоде заболевания, возраст которых к моменту постановки опыта составлял 5 недель и животных в хронической стадии заболевания в возрасте 5 месяцев. За 1 ч до забоя животным подкожно вводили 2 [^{14}C] ацетат из расчета 30 мкКи на 100 г массы тела. Экстракцию липидов из ткани мозга, их количественное определение и измерение радиоактивности проводили по ранее описанным методикам [7].

Результаты и обсуждение

Как видно из результатов опытов (табл. 1), в головном мозгу мышей при остром ЛНМ коронавирусном энцефаломиелите отмечается небольшое, по сравнению с контролем, снижение содержания общих липидов—на 11,2%. Содержание цереброзидов с оксикислотами снизилось на 15%, а цереброзидов с нормальными жирными кислотами изменилось менее существенно, на 7,7% и оказалось статистически недостоверным ($p>0,05$). Количество сульфоцереброзидов при острой форме энцефаломиелита оказалось сниженным на 15,6%. Однако существенного перераспределения процентного соотношения фракций

гликолипидов не выявлено. Как следует из данных, представленных в табл. 2, при хроническом ЛНМ-энцефаломиелите не установлено статистически достоверных изменений содержания как общих липидов, так и фракций цереброзидов и сульфоцереброзидов. Во всех случаях $p > 0{,}05$.

Таблица 1

Содержание и удельная радиоактивность общих липидов, галактоцереброзидов и сульфоцереброзидов головного мозга мышей линии СЗН в норме и при остром ЛНМ-энцефаломиелите (M±m, n=6)

Липиды	мг/г влажной ткани		Удельная радиоактивность имп/мин/мг	
	контроль	энцефаломиелит	контроль	энцефаломиелит
Общие липиды	55,40±0,91	49,20±2,24*	386±30	3±3*
Цереброзиды с оксикислотами	5,74±0,28	4,87±0,33*	154±13	79±9*
Цереброзиды с нормальными жирными кислотами	4,15±0,12	3,83±0,17*	182±18	58±14*
Сульфоцереброзиды	4,41±0,04	1,19±0,05*	129±9	46±6*

Примечание. Здесь и в табл. 2 звездочкой отмечены статистически достоверные различия по сравнению с контролем ($p < 0{,}05$—$0{,}001$).

Использование 2 [^{14}C] ацетата позволило проследить интенсивность включения радиоактивного предшественника в общие липиды и исследуемые гликосфинголипиды мозга в норме и при коронавирусном энцефаломиелите. Результаты экспериментов (табл. 1) свидетельствуют о том, что при острой форме энцефаломиелита обнаруживаются резко выраженные изменения этого показателя (табл. 1). Так, удельная радиоактивность общих липидов головного мозга при ЛНМ энцефаломиелите по сравнению с контрольными данными в 10 раз снижена. Величины УР цереброзидов с оксикислотами у больных животных понижены на 55,2%, а цереброзидов с нормальными жирными кислотами—на 68,2% по сравнению с контролем. При этом установлено также резко выраженное снижение включения радиоактивной метки и в сульфоцереброзиды головного мозга мышей на 64,4%.

В отличие от острой формы, при хроническом ЛНМ энцефаломиелите получены данные (табл. 2), позволяющие говорить о менее существенном нарушении включения 2 [^{14}C] ацетата в липиды головного мозга мышей. В этих условиях величина УР общих липидов увеличилась на 17,5% от контрольной величины. В то же время УР цереброзидов с оксикислотами не изменилась, однако существенно снизилось включение радиоактивного предшественника в цереброзиды с нормальными жирными кислотами и в сульфоцереброзиды.

Об общем уровне радиоактивности предшественников в головном мозгу можно судить по УР гомогената ткани. В опытах с острой формой энцефаломиелита УР гомогената мозговой ткани возросла с

764 имп/мин/мг до 1018 имп/мин/мг в расчете на сухой вес ткани, то есть в 1,5 раза. Тем не менее, несмотря на значительное возрастание УР гомогената, полученные данные указывают на резкое снижение включения [^{14}C] ацетата в общие липиды и гликолипиды. Последнее с учетом снижения содержания цереброзидов и сульфоцереброзидов может служить доказательством угнетения их синтеза при остром энцефаломиелите. При хроническом JHM-энцефаломиелите УР гомогената мозговой ткани не отличалась от контрольной величины (соответственно 506 и 535 имп/мин/мг). Как показано выше, и в этих условиях отмечалось отчетливое снижение включения радиоактивной метки в цереброзиды с нормальными жирными кислотами и в сульфоцереброзиды, однако они были менее существенны, чем при острой форме заболевания.

Таблица 2

Содержание и удельная радиоактивность общих липидов, галактоцереброзидов и сульфоцереброзидов головного мозга мышей линии СЗН в норме и при хроническом коронавирусном энцефаломиелите (M±m, n=6)

Липиды	мг/г влажной ткани		Удельная радиоактивность имп/мин/мг	
	контроль	энцефаломиелит	контроль	энцефаломиелит
Общие липиды	63,91±0,63	72,60±7,42	189±3	222±11*
Цереброзиды с оксикислотами	10,24±0,34	10,65±0,45	18±2	17±1
Цереброзиды с нормальными жирными кислотами	5,11±0,17	4,97±0,21	58±6	20±3*
Сульфоцереброзиды	1,34±0,23	1,48±0,14	80±4	64±2*

Обнаруженное нами нарушение метаболизма гликолипидов при острой форме энцефаломиелита коррелирует с изученной при этом морфологической картиной. А именно, отечественными и зарубежными исследователями [2, 10] показано, что при острой форме JHM энцефаломиелита происходит демиелинизация нервных волокон, репликация коронавирусов в глиальных клетках и избирательное поражение олигодендроцитов. Последние участвуют в миелиногенезе и синтезе цереброзидов [11]. Исследование влияния разных липидсодержащих вирусов на обмен фосфорил-холина, предшественника фосфолипидов, в клетках куриного эмбриона и клетках почек детеныша хомячка выявило специфические особенности действия вирусов на синтез липидов [6]. В связи с этим следует подчеркнуть, что коронавирусы также относятся к липидсодержащим вирусам [8]. В то время как белки клетки-хозяина не включаются в вирусы, липиды мембран вирусов происходят целиком от клетки-хозяина [9]. Они практически содержат те же классы липидов, но соотношение их может быть различным у одних и тех же вирусов, культивируемых в разных клетках. При остром JHM энцефаломиелите показано также накопление в

нервной ткани продуктов перекисного окисления липидов, повреждающих биологические мембраны [12].

Морфологическая картина при хроническом энцефаломиелите у крысят через 1,5—12 месяцев после заражения их вирусом характеризуется преимущественной локализацией процесса в белом веществе при полной сохранности нейронов и их аксонов [10]. Для хронического коронавирусного энцефаломиелита характерны деструктивные изменения олигодендроцитов и астроцитов, сопровождающиеся глиозными разрастаниями, приводящими к образованию нейроглиальных «склеротических» бляшек. Если при остром ЛНМ энцефаломиелите с помощью методов электронной микроскопии и иммунофлуоресценции в олигодендроцитах постоянно обнаруживаются вирионы (их антитела), а вирусологически из различных отделов ЦНС удается выделить вирус, то при хронической стадии процесса выявить вирусы никогда не удается [10, 13]. Интимные вопросы патогенеза хронической вирусной демиелинизации во многом неясны, но не вызывает сомнения участие иммунопатологических механизмов—гиперчувствительности замедленного типа, против измененных вирусом антигенов мембран нервной ткани, а также гуморального ответа (антитела). Известно, что гликолипиды являются наиболее иммуногенными из липидов, а антисыворотка против галактоцереброзидов вызывает демиелинизацию [14].

Создание экспериментальных моделей демиелинизации является одним из возможных подходов к изучению демиелинизирующих поражений ЦНС. Так, в работах Тарановой и соавт. всесторонне исследовался метаболизм липидов НС [15, 16] при экспериментальном аллергическом энцефаломиелите. Показано резкое угнетение всех классов липидов как в спинном, так и в головном мозгу, что свидетельствовало о генерализованном характере нарушений обмена липидов в ЦНС при аллергическом энцефаломиелите. При другой экспериментальной модели демиелинизирующего заболевания—хронической гиперфенилаланинемии выявлено уменьшение содержания цереброзидов и сульфоцереброзидов, а также резкое снижение интенсивности метаболизма этих гликолипидов [7]. Влияние вирусной демиелинизации на метаболизм липидов нервной системы в литературе не освещено.

Полученные нами данные о существенном снижении интенсивности метаболизма важнейших миелиновых липидов цереброзидов и сульфоцереброзидов в головном мозгу мышей при остром ЛНМ энцефаломиелите, скорее всего, связаны с нарушением функции олигодендроцитов в связи с непосредственным повреждением их коронавирусом, что, в свою очередь, приводит к распаду миелина. При хроническом ЛНМ энцефаломиелите обнаружено менее резкое изменение (за исключением цереброзидов с нормальными жирными кислотами) интенсивности метаболизма липидов. Эти данные, а также отсутствие изменений в содержании гликолипидов указывают на длительную относительную компенсированность процесса. Последнее, по-видимому, происхо-

дит за счет развития процесса ремиелинизации, что отчетливо прослеживается морфологически.

В заключение следует указать, что представленные нами результаты находятся в соответствии с данными о нарушении обмена липидов при других моделях демиелинизирующих поражений, что свидетельствует в пользу положения о едином неспецифическом механизме развития демиелинизации, независимо от природы патогенного фактора.

THE INTENSITY OF TOTAL LIPID, GALACTOCEREBROSIDE AND SULFOCERE ROSIDE METABOLISM IN THE BRAIN OF MICE WITH JHM-CORONAVIRUS INDUCED ACUTE AND CHRONIC ENCEPHALOMYELITIS

ANNANEPESOV Kh A., CHAYEVA L. S., KONOVALOV G. V., MAJOROVA L. P.

The Turkmenian State Medical Institute, Ashkhabad, USSR
*The Laboratory of Biochemistry of nervous system and metabolism, Leningrad State University, Leningrad, USSR
**The Institute of experimental medicine, the Academy of Medical Sciences of the USSR, Leningrad

The intensity of total lipid, galactocerebroside and sulfocerebroside metabolism in the brain of mice with acute and chronic encephalomyelitis induced by JHM-coronaviruses was studied.

It was shown the insignificant decrease of total lipid content (by 11,2%) in the brain of animals with acute encephalomyelitis. The specific radioactivity of total lipids in infected animals was lower than in control by 10 times. The incorporation of 2^{14}C-acetate in the cerebrosides with hydroxy and with normal fatty acids in the brain of damaged animals was decreased by 55,2% and 68,2%, respectively. It was also found the sharp decrease (by 64,4%) of label incorporation in the infected mice brain sulfocerebrosides.

Content of lipids and glycolipids did not change in the brain of mice with chronic encephalomyelitis. Nevertheless the incorporation of 2^{14}C-acetate in cerebrosides with normal fatty acids and sulfocerebrosides is decreased by 65 and 20%, respectively.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Cook S. D., Dowling P. C.* Neurology. 30. 7, part 2, p. 80—91, 1980.
2. *Коновалов Г. В., Майорова Л. П.* Журн. невропатол. и психиатрии, т. 12, с. 24—27, 1982.
3. *Майорова Л. П., Коновалов Г. В., Огурцов Р. П., Смородинцев А. С.* Вопр. вирусол., № 6, с. 1263—1269, 1986.
4. *Коновалов Г. В.* — В кн.: «Ультраструктурная патология нейровирусных инфекций», Наука, Новосибирск, с. 64—71, 1984.
5. *Аннанепесов Х. А., Левитина М. В., Сергиенко Е. В.* Бюл. эксперим. биол. и мед., № 1, с. 33—34, 1985.

6. *Caric-Lazar M., Schwarz R., Schaltisser Ch.* Eur. J. Biochem., v. 91, p. 151—161, 1978.
7. *Часа Л. С.* Вопр. мед. химии, т. 29, в. 6, с. 51—54, 1983.
8. *Закстельская Л. О., Шеболдов А. В* — Кн.: «Коронавирусы человека и животных», М., Медицина, с. 22—54, 1977.
9. *Klenk H. D.* — In: Biological membranes. L. Acad. Press, p. 145—183, 1973.
10. *Nagashima K., Wege H., V. ter Meulen.* — In: Myelination and demyelination. (ed. J. Palo) Plenum press, N. York, London, p. 395—409, 1978.
11. *Chao-Se-Wan.* Biochem. Soc. Trans., v. 8, p. 604—605. 1980.
12. *Аннанепесов Х. А., Горбуков Н. В., Тюрин В. А.* Докл. АН СССР, т. 234, № 5, с. 1242—1244, 1984.
13. *Weiner L. P., Johnson R. T., Herdon R. M.* Arch. Neurology, v. 28, p. 298—303, 1973.
14. *Saida T., Saida K., Sielberg D. H.* Acta Neuropath. (Berlin), 48, p. 19—25 1979.
15. *Таранова Н. П., Кацнельсон И. П.* Вопр. мед. химии, т. 22, № 1, с. 108—112, 1976.
16. *Таранова Н. П.* — Кн.: «Липиды центральной нервной системы при повреждающих воздействиях», Л., «Наука».

Поступила 13. VII. 1990

НЕЙРОХИМИЯ
т. 9, № 4, 1990

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 577.122.3

СОДЕРЖАНИЕ ПОЛИАМИНОВ В ГОЛОВНОМ МОЗГУ КРОЛИКОВ В ДИНАМИКЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЛЕГКОЙ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ

ВАСИЛЬЕВА И. Г., ЧОПИК Н. Г., КОПЬЕВ О. В., ВАСИЛЬЕВ А. Н.

Киевский научно-исследовательский институт нейрохирургии
Киевский государственный университет

Полиамины играют существенную роль в метаболизме клетки, что связано с их способностью модифицировать третичную структуру макромолекул, изменяя таким образом их функциональную активность [1—3]. В настоящее время установлено, что различные проявления клеточной активности сопровождаются изменением общего содержания и соотношения ди- и полиаминов—путресцина, спермидина и спермина [4, 5]. Флуктуации изменения содержания полиаминов сопровождают изменения ДНК-полимеразной, матричной активности, белоксинтезирующей способности клеток [4, 5]. Показано, что полиамины участвуют в адаптационных реакциях клеток на экстремальные воздействия [6—9].

Легкая черепно-мозговая травма, как установлено в последнее время [10], глубоко затрагивает процессы саморегуляции метаболизма нервной ткани, необратимо изменяя эффективность синаптической передачи и трансмембранных взаимодействий [11, 12], что в конечном итоге приводит к напряжению компенсаторных и адаптивных систем, а в ряде случаев к их срыву.

В этой связи изучение содержания полиаминов в ткани головного мозга в динамике экспериментальной легкой черепно-мозговой травмы (ЭЛ ЧМТ) как факторов, отражающих метаболическую активность клеток, влияющих на взаимодействие макромолекул, участвующих в синаптической передаче [13, 14], представляет значительный интерес.

Эксперимент проведен на 42 животных. Для стандартизации условий эксперимента в опыт брали кроликов-самцов породы серый великан массой 2—2,5 кг. Животных содержали на стандартном рационе вивария. Дозированную легкую черепно-мозговую травму наносили, как описано ранее [10].

Содержание путресцина, спермидина, спермина определяли методом ТСХ [15].

На рис. 1 представлены данные по определению содержания полиаминов в ткани полушарий головного мозга кроликов в динамике

ЭЛ ЧМТ. Как видно из представленных данных, в начальном посттравматическом периоде (15 мин, 2 ч) суммарное содержание полиаминов увеличивается по сравнению с контролем на 40%. К первым суткам после нанесения травмы суммарное содержание полиаминов возвращается к физиологической норме и в последующие сроки после травмы не отличается от значения, полученного в контроле. Анализ динамики содержания путресцина, спермидина и спермина, а также

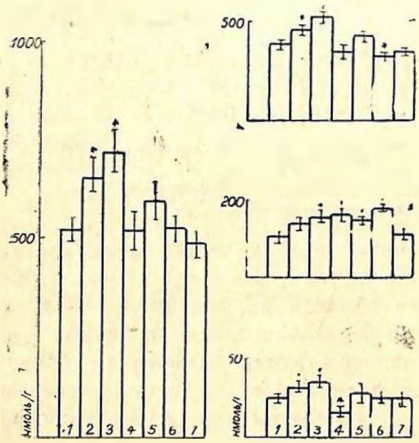


Рис. 1. Содержание полиаминов в ткани полушарий головного мозга кроликов в динамике ЭЛ ЧМТ: *а*—суммарное содержание полиаминов, *б*—содержание путресцина, *в*—содержание спермидина, *г*—содержание спермина. *1, 2, 3, 4, 5, 6, 7*—контроль, 15 мин, 2 ч, 1 сутки, 3 суток, 7 суток, 14 суток соответственно, $^*p<0,05$

их относительного содержания указывает на то, что в посттравматическом периоде происходит перераспределение их относительного содержания к первым суткам после травмы в сторону увеличения содержания спермидина; то же наблюдается и в последующие сроки (3, 7 суток). К 14 суткам после нанесения ЭЛ ЧМТ в полушариях головного мозга кроликов наблюдается восстановление как общего, так и относительного содержания (рис. 1, *а—г*).

Полученные данные позволяют предполагать, что в ткани полушарий в динамике ЭЛ ЧМТ не происходит глубоких изменений в биосинтезе макромолекул. Повышение общего содержания полиаминов в начальном периоде после травмы может быть вызвано развитием ишемии [8], а также реализацией сенсорного сигнала [13, 14], который сопровождает травму.

На рис. 2 представлены данные, полученные при исследовании содержания полиаминов в ткани диэнцефально-стволового отдела (ДСО) головного мозга кроликов в динамике ЭЛ ЧМТ. Полученные результаты свидетельствуют об иной по сравнению с полушариями динамике изменения суммарного содержания полиаминов в посттравматическом периоде. Повышение общего содержания полиаминов в начальном периоде (15 мин, 2 ч), по всей вероятности, объясняется теми же причинами, что и повышение содержания полиаминов в полушариях. В первые сутки после травмы наблюдается снижение об-

щего содержания полиаминов, в последующие сроки (7, 14 суток) происходит нарастание их суммарного содержания.

По иному в динамике травмы в ткани ДСО изменяется и содержание каждого из исследованных соединений (рис. 2, *а—г*). В полушариях через 3, 7 суток общее содержание полиаминов нормализуется, а относительное содержание перераспределяется в пользу увеличения содержания спермидина и спермина, что может расцениваться как отражение интенсификации биосинтеза макромолекул. В ткани ДСО в эти же сроки наблюдается снижение содержания спермидина в 6 раз, а спермина в 2 раза. Снижение содержания полиаминов, как

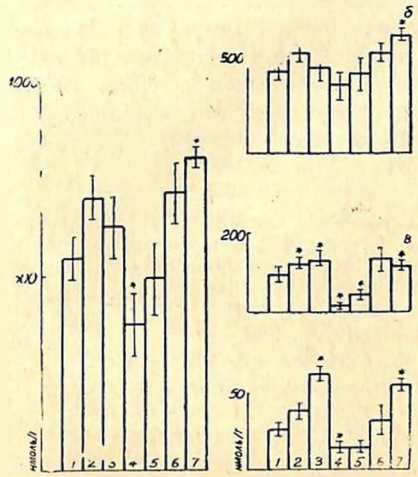


Рис. 2. Содержание полиаминов в ткани диэнцефально-стволового отдела головного мозга кроликов в динамике экспериментальной легкой черепно-мозговой травмы: *а*—содержание полиаминов, *б*—содержание путресцина, *в*—содержание спермидина, *г*—содержание спермина, *1, 2, 3, 4, 5, 6, 7*—контроль, 15 мин, 2 ч, 1 сутки, 3 суток, 7 суток 14 суток соответственно, $^*p<0,05$.

свидетельствуют данные литературы, сопровождается угнетением репликации ДНК и биосинтеза белка [2, 4]. Увеличение в отдаленные сроки после травмы (14 суток) в ткани ДСО суммарного содержания полиаминов может отражать интенсификацию биосинтеза макромолекул.

Таким образом, проведенные исследования позволяют сделать следующие заключения: динамика изменений содержания полиаминов в ткани полушарий и в ДСО головного мозга кроликов в посттравматическом периоде имеет отличия ,свидетельствующие о более глубоких изменениях в содержании полиаминов в ДСО мозга; в ткани ДСО обнаружена фаза угнетения биосинтеза полиаминов; в ткани ДСО мозга, в отличие от ткани полушарий, в отдаленные сроки после травмы наблюдается повышенное содержание полиаминов.

Полученные результаты являются экспериментальным подтверждением представлений о длительных посттравматических нарушениях функционирования систем саморегуляции метаболизма нервной ткани на уровне биосинтеза молекул регуляторов метаболической активности клеток.

POLYAMINE CONTENT OF THE RABBIT BRAIN AFTER MILD EXPERIMENTAL CEREBRAL TRAUMA

VASIL'EVA I. G., CHOPIK N. G., KOP'EV O. V., VASIL'EV A. N.

Research Institute of Neurosurgery, Kiev
Kieve State University

Diamine and polyamine content in cerebral hemispheres (CH) and diencephalic stem (DES) of rabbits with experimental mild cerebral trauma was studied. At day 14 after the trauma diamine and polyamine levels in CH showed no significant differences from the control values. At the same time, the content of diamines and polyamines in DES was 1,5 times higher than in the control animals. These results provide evidence that cerebral trauma affects mechanisms involved in neural tissue self-regulation at the level of synthesis of the molecules regulating cell metabolic activity. In this respect DES is more vulnerable to cerebral trauma than CH.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Купцов В. Ю., Слоницкий С. В.* Влияние полиаминов на объемные эффекты в молекуле двуспиральной ДНК. Симпозиум «Физико-химические свойства биополимеров в растворе и клетках», Пущино, с. 141, 1985.
2. *Abracham A.* Med. Biol., v. 59, № 5—6, p. 368—373, 1981.
3. *Гаркавенко О. С.* Вопросы онкологии, XXXI, № 7, с. 105—109, 1985.
4. *Teraoka H., Thukada K.* Biochem. and Biophis. Res. Commun., v. 95, № 5, p. 638—643, 1980.
5. *Mach M., Ebert P., Popp R., Qgilil A.* Biochem. and Biophis. Res Commun. v. 104, № 4, p. 1327—1334, 1982.
6. *Colomabatto S., Fasulo L., Grillo H.* Agents and actions, v. 21, № 3—4, p. 327—330, 1988.
7. *Elsabed Nabil D., Tierney Donald F. Hocker Allen D.* Appl. Physiol., v. 64, № 5, p. 2010—2016, 1988.
8. *Percheen W., Rohn G., Meese C. O.* Brain Res., v. 453, № 1—2, p. 9—16, 1988.
9. *Цветненко Е. З.* Нейрохимия, т. 4, № 1, с. 61—64, 1985.
10. *Ромоданов А. П., Тушевский В. Ф., Копьев О. В.* Вопр. нейрохирургии, № 1, с. 16—24, 1988.
11. *Пархомец В. П., Васильев А. Н.* Нейрохимия, т. 7, № 4, с. 635—637, 1988.
12. *Кучеренко С. Н., Остапченко Л. И., Васильев А. Н.* Нейрохимия, т. 7, № 1, с. 135—138, 1988.
13. *Kofnic H., Goldstone A. D., Lu C. L.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 89, p. 7210—7214, 1983.
14. *Senuber F., Hong H., Duagunes N.* Biochemistry, v. 22, p. 6134—6140, 1983.
15. *Ворончихина Л. Д., Демьянова В. Т.* Лаб. дело, № 7, с. 443—444, 1985.

Поступила 12. VII. 1990

НЕЙРОХИМИЯ
т. 9, № 4, 1990

УДК 577.35.352.26

ПАРАДОКСАЛЬНЫЙ ЭФФЕКТ N-ПАЛЬМИТОИЛЭТАНОЛАМИНА НА ТРАНСПОРТ КАТИОНОВ ЧЕРЕЗ БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ

МЕЛЬНИК А. А., БАЛКОВ Д. И., ВОЛКОВ Г. Л., ГОВСЕЕВА Н. Н., ГУЛАЯ Н. М.
Институт биохимии им. А. А. Палладина АН УССР, Киев

Исследование природных N-ацилэтаноламинов (NAE) началось в 50-е годы, когда они были обнаружены в ряде объектов растительного и животного происхождения. В частности, было показано наличие N-(2)-гидроксиэтилпальмитина в арахисовом масле [1], желтке яиц [2], лецитине сои [3]. Оказалось, что это соединение обладает высокой биологической активностью и способно влиять на интенсивность целого ряда воспалительных и иммунологических реакций, а также неспецифическую устойчивость к токсинам бактерий [4].

В последние годы, благодаря использованию высокочувствительных методов определения, NAE были обнаружены в различных тканях собак, крыс, морских свинок, рыб и др. [5—7]. Оказалось, что наибольшее их количество содержится в мозгу, наименьшее—в печени и лишь следовые количества—в мышцах исследованных животных [8]. Недавно NAE были обнаружены нами в клетках мышиной нейробластомы клона C1300 N18 [9]. Обнаружены и ферментативные системы биосинтеза и деградации NAE, максимальная активность которых выявляется в микросомах и митохондриях клеток мозга [10].

Длинноцепочечные NAE ингибируют увеличение проницаемости внутренней митохондриальной мембраны для Ca^{2+}, вызванное действием Ca^{2+} и Ca^{2+}-освобождающих агентов [11]. Кроме того, ранее в нашей лаборатории было показано, что длинноцепочечные NAE способны уменьшать выход одновалентных катионов из клеток мышиной нейробластомы [12].

В экспериментах использовали дифференцированные клетки мышиной нейробластомы клона C1300 N18. Дифференцировку индуцировали добавлением в культуральную среду 5′-бромдезоксиуридина в конечной концентрации $4 \cdot 10^{-5}$ моль/л.

Для определения входа одновалентных катионов в клетки нейробластомы под действием NAE, N-пальмитоилэтаноламин вносили во флаконы с клетками до конечной концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л и инкубировали в течение 30 мин при 37°. Среду сливали и во флаконы вносили по 5 мл среды ИГЛА, содержащей $4 \cdot 10^6$ имп/мин ^{86}Rb (14,6 ГБк/г $^{86}Rb^+$). Через фиксированные промежутки времени среду

сливали и флаконы трижды промывали 3 мл среды ИГЛА. Клетки лизировали 2 мл 10%-ного раствора NaOH и отбирали по 200 мкл аликвоты на счет. Уровень радиоактивности определяли на счетчике «Intertechnique SL—4000» (Франция). Белок определяли по методу Lowry и соавт. [13].

Липосомы получали из хроматографически чистого фосфатидилхолина из морских организмов и его смеси с N-пальмитоилэтаноламином (молярное соотношение 4 : 1) методом «обращенных фаз» [14] в буфере, содержащем 40 мМ трис-HCl, pH 7,4 и 100 мМ KCl. Внутренний объем полученных везикул определяли согласно Трикаш [15]. Полученное значение—10—12 мкл·мг липида—достаточно точно соответствовало цифрам, приводимым создателями метода.

При определении входа Ca^{2+} в липосомы, к суспензии везикул добавляли раствор ^{45}Ca (8,3 ТБк/моль) до конечной активности $15 \cdot 10^6$ имп/мин на 100 мкл суспензии. Конечная концентрация липосом в суспензии составляла 20 мг липида/мл. Препарат термостатировали при 37°. Через фиксированные промежутки времени отбирали аликвоту липосом (100 мкл) и отделяли от экстравезикулярного [^{45}Ca] методом микроколоночной хроматографии на СМ сефадексе G-25 [16]. В полученном препарате липосом измеряли уровень включившейся радиоактивной метки на сцинтилляционном счетчике «Trac. DELTA 300» (США) в диоксановом сцинтилляторе ЖС-103.

Изучение механизма действия NAE было начато группой Schmid (США), которая установила, что NAE способны ингибировать Ca^{2+}-зависимую проницаемость внутренней митохондриальной мембраны. Оказалось, что инкубация митохондрий сердца собаки с длинноцепочечными NAE приводит к резкому уменьшению входа Ca^{2+}, если этот процесс индуцирован Ca^{2+} или Ca^{2+}-освобождающими агентами.

Кроме того, сотрудники нашей лаборатории обнаружили, что инкубация клеток нейробластомы клона C1300 N18 с NAE (14 : 0, 16 : 0, 18 : 0), предварительно обработанных активатором быстрых натриевых каналов—вератрином, приводит не только к полному устранению действия последнего на проницаемость клеточной мембраны, но и к ощутимому снижению «базальной» проницаемости мембраны для катионов.

При объяснении этих фактов и группой Shmid, и нами было высказано предположение, что NAE, кроме воздействия на ферментативные системы активного транспорта ионов, способны увеличивать плотность упаковки липидного бислоя клеточной (микросомной) мембраны, препятствуя таким образом току катионов. Принимая во внимание структурную формулу NAE, имеющих в своем составе насыщенные жирные кислоты, кажется логичным, что эти соединения должны способствовать упорядочению упаковки липидного бислоя биологических мембран.

Мы выражаем благодарность коллективу лаборатории сравнительной биохимии Института биологии моря ДВО АН СССР за любезно предоставленные N-ацилэтаноламины и высокоочищенный фосфатидилхолин.

Исходя из этого, мы рассчитывали, что вход Ca^{2+} в липосомы, содержащие NAE (16:0), будет меньше, чем в липосомы из чистого фосфатидилхолина. Однако из представленного на рис. 1 графика видно, что скорость включения [^{45}Ca] в липосомы с NAE (16:0) (кривая 2) была приблизительно в 1,5 раза выше по сравнению с контролем (кривая 1). Более того, исследования входа одновалентных катионов (Rb^{+}) в клетки нейробластомы дали результаты почти аналогичные полученным на липосомах. Данные по входу меченых катионов в клетки мышиной нейробластомы представлены на рис. 2, из которого видно, что при использовании NAE (16:0) концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л в среде инкубации наблюдается увеличение проницаемости мембраны клеток. Необходимо подчеркнуть, что в этом эксперименте при предварительной инкубации клеток нейробластомы с NAE в применяемой концентрации соотношение встроившегося в плазматическую мембрану NAE к фосфолипидам составляет 1:4, что приблизительно равно соотношению фосфатидилхолина и NAE в используемых нами липосомах.

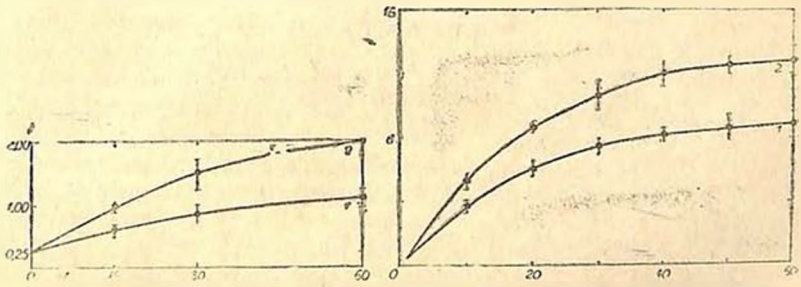


Рис. 1. Влияние N-пальмитоилэтаноламина (NAE 16:0) на вход [^{45}Ca] в фосфатидилхолиновые липосомы: *1*—вход [^{45}Ca] в фосфатидилхолиновые липосомы, *2*—вход [^{45}Ca] в фосфатидилхолиновые липосомы с NAE (16:0). По оси абсцисс—время в мин, по оси ординат—% накопления [^{45}Ca] в липосомах

Рис. 2. Влияние N-пальмитоилэтаноламина на вход рубидия-86 в клетки нейробластомы C1300N18: *1*—базальный вход, *2*—вход рубидия под действием NAE (16:0). По оси абсцисс—время в мин, по оси ординат—срт · 10^3/мг белка

Таким образом, наши ранние представления о NAE как о липиде, способном при встраивании в плазматическую мембрану увеличивать плотность упаковки липидного бислоя, оказались несколько упрощенными. По-видимому, вход одновалентных катионов в клетки нейробластомы, также как и проницаемость липосом для Ca^{2+}, определяется непосредственным воздействием NAE на липидный бислой мембраны. Причина же увеличения проницаемости мембраны в этом случае пока не ясна. Выход катионов из клеток нейробластомы под действием NAE имеет, вероятно, более сложную систему регуляции, связанную с ферментативной системой, липид-белковыми взаимодействиями и другими факторами.

THE EFFECT OF N-PALMITOYL ETHANOLAMINE ON TRANSPORT OF CATIONS THROUGH BIOLOGICAL MEMBRANES

MEL'NIK A. A., BALKOV D. I., VOLKOV G. L., GOVSEEVA N. N., GULAYA N. M.

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

We studied the effect of N-palmitoyl ethanolamine (NEA 16:0) on the permeability of liposome membranes for ^{45}Ca ions and the uptake of ^{86}Rb ions by neuroblastoma cells. We found that NEA (16:1) increases the permeability of liposome and neuroblasoma cell membranes for mono- and divalent cations. This effect appears to be due to the direct action of NEA (16:0) on the membrane lipid bilayer. The efflux of these cations from neuroblastoma cells is regulated by a more complex system involving enzymatic mechanisms and lipid-protein interactions.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Long D. A., Miles A. A.* Lancet, № 6603, p. 492—494, 1950.
2. *Long D. A., Martin A. J.* Lancet, № 6921, p. 464—466, 1956.
3. *Ganley O. H., Graessle O. E., Robinson H. N.* J. Lab. and Clin. Med., v. 51, № 5, p. 709—714, 1958.
4. *Ganley O. H., Robinson H. N.* Allergl. v. 30, № 5, p. 415—419, 1959.
5. *Epps D. E., Schmid P. C., Natarajan V., Schmid H. H. O.* BBRC, v. 90, № 2 p. 628—638, 1979.
6. *Epps D. E., Grupp J. L., Grupp G., Schartz A.* IRCS—Bioch. v. 11, № 10, p. 899—900, 1983.
7. *Natarajan V., Schmid P. C., Reddy P. V.* Biochim et biophys. acta, v. 835 № 3, p. 426—433, 1985.
8. *Bachur N. R., Masek K., Melmon K. L., Udenfiend S. J.* J. Biol. Chem., v. 240. № 3, p. 1019—1024, 1965.
9. *Гулая Н. М., Васьковский В. Е.* и др. Укр. биохим. журн., т. 60, № 5, с. 58—63, 1988.
10. *Natarajan V., Schmid H., Reddy P.* J. Neurochem., v. 6, p. 1613—1619, 1984.
11. *Epps D. E., Palmer J. W., Schmid H. H. O., Pfeiffer D. R.* J. Biol. Chem., v. 257, № 3, p. 1383—1391, 1982.
12. *Мельник А. А., Говсеева Н. Н., Волков Г. Л., Гулая Н. М.* Докл. АН УССР, № 5, с. 69—72, 1989.
13. *Lowry O. H., Rosebrough M. J., Farr A., Randall R. J.* J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
14. *Szoka E., Papahadjopoules O.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 79, № 9, p. 4194—4198, 1978.
15. *Трикаш И. О.* «Изучение взаимодействия α-латротоксина с липосомами», канд. дис., Киев, 1987.
16. *Лось Г. В., Стефанов А. В., Лишко В. К.* Укр. биохим. журн., т. 57, № 4, с. 3—10, 1985.

Поступила 26. III. 1990

НЕЙРОХИМИЯ
т. 9, № 4, 1990

УДК 577.352.5.612.822

ИНДУКЦИЯ Ca^{2+}-дсРНК СИНТЕЗА ИНТЕРФЕРОНА В МОЗГУ, ПОВЫШЕНИЕ АКТИВНОСТИ 2-5А-СИНТЕТАЗЫ, ПРОТЕИНКИНАЗЫ р67К

ЗАХАРЯН Р. А., ГЕВОРКЯН М. Г.
Институт экспериментальной биологии АН Армении, Ереван

Интерферон индуцирует в клетке появление активности двух дсРНК-зависимых ферментов pppA (2' p 5' A) синтетазы (2-5А-синтетаза) и специфической протеинкиназы (р67К), фосфорилирующей белок с M_r 67 кД в мышиных клетках и р72К, фосфорилирующей белок с M_r 72 кД в человеческих клетках [1, 2]. Титр интерферона в крови, индуцированного введением дсРНК, относительно быстро снижается за достаточно короткий период времени. Повышение же активности вышеуказанных ферментов, наблюдаемое в течение относительно долгого времени, свидетельствует о продолжающем специфическом воздействии индуцированного интерферона на те или иные ткани организма [3, 4]. Ca^{2+}-дсРНК впервые *in vivo* был применен нами как эффективный противовирусный препарат, в том числе и при ретровирусном поражении клеток костного мозга [5, 6]. Кальциевый препарат двуцепочечной РНК подавлял сорбцию вируса на плазматической мембране клетки и ингибировал активность фермента обратной ревертазы.

Ранее нами также было показано, что Ca^{2+}-соль дсРНК, полученной из плаценты человека, по сравнению с обычно используемой натриевой формой и с комплексом ДЭАЭ-декстран-дсРНК, индуцировала в мозгу достаточно высокий титр интерферона, по-видимому, проникая в мозг через ГЭБ [7]. Одновременно было также показано, что Ca^{2+}-дсРНК на порядок выше связывается с клетками костного мозга, HeLa, чем натриевая соль и обнаруживается в ядрах практически всех обработанных клеток.

В настоящем исследовании были изучены характер образования эндогенного интерферона, активность ферментов 2-5А-синтетазы, р67К киназы в мозгу мышей при внутрибрюшинном введении различных дсРНК в форме комплекса с Ca^{2+}.

Выбор мозга в качестве исследуемого органа определился его потенциальной возможностью служить органом-мишенью при малиг-

низации, а также вирусной инфекции, включая инфекцию вирусом СПИД.

Ca^{2+}-соль дсРНК получали по описанному ранее методу [8].

Для определения активности 2-5А-синтетазы мозг мышей гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера при 0° в буфере, содержащем: 10 мМ HEPES pH 7,6; 10 Мм KCl; 2 мМ Mg $(CH_3COO)_2$; 7 мМ 2-меркаптоэтанол, апротинин 100 ед/мл.

Таблица

Уровень активности 2-5А-синтетазы (НМ АМР/мг/ч) и p67K-протеинкиназы (ФМ PO_4/мг/ч) в мозгу

Исследуемые ферменты	Контроль	Ca^{2+}-дсРНК		Na-дсРНК	Интерферон
		через 24 ч	через 96 ч		
2-5А синтетаза	39,2±1,6	88,6±6,5	51±5,7	45,1±5,2	49,2±5,6
p67 протеинкиназа	121±25	478±58	24[illegible]±29	193±17	189±25

Гомогенат оставляли при 4° 15 мин, добавляли NP40 до 0,5%, облучали ультразвуком 10 с и центрифугировали 5000 g 20 мин. Экстракт хранили при—70°. К 200 мкл экстракта (от 1 мг ткани) добавляли 400 мкл буфера: 20 мМ HEPES pH 7,6; 50 мМ KCl, 25 мМ магний ацетат; 7 мМ 2-меркаптоэтанол, 5 мМ АТР, 10 мМ креатинфосфат, 0,16 мг/мл креатинкиназы; 0,1 мг/мл поли (И)·поли (Ц) и 5 мкл [^{3}H]АТР (0,4 мк Кю/мл). Смесь инкубировали при 30° 90 мин, реакцию останавливали нагреванием в течение 5 мин при 90°. Синтезированный [^{3}H] 2-5А очищали на ДЭАЭ целлюлозе и просчитывали на сцинтилляционном радиосчетчике SL-30 («Intertechnique», Франция).

Активность 2-5А-синтетазы выражали в единицах нмоль 2-5А, синтезированного в течение 1 ч на мг ткани.

Активность дсРНК-зависимой протеинкиназы p67K определяли в экстракте из мозга мышей после частичной очистки фермента на поли (И)·поли (Ц)-сефарозе в присутствии гепарина (100 ед/мл) по методу, описанному Hovanessian и соавт. [9].

В опытах использовали мышей F-1 (гетерозиготы I поколения CBA и C57 BlaK), предварительно тестированных на отсутствие интерферона в крови и в мозгу. Препарат Ca^{2+}-дсРНК вводили внутрибрюшинно по 50 мкг/мышь.

Для тестирования исследуемых образцов на присутствие интерферона использовали трансформированную перевиваемую культуру мышиных клеток L-929. Титрование проводили микрометодом, с тест-вирусом, как описано ранее [10].

В качестве индукторов интерферона использовали отечественные препараты модифицированных дсРНК: рилостин, рифастин в форме Ca^{2+}-комплексов, а также Ca^{2+}-низкомолекулярную дсРНК, содержа-

щую до 50 пар оснований из дрожжей, полученную в нашем институте.

Стандартным препаратом служил маркер мышиного интерферона C002-904-511 с активностью 20000 МЕ/мл (Национальный Институт здоровья, США).

На рисунке представлена динамика накопления интерферона в мозгу и сыворотке крови мышей после введения им модифицирован-

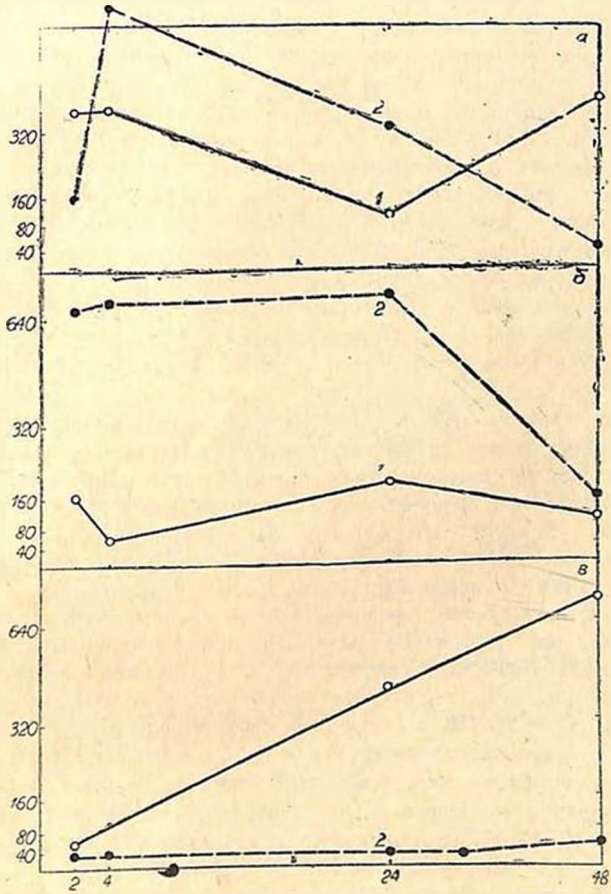


Рис. Динамика накопления интерферона в мозгу и сыворотке крови мышей после введения Ca^{2+}-дсРНК: 50 мкг/мышь Ca^{2+}-дсРНК (рифастин), 50 мкг/мышь Ca^{2+}-дсРНК (ридостин), 50 мкг/мышь Ca^{2+}-дсРНК (ИЭБ). По оси абсцисс—время после индукции, ч; по оси ординат—титры интерферона, *1*—мозг, *2*—кровь

ной дсРНК в форме Ca^{2+} комплекса. Динамика индукции интерферона не коррелирует с динамикой образования сывороточного интерферона, максимум интерферонообразования в мозговой ткани прихо-

дится на 1—2 сутки, в то время как пик сывороточного интерферона отмечается уже через 4 ч после индукции, и уровень его к 48 ч значительно снижается. Особый интерес представляет кривая интерферонообразования в мозгу после введения комплекса Ca^{2+}-низкомолекулярная дсРНК. Очевидно, что данный индуктор проникает в мозг, где стимулирует относительно автономный синтез интерферона, имеющий тенденцию к нарастанию через 48 ч на фоне незначительного уровня сывороточного интерферона. Как показали отдельно проведенные эксперименты, данная Ca^{2+}-дсРНК обладала на порядок большей противовирусной активностью при заражении мышей вирусом энцефаломиокардита мышей. С целью получения доказательств, свидетельствующих о специфическом воздействии индуцированного интерферона на мозговую ткань, мы изучили активность в мозговой ткани двух дсРНК-зависящих ферментов 2-5А-синтетазы и р67-киназы через 24 и 96 ч после внутрибрюшинного введения мышам комплекса Ca^{2+}-низкомолекулярная РНК.

Самкам мышей 2-месячного возраста вводили Ca^{2+}-дсРНК в дозе 50 мкг/мышь, в качестве контроля также использовали мышей, которым вводили интерферон (40000 ед/мышь или Na-дсРНК 50 мкг/мышь).

Как видно из таблицы, Ca^{2+}-дсРНК является достаточно эффективным индуктором ферментных систем, обеспечивающих противовирусную резистентность клетки. Активность последних в мозговой ткани обнаруживалась и через 96 ч после применения Ca^{2+}-дсРНК. Следует отметить, что активность исследуемых ферментов в присутствии индуктора была выше, чем при введении животным интерферона или дсРНК, особенно через 24 ч после введения препарата.

Ранее нами было показано, что активность фермента ревертазы в клетках костного мозга у мышей, инфицированных ретровирусом MULV и получивших препараты Ca^{2+}-дсРНК, ингибировалась на 75% и составляла 25% от активности фермента у мышей, не получавших препарат Ca^{2+}-дсРНК и имеющих явно выраженную спленомегалию; подавление активности ревертазы и сорбции вируса MULV на поверхностной мембране клеток-мишеней является одним из механизмов ингибирования процесса ретровирусной инфекции препаратом Ca^{2+}-дсРНК [7, 8], вызывающей целый комплекс биохимических изменений в плазматической мембране клетки [11, 12].

Полученные данные свидетельствуют, что Ca^{2+} форма дсРНК проникает через ГЭБ и индуцирует в мозгу синтез интерферона и активирует ферментные системы, обеспечивающие противовирусную резистентность.

INDUCTION OF INTERFERON AND ACTIVATION OF 2—5A-SYNTHETASE AND P67K KINASE IN THE BRAIN BY Ca^{2+}dsRNA

ZAKHARYAN R. A., GEVORGYAN M. G.

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

Ca^{2+}-double-stranded RNA passes the blood-brain barrier and induces in the brain the synthesis of interferon. It also activates two interferon-related enzymes, 2—5A-synthetase and p67k kinase which phosphorylates a 67 kDa protein.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Hovanessian A. G., Riviere Y.* Ann. de Virologie, v. 131, p. 501—516, 1980.
2. *Hovanessian A. G., Moure E., Montegnier L.* J. Interferon Research, v. 1, p. 179—180, 198 .
3. *Riviere Y., Hovanessian A. G.* Cancer Research, v. 4 , p. 4596—4599, 1983.
4. *Suron M. F., Riviere Y., Hovanessian A. G., Guillon I. C.* Virology, v. 117, p. 213—256, 98 .
5. *Рухкян Л. А., Захарян Р. А.* — В кн.: Лекарственные и биологически активные вещества в животновод. и ветеринар., с. 89—94, Ереван, 1986.
6. *Агабалян А. С., Рухкян Л. А., Захарян Р. А.* Докл. АН АрмССР, т. 88, № 2, с. 93—96, 1989.
7. *Бакунц К. А., Геворкян М. Г., Галстян Г. Г., Захарян Р. А.* Докл. АН АрмССР, т. 1, с. 36—41, 1988.
8. *Захарян Р. А., Агабалян А. С., Месропян Н. А.* Экспериментальная онкология, т. 7, № 3, с. 54—56, 1985.
9. *Hovanessian A. G., Riviere Y., Krust B.* Ann. Biochem., v. 129, p. 349—356, 1983.
10. *Cambell J., Gan.* J. Microbiol., v. 21, p. 1247—1253, 975.
11. *Ruchkian L. A., Zakharian R. A.* IV International Congress of Cell Biology Montreal, Abstr. p. 5, 1, 6, 1988.
12. *Карагезян К. Г., Захарян Р. А., Овакимян С. С.* Биол. журн. Армении, т. 40, № 12, с. 979—985, 1987.

Поступила 17. VIII. 1990

6—171

НЕЙРОХИМИЯ
т. 9, № 4, 1990

ОБЗОРЫ

УДК 577.112+547.917:612.782

ЛЕКТИНЫ МОЗГА: ХАРАКТЕРИСТИКА, ФУНКЦИИ, РЕЦЕПТОРЫ

ЛЕПЕХИН Е. А., ДОЛЖЕНКО М. И., БЕРЕЗИН В. А.
Днепропетровский государственный университет

В обзоре обобщены имеющиеся к настоящему времени данные об углеводсвязывающих белках мозга и их эндогенных рецепторах. Подробно рассмотрены свойства, а также клеточная и субклеточная локализация лектинов и их возможных рецепторов в онтогенезе. Проанализированы выдвинутые различными авторами предположения о возможной роли углеводсвязывающих белков в процессах передачи информации через клеточные мембраны и в процессах формирования и функционирования тканей и клеточных органелл. Выдвинуты предположения об уровне специфичности при взаимодействии лектин—рецептор и причинах отсутствия органо- и тканеспецифичности лектинов. Определены наиболее важные, по мнению авторов, направления изучения лектинов мозга и их рецепторов.

Важная роль олигосахаридных цепей гликоконъюгатов клетки и внеклеточного матрикса в процессах биологического и молекулярного узнавания в организме привлекает внимание исследователей не только с точки зрения строения и биологической значимости тех или иных последовательностей углеводов, но и с точки зрения механизмов передачи сигналов и/или информации путем углевод-белкового взаимодействия.

Способность клетки синтезировать целое семейство белков, где каждый вариант характеризуется различающимися между собой ковалентно присоединенными олигосахаридами и может обладать уникальными биологическими особенностями [1], предполагает наличие и широкого спектра рецепторов, узнающих эти углеводные последовательности.

К настоящему времени существует несколько различающихся между собой определений этого класса белков [2—5], однако одно из них, данное в работе Barondes, представляется нам наиболее общим и приемлемым: «Лектины—белки, способные связывать углеводы и не являющиеся ферментами или антителами». Столь широкое определение, по мнению автора, дает возможность сфокусировать внимание на эволюции лектинов и их адаптации к разнообразным функциям в биологических системах [2].

Лектины были обнаружены в конце прошлого века в экстрактах из растений по их способности агглютинировать эритроциты и до конца 50-х годов считались присутствующими только у растительных организмов. Однако в 60-е годы началось подробное изучение лектинов, обнаруженных в слизевиках, микроорганизмах и беспозвоночных животных, а в середине 70-х годов были обнаружены β-галактозидспецифичные лектины в экстрактах из различных тканей млекопитающих [6]. К настоящему времени достаточно подробно изучены наличие лектинов в организме позвоночных животных [7], а также множественность форм и зависимая от стадии развития организма экспрессия лектинов в тканях [8]. Проведена классификация лектинов млекопитающих на основе их антигенности [9] и первичной структуры [10].

Было обнаружено, что лектины позвоночных представлены двумя большими группами—растворимыми лектинами, не требующими для солюбилизации применения детергентов и мембраносвязанными, извлекаемыми только в присутствии детергентов [8, 11]. Различия в локализации этих лектинов предполагает и фундаментальные отличия их функций в организме [12]. Эти группы лектинов характеризуются высокой степенью гомологии внутри группы и отсутствующей гомологией между растворимыми и связанными лектинами [8—10, 13].

Вопрос о функции лектинов в клетках позвоночных животных до сих пор остается одним из самых неясных и интересных. Данные, полученные к настоящему времени, позволяют выдвинуть обоснованные предположения об участии лектинов в эндоцитозе и внутриклеточном перемещении гликопротеинов; регуляции миграции и адгезии клеток [7], клиренсе гликопротеидов в крови и удалении старых и десиализированных эритроцитов из системы кровообращения [13]. Наблюдаемые характеристические изменения экспрессии лектинов, совпадающие с различными физиологическими и патологическими изменениями [13] и наличие регулируемого во времени развития организма клеточного распределения некоторых лектинов, которое координируется по времени с экспрессией комплементарных углеводных структур [8, 12], позволяет предположить участие лектинов в процессах дифференцировки и формирования органов и тканей.

Было обнаружено, что лектины животных могут иметь второй тип связывающих центров, которые взаимодействуют с неуглеводными лигандами. Для 7 углеводсвязывающих белков было показано наличие таких центров, связывающих клеточные поверхностные рецепторы, эластин, инсулиноподобный фактор роста II или фосфолипиды [2, 8]. Это позволило выдвинуть гипотезу о том, что регулирующая рост система может быть основана на углевод-белковых взаимодействиях, и рецептор инсулиноподобного фактора роста может быть би- или мультифункциональным белком, имеющим как центры связывания фактора роста, так и зависимые от них центры связывания углеводов [14, 15].

Несмотря на значительный объем полученной за последние годы информации о лектинах позвоночных и значительное количество ги-

потез об их участии в различных процессах, многие вопросы их функционирования в отдельных органах и тканях остаются неясными. В полной мере это касается и лектинов мозга. Участие углеводсвязывающих белков в развитии и функционировании ЦНС подтверждается экспрессией гликоконъюгатов, содержащих различные терминальные остатки углеводов [16—18], высокой активностью процессов гликозилирования в мозгу [19], появлением и исчезновением различных форм миелинассоциированного гликопротеина в зависимости от стадии развития мозга [20] и предполагаемой общей ролью остатков N-ацетилгалактозамина в синаптогенезе [21].

Первые данные о присутствии лектинов в экстрактах из мозга позвоночных (эмбрион цыпленка) были опубликованы в 1977 г. [22], а сообщение о выделении этого лектина вышло в свет годом позже. Выделенный лектин солюбилизировался в присутствии 2-меркаптоэтанола и хорошо связывался с производными β-галактозы [23].

Первое сообщение о лектинах мозга млекопитающих также относится к 1977 г. Исследователями была обнаружена зависимая от стадии развития гемагглютинирующая активность экстракта из мозга крыс разного возраста [24].

В последующие годы изучение лектинов мозга интенсивно развивалось и к настоящему времени накоплены данные о наличии в мозгу нескольких типов углеводсвязывающих белков, различающихся как по углеводной специфичности, так и по пространственной локализации в развивающемся и взрослом мозгу. В табл. 1 представлены краткие сведения об известных к настоящему времени лектинах мозга. Наиболее подробно изучены 2 группы лектинов: так называемые «растворимые» β-галактозидспецифичные и маннозоспецифичные.

«Растворимые» β-галактозидспецифичные лектины

Лектины этой группы были выделены из мозга эмбриона цыпленка, а также взрослых крыс, быка и человека. Они характеризуются высокой степенью сходства между собой по физико-химическим свойствам и углеводной специфичности [23, 25, 28]. Свойства очищенных лектинов приведены в табл. 2.

Степень связывания простых сахаров с лектинами убывала в ряду тиодигалактозид > лактоза > галактоза. Лектины проявляли высокую термостабильность и их активность не зависела от присутствия ЭДТА, ионов двухвалентных металлов или 100 мМ маннозы, но исчезала при снижении температуры до 4°, увеличении ионной силы растворов более 0,2 М и в присутствии 25 мМ лактозы. Следует отметить, что при ИЭФ очищенных лектинов мозга не было обнаружено изоформ, тогда как аналогичные лектины других тканей характеризуются наличием от 3 до 9 изоформ, что, по-видимому, связано с наличием семейства генов, кодирующих эти белки [26].

Галактозидспецифичные лектины мозга обладают значительным

Таблица 1

Краткая характеристика лектинов мозга

Группа лектинов	Вид животного	Название лектина	Клеточная локализация	Субклеточная локализация	Углеводная специфичность	Термостабильность	Зависимость от металлов	M_r(кД)	Ссылки
Галактозоспецифичные	цыпленок	RBL—16	нейроны	аксоплазма, пост	тиогалактоза,	да	нет	33	[23]
	крыса	RB	астроциты	синаптические	лактоза,	да	нет	32	[25, 29]
	бык	HBL—14	периваскулярные клетки	утолщения, внеклеточный матрикс	галактоза	да	нет	30	[25, 36]
	человек					да	нет	—	[8]
	мышь		—	мембраны	лактоза	—	—	—	[34]
	крыса		—	мембраны	галактоза	—	—	—	[52]
	бык морская свинка человек	основной белок миелина	—	миелиновая оболочка	галактоза, глюкофорин, казеин	—	нет	—	[50]
	—	Mac-2	—	—	галактоза	—	—	—	[51]
	—	IE S	глия	—	гексозамины	—	—	—	[32]
Маннозоспецифичные	крыса	CSL	нейроны	лизосомы, цитозоль	манноза, маннозо-6-фосфат	нет	нет	1.00	[41]
	крыса	[illegible]	нейроны	плазматическая мембрана	глюкоза метилглюкоза	нет	нет	13	[42]
Сиалоспецифичные	крыса		—	мембраны синаптических везикул	сиаловые кислоты	нет	Ca^{2+}	—	[52]
Гепарин-связывающие	крыса мышь бык		—	цитозоль	гепарин, N-ацетилгалактозамин	—	нет	—	[53]

Примечание. * Данные отсутствуют.

сходством как между собой, так и с аналогичными лектинами других тканей. Так, лектин мозга человека имеет сильную перекрестную иммунореактивность с лектинами мозга крысы и быка, а также с аналогичными по углеводной специфичности лектинами яйцеклеток амфибий, легких крысы, легких и плаценты человека [9, 27—29], которые, в свою очередь, имеют значительную гомологию первичной последовательности [26, 30]. Все эти лектины проявляют сходные физико-химические свойства: отсутствие зависимости от Ca^{2+}, величину $M_r \approx 15$ кД, способность связывать невосстанавливающие остатки галактозы в β-конфигурации и отсутствие взаимодействия с N-ацетилгалактозамином. Последнее отличает эти лектины от углеводсвязывающих белков, обнаруженных в Купферовских клетках и имеющих сродство как к галактозе, так и к N-ацетилгалактозамину [31].

Таблица 2

Физико-химические свойства β-галактозсвязывающих лектинов мозга

Экстракт мозга	Название лектина	M_r (кД)		ИЭТ	Содержание лектина* %	Ссылки
		гель-фильтрация	ДДС—Na-электрофорез			
Цыпленок	—	33	13(15)	4,3		[23]
Крыса	RBL—16	32	16±0,5	3,9	0,23	[25]
Бык	BBL	30	15±0,5	[illegible],9	0,13	[2[illegible]]
Человек	HBL—14	—	14,5±0,5	3,9	0,024	[2[illegible]]

Примечание. * В % от общего количества растворимого белка экстракта.

Морфологическое и субклеточное распределение β-галактозидспецифичных лектинов отражает, по-видимому, особенности функционирования их в мозгу. Эта группа лектинов не является специфичной для какого-либо отдела мозга, хотя их содержание может различаться в зависимости от типа ткани—например, серого и белого вещества [28]. Галактозосвязывающие лектины мозга обнаруживаются как в эмбриональном, так и в постнатальном мозгу на различных стадиях развития [32—34], а также в культуре нервных клеток [27, 35].

Иммуноцитохимические методы выявления локализации показывают, что лектины находятся в волокнах зрелых нейронов, самих нейронах, астроглиальных и периваскулярных клетках и стенках кровеносных сосудов [27, 29, 36]. На субклеточном уровне лектины были обнаружены на внутренней стороне эндоцитозных пузырьков, на аксональных мембранах и в постсинаптической зоне [29], а также во внутриклеточных компартментах, дендритах и телах клеток Пуркинье [36].

Еще ранние исследования показали, что содержание лектинов в экстрактах из мозга зависит от стадии развития [22—24]; в дальнейшем были получены данные о том, что в онтогенезе существенно

меняется клеточная и субклеточная локализация этих лектинов [29, 36]. Было отмечено, что развитие клеток мозга связано со значительной вариацией уровня содержания внутриклеточного и поверхностного β-галактозидспецифичного лектина [34].

Параллельно с изменением содержания лектина происходит изменение экспрессии цитоплазматических и поверхностных гликоконъюгатов лактозной серии [27], что позволяет предполагать об их взаимодействии *in vivo*. О наличии эндогенных рецепторов лектинов свидетельствует и тот факт, что гликопептидная фракция из делипидизированного мозга связывалась с лектинами мозга в 150 раз более эффективно, чем самый эффективный из моносахаридов [32].

По-видимому, именно взаимодействие лектинов с эндогенными комплементарными структурами и определяет выполняемую лектинами физиологическую функцию, остающуюся до сих пор гипотетической и спорной. Из множества существующих гипотез и предположений наиболее обоснованной представляется гипотеза участия β-галактозидспецифичных лектинов в межклеточном узнавании и адгезии на ранних стадиях развития мозга (например, на стадии миграции нейронов). В подтверждение этой гипотезы было показано, что внутриклеточный уровень «растворимого» лектина и адгезивность клеток проявляют сходную зависимость от возраста и ингибируются одними и теми же сахаридами [34, 37]. Было высказано предположение, что «растворимый» лектин может секретироваться во внеклеточное пространство и образовывать мостики между отдельными нейробластами или растущими аксонами [29, 34, 36]. Высказанная гипотеза подтверждается также и эффектами, оказываемыми экстрактами мозга на культуру клеток нервной ткани. Экстракт, содержащий лектины, вызывает агрегацию клеток и стимулирует их рост, тогда как экстракт мозга, свободный от лектинов, проявляет только ростстимулирующее действие [35, 38, 39].

Многие исследователи предполагают участие β-галактозидспецифичных лектинов мозга в процессе синаптогенеза путем опосредования узнавания мест прикрепления аксонов [27, 29]. Наличие лектинов в постсинаптической зоне [36], эффект молекул экстрацеллюлярного матрикса (среди которых обнаружены и β-галактозидспецифичные лектины) на синаптогенез [21] и высокое содержание лектинов в субпопуляции сенсорных нейронов [27] служат подтверждением этого предположения. С другой стороны, отсутствие эффекта ингибитора этой группы лектинов—лактозы—на число образующихся синапсов [40] говорит, скорее всего, об отсутствии прямого участия лектинов в процессах синаптогенеза.

На основании данных внутриклеточной локализации лектинов было выдвинуто предположение о том, что лектин может быть вовлечен во внутриклеточный транспорт клеточных и внеклеточных составляющих [29]. Кроме того, некоторые исследователи допускают множественность функций лектинов в различных клетках в разное время [29].

В мозжечке крысы было показано наличие двух маннозоспецифичных лектинов—«растворимого» CSL и мембраносвязанного R1 [41, 42]. «Растворимый» лектин экстрагировался из ткани без применения детергентов, хотя и требовал присутствия 2-меркаптоэтанола. При гель-фильтрации в неденатурирующих условиях он имел M_r 1200 кД, тогда как величина M_r субъединиц составляла 31,5 и 33 кД. Это позволило авторам предположить, что молекула лектина существует в виде высокомолекулярного комплекса, который может включать в себя от 20 до 40 субъединиц. Субъединицы различались между собой присутствием дополнительно 14—19 аминокислотных остатков, из которых от 7 до 9 приходится на остаток глицина. При ДДС-Na-электрофорезе было выявлено наличие еще 2 минорных компонентов—с величиной M_r 45 и 90 кД, вероятно, предшественников субъединиц 31,5 и 33 кД.

Изучение свойств очищенного CSL показало, что он связывается с маннозой и маннозо-6-фосфатом, его агглютинирующая активность не зависит от присутствия ЭДТА или ионов двухвалентных металлов [41].

CSL обнаружен в основном в клетках Пуркинье, корзинчатых клетках и нейронах Гольджи, хотя содержится в меньших количествах и в других клетках [43]. На субклеточном уровне CSL локализован в лизосомах и цитозоле, хотя может быть и внеклеточным [41]; секреция внутриклеточного лектина происходит в процессе развития в премиграционной зоне и белом веществе [42].

Мембраносвязанный лектин R1 экстрагировался из ткани только в присутствии тритона X-100. При ДДС-Na-электрофорезе R1 выявлено 2 зоны с величиной M_r 65 и 130 кД. Предполагается, что молекулы с M_r 130 кД представляют собой димер. Анализ величины M_r методом гель-фильтрации дает значение, равное 130 кД [42].

Агглютинирующая активность R1 не зависела от ионов двухвалентных металлов, наиболее эффективные ингибиторы агглютинации—глюкоза и метил-глюкоза. В отличие от CSL, R1 не взаимодействовал с гликозаминогликанами [42]. По своим физико-химическим и иммунологическим свойствам лектин R1 был похож на рецептор маннозосодержащих гликопротеинов из синусоидальных клеток печени [42].

Следует отметить, что белки, сходные с маннозоспецифичными лектинами мозга, были обнаружены также в ретикулоэндотелиальных клетках крысы (рецептор циркулирующих маннозо-N-ацетилглюкозаминсодержащих гликопротеинов) [44], в печени [45] и седалищном нерве свиньи [46].

R1 был локализован во всех нейронах мозжечка крысы в разные периоды развития, исключая период между 13 и 20 днями постнатального развития. Этот лектин присутствовал также в лизосомах в теле и дендритах клеток Пуркинье [47], мультивезикулярных телах нейронов мозжечкового кортекса и эндотелиальных клетках ЦНС,

однако не был обнаружен в астроцитах глии [47, 48]. Было отмечено, что молекулы R1 могут быть экспрессированы как на обеих сторонах плазматической мембраны, так и лишь на наружной ее стороне [47].

R1 временно экспрессируется на поверхности дендритов клеток Пуркинье, контактируя с гликопротеинами параллельных волокон. После взаимодействия гликопротеинов с R1 в дальнейшем они деградируют [47, 48].

Сравнение свойств CSL и R1 показывает, что несмотря на одинаковую углеводную специфичность, они являются структурно различными молекулами. Оба лектина присутствуют не только в мозжечке, но и в переднем мозгу, хотя и взаимодействуют там с другими гликопротеинами [42].

Вопрос о функциях этих лектинов в мозжечке остается предметом споров и предположений. Вероятно, участие R1 во взаимодействии нейронов в параллельных волокнах и аксонов гранулярных клеток с их мишенями—дендритами клеток Пуркинье в период синаптогенеза [47]. Узнавание лектином специфических гликопротеинов может служить первой стадией формирования контактов [48]. Для CSL предполагается участие в процессах миграции нейробластов и миелинизации, так как он секретируется в период развития в премиграционной зоне и белом веществе [42]. Кроме того, CSL, как считают, ответствен за адгезию клеток как между собой, так и при взаимодействии клетка—субстрат в культуре клеток. Добавление антител к CSL в культуру нервных клеток полностью отделяет клетки от субстрата. Кроме того, при этом нарушается миелиновая оболочка клеток, что подтверждает участие лектинов в процессах миелинизации [49].

Другие лектины мозга

Кроме вышеупомянутых лектинов, в тканях мозга были обнаружены и другие лектины и лектиноподобные вещества, которые при внимательном изучении могут оказаться лектинами, отличными от уже известных. Так, например, имеющие свойства β-галактозидсвязывающих лектинов основной белок миелина [50], антиген Mac-2 [51], мембраноассоциированный белок фракции грубых синаптосомных мембран [52] и лектин мембранной фракции мозга мыши [34] могут оказаться как мембраносвязанными формами описанных галактозоспецифичных лектинов, так и новыми лектинами с иными свойствами. Это же касается и белка LETS, который способен агглютинировать бараньи эритроциты и связываться с гексозаминами [32].

Бесспорно, отличными от уже упоминавшихся лектинов следует считать обнаруженный в синаптических везикулах лектин со специфичностью к сиаловым кислотам и гепаринсвязывающий лектин растворимой фракции гомогената мозга.

Сиалоспецифичный мембраносвязанный лектин синаптических везикул был термолабильным, снижал свою активность в присутствии тритона X-100, Нонидета P-40 и ДОХ-Na и мог быть полностью солю-

билизирован только в присутствии ДДС-Na. Его агглютинирующая активность не зависела от ионов двухвалентных металлов, сильно ингибировалась в присутствии N-ацетилнейраминовой и N-гликолилнейраминовой кислот. Бычий муцин и фракция гликопептидов из мембран эритроцитов кролика (оба с высоким содержанием сиаловых кислот) также являлись ингибиторами, тогда как из всех исследованных других углеводов только N-ацетилманнозамин слабо ингибировал агглютинирующую активность лектина [52].

Предположения, высказанные авторами относительно физиологических функций этого лектина, касаются опосредования слияния везикул с клеточной мембраной, взаимодействия везикул с цитоскелетом и/или рециклизации везикул.

В экстрактах из мозга крыс были обнаружены растворимые лектины, связывающие N-ацетилгалактозамин и гепарин, которые, по мнению авторов, очень отличаются от β-галактозидспецифичных лектинов, выделенных из того же гомогената [52]. Эти лектины способны агглютинировать обработанные этанолом эритроциты, что характерно для гепаринсвязывающих лектинов, обнаруженных в других тканях [54]. Было высказано предположение о взаимосвязи между гепаринсвязывающими лектинами и фактором роста из нервной ткани, основывающееся на близости величин их M_r и сходстве методов выделения этих веществ на гепарин-агарозе [53]. Важно заметить, что возможное взаимодействие гепаринсвязывающих лектинов с различными гликозаминогликанами предполагает важную роль лектинов в организации внеклеточного матрикса и/или взаимодействие с ним нервных клеток.

Рецепторы лектинов

Понять в полной мере закономерности функционирования лектинов можно только тогда, когда они будут рассматриваться не как изолированная группа белков с экзотическими свойствами, а как часть сложной системы взаимодействующих молекул. Это выдвигает на первый план задачу изучения эндогенных рецепторов лектинов и количественных характеристик взаимодействия лектин—рецептор.

Изучение гликоконъюгатов срезов мозга методом гисто- и цитохимии показало, что в мозгу присутствуют многие углеводы, способные вступать во взаимодействие с экзогенными лектинами [55—57]. Главными сахаридными остатками являлись остатки α-D-маннозы/-α-D-глюкозы и α- и β-аномеров галактозы [58]. Кроме того, в мозгу была обнаружена высокая концентрация сиалированных галактозилгликопротеинов, сосуществующих с гликозаминогликанами [59]. Эти факты хорошо согласуются с углеводной специфичностью описанных выше лектинов мозга.

Попытки обнаружения потенциальных рецепторов мозга (в первую очередь гликопротеинов), предпринятые аффинными методами с использованием растительных лектинов показали, что целая серия

гликопротеинов мозга имеет терминальные сахаридные остатки, соответствующие углеводной специфичности эндогенных лектинов [57, 60]. Так, галактозусодержащие гликопротеины мозга насчитывают более 10 фракций по данным ДДС-Na-электрофореза [61, 62], а гликопротеинов с остатками маннозы/глюкозы—не менее 23 [60, 62, 63]; однако подробно охарактеризованы из них очень немногие [64]. Недавно обнаруженный в мозгу протеогликан, содержащий гепарин-сульфат, может являться рецептором гепаринсвязывающих лектинов [65].

Кроме гликопротеинов эндогенными рецепторами лектинов в клетке могут являться и другие гликоконъюгаты, в частности гликолипиды. Они могут взаимодействовать с лектиноподобными белками на поверхности клеток [66, 67]. Предполагается, что это взаимодействие оказывает влияние на процессы адгезии и участвует в узнавании нервных клеток [68].

Основной вопрос, возникающий при изучении эндогенных рецепторов в ткани мозга,—это вопрос о том, какие из обнаруженных гликоконъюгатов в действительности являются рецепторами и взаимодействуют с лектином *in vivo*. Уже отмечалось, что не все гликаны, содержащие соответствующие углеводные остатки, способны взаимодействовать с эндогенными лектинами [43]. Более того, строгая компартментализация молекул в клетке может препятствовать взаимодействию лектин—гликоконъюгат и поэтому при проведении подобных исследований необходимо придавать первостепенное значение доказательству взаимодействия лектина с его рецептором *in vivo*.

Заключение

Обобщая имеющиеся к настоящему времени данные об углеводсвязывающих белках мозга и их эндогенных рецепторах, можно сформулировать несколько выводов.

1. В тканях мозга одновременно присутствует несколько лектинов различной углеводной специфичности.

2. Лектины могут быть как «растворимыми», так и мембраносвязанными. Так называемые «растворимые» лектины, по-видимому, не являются цитозольными, они ассоциированы с какими-либо клеточными структурами, так как требуют для солюбилизации присутствия 2-меркаптоэтанола. Практически все лектины мозга находятся в связанном с комплементарными структурами состоянии, о чем свидетельствует необходимость присутствия углеводных гаптенов в средах гомогенизации при выделении лектинов.

3. В некоторых случаях в мозгу могут присутствовать одновременно как «растворимые», так и мембраносвязанные формы лектинов, обладающие сходной углеводной специфичностью. Несмотря на это сходство, лектины имеют различные свойства и структуру и, по-видимому, связывают различные гликоконъюгаты.

4. Экспрессия лектинов может регулироваться в течение онтоге-

неза; наличие и распределение лектинов зависят от стадии развития организма.

5. Лектины, обнаруженные в мозгу, не являются специфичными для каких-либо субклеточных структур, групп клеток или отделов мозга. Более того, они не проявляют ткане-, органо- или видоспецифичности. Так, β-галактозидспецифичные лектины позвоночных очень сходны по структуре и свойствам независимо от источника выделения.

6. В мозгу присутствуют эндогенные рецепторы лектинов, причем изменения в характере экспрессии лектинов и их рецепторов в процессе онтогенеза могут отражать специализацию внутри этих обширных групп молекул в соответствии с выполняемой в настоящий момент функцией.

7. Функции лектинов, по-видимому, обуславливаются взаимодействием их с эндогенными рецепторами и могут быть связаны как с передачей информации, так и с прямым участием в метаболических процессах.

Недостаточность наших знаний о лектинах не позволяет воссоздать более или менее цельную картину функционирования этой группы белков. Многие явления предстоит еще подробно изучать с тем, чтобы дать ответы в первую очередь на вопросы о месте и роли лектинов в жизнедеятельности организма в целом и ЦНС в частности. Так, высокая гомологичность β-галактозидспецифичных лектинов в различных тканях и даже видах животных, далеко отстоящих друг от друга в филогенетическом отношении, может свидетельствовать либо о выполнении лектинами какой-либо консервативной функции, присущей многим (если не всем) позвоночным, либо о том, что специфичность взаимодействия лектин—рецептор обуславливается наличием в клетке того или иного рецептора. В этом случае выполняемая лектином функция будет определяться экспрессией комплементарного лиганда, обуславливающего высокую специфичность и направленность взаимодействия. Подобная схема может лежать в основе функционирования всех углеводсвязывающих белков (лектинов) не только животных, но и других живых организмов.

Для создания цельной картины функционирования лектинов в мозгу млекопитающих предстоит еще накопить значительный объем информации. В этом отношении наиболее перспективными нам представляются следующие направления изучения лектинов мозга:

а) установление наличия лектинов с различной углеводной специфичностью в отделах мозга (в том числе лектинов, чья активность зависит от присутствия ионов кальция—наличие таких лектинов продемонстрировано для других тканей животных [69]);

б) изучение локализации лектинов в норме и при патологии (а также в онтогенезе); локализация и ориентация лектинов на мембранах и других клеточных структурах, например, цитоскелете;

в) изучение эндогенных рецепторов лектинов—не только гликопротеинов, но и других гликоконъюгатов;

г) изучение взаимодействия лектин—рецептор *in vitro* и *in vivo*.

Нам представляется, что дальнейшие исследования в этих направлениях будут способствовать развитию и расширению наших представлений о лектинах и их роли в жизнедеятельности организма.

THE BRAIN LECTINS: CHARACTERISTIC, FUNCTIONS, RECEPTORS

LEPEKHIN E. A., DOLJENKO M. I., BEREZIN V. A.

Dnepropetrovsk State University

The modern data about carbohydrate-binding brain proteins and their endogenious receptor are summarized in present report. The properties and cellular and subcellular localization of lectins as well, as that of their probable receptors during ontogenesis have been cosidered in detail. The hypotheses suggested by various authors concerning the possible role of the carbohydrate-binding proteins in the processes of information transmission through cellular membranes and in the processes of the formation and functionation of tissue and cell organelles have been analyzed.

The suggestions are brought about the level of specificity at the lectin-receptor interaction and about the reasons of absence of the lecins organ—and tissue specificity. The most importand (by authors opinion) directions of the investigation of brain lectins and their receptors are specified.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Rademacher T. W., Parekh R. B., Dwek R. A.* Ann. Rev. Biochem., v. 57, p. 785—838, 1988.
2. *Baronbes S.* Trends Biochem. Sci., v. 13, p. 480—482, 1988.
3. *Franz H., Ziska P., Mohr J.* Acta hystochem., v. 71, p. 19—21, 1982.
4. *Goldstein I. J., Huges C. R., Monsigny M., Osawa T., Sharon N.* Nature (London), v. 285, p. 66, 1980.
5. *Kocourek J., Horejsi V.*—In: Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry. Walter de Gruyter, Berlin, v. 3, p. 3—6, 1983.
6. *Sharon N.*—In: Glycoconjugate research, v. 1, p. 459—91, New York, Acad. Press, 1979.
7. *Lis H., Sharon N.* Ann. Rev. Biochem., v. 55, p. 35—67, 1986.
8. *Barondes S. H., Gitt M. A., Leffler H., Cooper N. W.* Biochemie, v. 70, p. 1627—1632, 1988.
9. *Hirabayashi J., Oda Y., Oohara T., Yamagata T., Kasai K.* Biochim. et biophys. acta, v. 916, p. 321—327, 1987.
10. *Leffler H., Masiarz F. R., Barondes S. H.* Biochemistry, v. 23, p. 9222—9229, 1989.
11. *Ashwell G., Harfold J.* Ann. Rev. Biochem., v. 51, p. 531—554, 1982.
12. *Barondes S. H.* Science, v. 223, N 4642, p. 1259—1264, 1984.
13. *Sharon N., Lis H.* Science, v. 246, p. 227—234, 1989.
14. *Feizi T., Childs R. A.* Nature (London), v. 329, p. 678, 1987.

15. *Frizi T.* Biochem Soc. Trans., v. 16, p. 930—934, 1988.
16. *Di Benedetto C., Corsi P., Gennarini G., Vielo F.* In: Multidisciplinary Approach to Brain Development, v. 9, p. 57—6 ; Amsterdam, Elsevier, 1980.
17. *Fatchi M. J., Gerhart T. G., Myers T. G., Drewes L. R.* Brain Res., v. 415, p. 30—39, 1987.
18. *Estruch R., Damjanov I.* Arch. Pathol. Lab. Med., v. 110, p. 780—785, 1986.
19. *Bhat N. R., Waechter C. J.* J. Neurochem., v. 5, p. 375—381, 1988.
20. *Campagnoni A. T.* J. Neurochem., v. 17, p. 1—4, 1988.
21. *Sanes J. R.* Ann. Rev. Neurosci., v. 12, p. 491—516, 1989.
22. *Kobiler D., Barondes S. H.* Dev. Biol., v. 60, p. 326—330, 1977.
23. *Kobiler D., Beyer E. C., Barondes S. H.* Dev. Biol., v. 61, p. 255—272, 1978.
24. *Simpson D. L., Thorne D. R.* Nature (London), v. 266, N 5600, p. 367—369, 1977.
25. *Caron M., Joubert R., Bladier D.* Biochim. et biophys. acta, v. 925, p. 290—296, 1987.
26. *Gitt M. A., Barondes S. H.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 83, p. 7603—7607, 1986.
27. *Regan L. J., Dodd J., Barondes S. H., Jessell T. M.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 83, p. 2248—2252, 1986.
28. *Bladier D., Joubert R., Avellana-Adalid V., Kemmy J. L., Doinel C., Amouroux J., Caron M.* Arch. Biochem. Biophys., v. 269, p. 433—439, 1989.
29. *Joubert R., Küchler S., Zanetta J.—P., Bladier D., Avellana-Adalid V., Caron M., Doinel Ch., Vincendon G.* Dev. Neurosci., v. 11, p. 397—413, 1989.
30. *Paroutaud P., Levi G., Teichberg V. I., Strosberg A. D.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 84, p. 6345—6348, 1987.
31. *Roos P. H., Hartman H. J., Schlepper-Schäfer J., Kolb H., Kolb-Bachofen V.* Biochim. et biophys. acta, v. 847, p. 115—121, 1985.
32. *Simpson D. L., Thorne D., Loh H.* Life Science, v. 22, p. 727—748, 1978.
33. *Joubert R., Caron M., Deugnier M. A., Bisconte J. C.*—In: Marker Protein in Inflammation, (eds. J. Bienvenu, J. A. Grimand, C. Laurent), v. 3, p. 667—672 Berlin, Walter de Gruiter, 1986.
34. *Joubert R., Caron M., Bladier D.* Cell Mol. Biol., v. 34, p. 79—87, 1988
35. *Joubert R., Caron M., Deugnier M. A., Rioux F., Sensenbrenner M., Bisconte J. C.* Cell Mol. Biol., v. 31, p. 131—138, 1985.
36. *Küchler S., Joubert R., Avellana-Adalid V., Carom M., Bladier D., Vincendon G., Zanetta J.—P.* Dev. Neurosci., v. 11, p. 414—427, 1989.
37. *Joubert R., Caron M., Bladier D.* Dev. Brain Res., v. 35, p. 146—150, 1987.
38. *Joubert R., Caron M., Deugnier M. A., Bisconte J. C.*—In: Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry, (eds. T. C. Bog-Hansen, E. van Driessche), v. 5, p. 213—219, Berlin, Walter de Gruyter, 1986.
39. *Pettman B., Delaunoy J. P., Devilliers G., Sensenbrenner M.* Dev. Biol. v. 75, p. 278—287, 1980.
40. *Eisenbarth G. S., Ruffolo R. R., Walsh F. C.* Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 83, p. 1246—1252, 1978.
41. *Zanetta J. P., Meyer A., Küchler S., Vincendon G.* J. Neurochem., v. 49, p. 1250—1257, 1987.
42. *Marschal P., Reeber A., Neeser J.—R., Vincendon G., Zanetta J.—P.* Biochimie, v. 71, p. 645—653, 1989.
43. *Zanetta J.—P., Reeber A., Dontenwill M., Vincendon G.* J. Neurochem., v. 42, p. 334—339, 1984.
44. *Maynard Y., Baenziger J. U.* J. Biol. Chem., v. 257, p. 3788—3794, 1982.
45. *Zanetta J. P., Bingen A., Dontenwill-Kieffer M., Roeber A., Vincendon G.* Cell Mol. Biol., v. 33, p. 423—434, 1987.
46. *Gabius H. J., Kohuke B., Hellmann T.* J. Neurochem., v. 54, p. 334—345, 1988.
47. *Dontenwill M., Roussel G., Zanetta J. P.* Dev. Brain Res., v. 17, p. 245—252, 1985.

48. *Zanetta J. P., Dontenwill M., Reeber A., Vincendon G.* In: Glia-Neuronal Communication in Development and Regeneration (eds. H. Althaus, W. Seifert). p. 92—104, Berlin, Springer-Verlag, 1987.
49. *Küchler S., Fressinaud C., Sarliève L., Vincendon G., Zanetta J. P.* Dev. Neurosci., v. 10, p. 199—212, 1988.
50. *Ikeda K., Yamamoto T.* Brain Res., v. 329, p. 10—108, 1985.
51. *Cheragie B. J., Weiner N. J., Pillai S.* J. Exp. Med., v. 170, p. 1959—1972, 1989.
52. *Popoli M., Mengano A.* Neurochem. Res., v. 13, p. 63—67, 1988.
53. *Joubert R., Caron M., Vadier D.* Comp. Biochem. Physiol., v. 85B, p. 859—863, 1986.
54. *Ceri H., Kohler D., Barondes S. H.* J. Biol. Chem., v. 256, p. 390—394, 1981.
55. *Estrich R., Damjanov I.* Arch. Pathol. Lab. Med., v. 110, p. 730—735, 1986.
56. *Hart C. E., Wood J. G.* J. Comp. Neurol., v. 239, p. 155—162, 1985.
57. *Davidsson P., Karlsson B., Svennerholm L.* Brain Res., v. 412, p. 254—260, 1987.
58. *Fachi M. I., Gerhart D. Z., Myers T. G., Drewes L. R.* Brain Res., v. 415, p. 30—39, 1987.
59. *Brückner G., Müller L., Wolkwitz L., Samtleben R., Biesold D.* J. Hirnforsch., v. 26, p. 615—634, 1985.
60. *Webb M., Gallo V., Schneider A., Baas R.* Int. J. Dev. Neuroscience, v. 3, p. 199—208, 1985.
61. *Березин В. А., Руденко О. А. Бойко Н. И., Гайдар Л. Н., Лепехин Е. А.* Укр. биохим. журн, т. 60, № 6, с. 9—14, 1988.
62. *Berezin V. A., Shevchenko G. M., Rudenko O. A.* 10th Int. Lect'n Meeting, July 3—8, Prague, 1988.
63. *Березин В. А., Шевченко Г. М., Гайдар Л. Н., Зубань Т. И., Азаркина В. В.* Биохимия, т. 53, с. 1755—1763, 1988.
64. *Meeda N., Nukobe M., Nakahira K., Mikoshiba K.* J. Neurochem., v. 51, p. 1721—1730, 1988.
65. *Ripellino J. A., Margolis R. U.* J. Neurochem., v. 52, p. 807—812, 1989.
66. *Dreckamer K.* Biochem. Soc. Trans., v. 17, p. 13—15, 1989.

Поступила 12. VII. 1990

НЕЙРОХИМИЯ
т. 9, № 4, 1990

УДК 577.152.313.16

КАЛЬЦИНЕЙРИН МОЗГА И ГРУППА РОДСТВЕННЫХ ФОСФОПРОТЕИНФОСФАТАЗ ТИПА 2В

ПАРСАДАНЯН Г. К.

Институт биохимии им. Г. Х. Бунятяна АН Армении

В обзоре рассматриваются новейшие литературные данные о физико-химических свойствах, структуре и вне- и внутриклеточной регуляции Ca^{2+}-кальмодулинзависимых фосфопротеинфосфатаз. Особое внимание уделяется выделенной из нервной ткани форме фермента—кальцинейрину. Показана необходимость дальнейших исследований, посвященных нейроспецифическим субстратам кальцинейрина и изучению роли этого фермента в регуляции деятельности мозга.

В настоящее время обратимое фосфорилирование белков оценивается как основной путь управления внутриклеточными процессами в клетках эукариотов. Столь разнообразные процессы, как метаболизм, сокращение мышц, мембранный транспорт, секреция, транскрипция и трансляция генов, деление клеток, оплодотворение и даже память регулируются этим универсальным механизмом посттрансляционной модификации [1]. Фосфорилирование или дефосфорилирование сериновых, треониновых и тирозиновых остатков приводит к конформационным изменениям в регуляторных белках, модифицирующим их биологические свойства. Степень их фосфорилированности определяется соотношением соответствующих протеинкиназ (ПКаз) и фосфатаз. ПКазы управляются разными способами, но важнейшими регуляторами являются вторичные мессенджеры, аллостерические эффекторы и фосфорилирование [2]. Возникает два вопроса: сколько фосфатаз имеется в клетке и находятся ли они также под контролем вторичных мессенджеров.

Классификация фосфопротеинфосфатаз. Согласно существующим данным, субъединицы (СЕ) четырех фосфопротеинфосфатаз (ФПаз), присутствующих в цитозоле, отвечают за дефосфорилирование сериновых и треониновых остатков множества регуляторных белков [3—6]. Имеются и другие ФПазы, однако они либо локализованы в иных субклеточных образованиях, либо дефосфорилируют предпочтительно тирозиновые, а не сериновые и треониновые остатки [7, 8]. Указанные четыре цитоплазматические ФПазы, специфичные к сериновым и треониновым остаткам, были вначале подразделены на два класса—1 и 2, в зависимости от их способности дефосфорилировать β-или α-СЕ

киназы фосфорилазы и чувствительности к двум термостабильным белковым ингибиторам 1 и 2 (I-1 и I-2). Относящиеся к классу 2 три ФПазы (2А, 2В и 2С) отличаются друг от друга по строению субстратной специфичности и путям регуляции (табл. 1). ФПазы 1, 2А и 2С отличаются

Таблица 1

Характеристика отдельных фосфопротеинфосфатаз (ФПаз) [1]

Метод	ФПаза 1	ФПаза 2А	ФПаза 2В	ФПаза 2С
Предпочтительное дефосфорилирование α- или β-субъединицы киназы фосфорилазы	β-СЕ	α-СЕ	α-СЕ	α-СЕ
Ингибирование I-1 и I-2	да	нет	нет	нет
Абсолютная потребность в 2-валентных катионах	нет	нет	да (Ca^{2+})	да (Mg^{2+})
Стимулирование кальмодулином	нет	нет	да	нет
Ингибирование трифторперазином	нет	нет	да	нет
Ингибирование окадаевой кислотой	да	да	да (слабо)	очень низкая
Фосфорилаза фосфатазная активность	высокая	высокая	очень низкая	
Активность к гистону III, фосфорилированному ПКазой С	очень низкая	очень высокая		
Активность к казеину, фосфорилированному ПКазой А	очень низкая	высокая		
Эффект крайне основных белков на активность к фосфорилазе	ингибирование	активирование		
Действие гепарина на активность к фосфорилазе	ингибирование	нет эффекта или активирование		
Действие *p*-нитрофенола на активность к фосфорилазе	активирование	ингибирование		
Связывание с гепарин-сефарозой в 0, 1М NaCl	удерживание	не связывается		

широкой и перекрывающей субстратной специфичностью, отвечая практически за всю ФПазную активность в экстрактах мышц и печени относительно множества ферментов, регулирующих основные пути биодеградации и биосинтеза в этих тканях [9]. Однако и в других тканях, например в мозгу, эти ферменты присутствуют в высоких концентрациях, хотя соответствующие субстраты там отсутствуют. Полагают, поэтому, что функция указанных ФПаз может быть шире. Возможно, что они участвуют в регуляции уровня фосфорилированности белков, контролирующих синтез и высвобождение нейротрансмиттеров [3].

Установлено, что активность ФПазы 1 контролируется вторичными мессенджерами. Выше уже было указано, что она сильно ингибируется белком I-1. Однако I-1 должен при этом быть фосфорилирован cAMP-зависимой ПКазой [10]. Таким образом, ФПаза 1 ингибируется гормонами, вызывающими повышение уровня cAMP, например адреналином [1]. Допаминергические нейроны класса D_1 содержат большие количества изоформы I-1, называемой DARPP (ФП, регулируемый допамином и cAMP) [12]. Фосфорилирование DARPP происходит под

действием нейротрансмиттера допамина, по-видимому, путем ингибирования ФПазы I в этих нейронах.

В отличие от ФПаз I, 2А и 2С, ФПаза 2В имеет относительно более узкую субстратную специфичность и проявляет весьма слабую активность по отношению к регуляторным ферментам, контролирующим магистральные метаболические пути в мышцах и печени [5]. Фермент этот зависит от Ca^{2+} и стимулируется кальмодулином (КМ) [13]. Однако задолго до этого в скелетных мышцах была обнаружена активность фермента, дефосфорилирующего α-СЕ киназы фосфорилазы [14]. На этом этапе регуляция Ca^{2+} и КМ не была выявлена по следующим трем причинам. Во-первых, в 70-е годы считалось, что при выделении и определении активности ФПаз обязательно должны присутствовать ионы марганца, обеспечивающие максимальную активность и стабильность этих ферментов, а присутствие этих двухвалентных катионов препятствовало выявлению зависимости ФПазы 2В от Ca^{2+}. Во-вторых, препараты ФПазы 2В были в той или иной мере загрязнены ФПазой 2А, проявляющей свою активность в отсутствие двухвалентных катионов. В-третьих, как стало известно, субстрат, используемый для определения активности ФПазы 2В (киназа фосфорилазы), содержит КМ в виде одной из СЕ [3]. В присутствии этого субстрата не наблюдалось никакой стимуляции КМ, поскольку ФПаза 2В экстрагировала из киназы фосфорилазы значительное количество КМ, достаточное для ее максимального активирования. Лишь использование более подходящих субстратов, например I-1, позволило выявить стимулирование фермента КМ [13, 15].

После очистки до гомогенного состояния, достигнутого благодаря ПААГ ЭФ с ДДС-Na, Klee и соавт. [16] было обнаружено, что СЕ-состав ФПазы 2В совпадает с кальцинейрином—главным КМ-связывающим белком из мозга. Вскоре было доказано, что кальцинейрин является КМ-регулируемой ФПазой, обнаруживающей такую же субстратную специфичность, что и ФПаза 2В из скелетных мышц [13]. Для справки можно указать и другие наименования, предложенные разными авторами для этого белка: модуляторсвязывающий белок, CaM—BP_{80} и фосфатаза 2 [6].

Физические и химические свойства кальцинейрина. Наличие множественных форм ФПаз в нервной ткани показано нами еще в 1980 г. [17]. ФПаза 2В составляет 1% общего белка мозга, однако в периферических тканях она является лишь одним из ряда КМ-связывающих белков. В скелетных мышцах доля ее в общем растворимом белке не превышает 0,03% [1]. Мозговую форму фермента (кальцинейрин) легче было выделять в больших количествах, что способствовало более углубленному ее изучению. Физические и химические свойства и строение кальцинейрина уже описаны в нескольких обзорах [3, 16, 18, 19].

Кальцинейрин является гетеродимером, состоящим из большой СЕ, с M_r 61 кД и малой СЕ, с M_r 19 кД [3]. Принятие необходимых мер предосторожности, исключающих денатурирующие условия, вы-

сокую ионную силу, детергенты и длительную экспозицию к Са-хелирующим агентам, позволяет обнаружить обе СЕ в соотношении 1 : 1 на протяжении всех этапов очистки [20]. Хотя указанные СЕ и не диссоциируют в отсутствие двухвалентных катионов, реконструкция фермента из его изолированных СЕ происходит лишь в присутствии Ca^{2+} [21]. Бо́льшая СЕ (кальцинейрин А) является КМ-связываю-

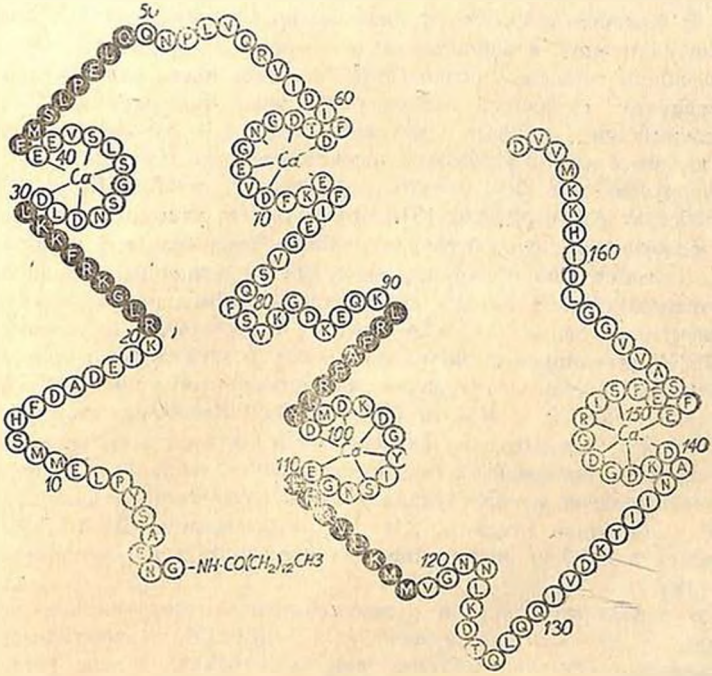


Рис. 1. Строение кальцинейрина В [3]: аминокислотная последовательность, определенная Aitken и созавт. [24], включает четыре Ca^{2+}-связывающие петли, формируемые предполагаемыми восьмичленными спиралями согласно модели «EF-крыльев» [25]; темные кружки указывают на положение спиралеобразующих остатков, в соответствии с рассчитанной Levitt, Greer [26] предполагаемой вторичной структурой белка

щим компонентом фермента [21, 22] и содержит каталитический участок [23]. СЕ с M_r 19 кД (кальцинейрин В) представляет из себя Ca^{2+}-связывающий компонент [19, 22, 24] и в ее аминокислотной последовательности выявлено наличие четырех Ca^{2+}-связывающих участков в форме «EF-крыльев» [25].

Аминокислотная последовательность, представленная на рис. 1 [3], указывает на высокую степень гомологии между кальцинейрином В и другими представителями семейства Ca^{2+}-связывающих белков с «EF-крыльями» на уровне четырех Ca^{2+}-связывающих петель. Участок аминокислотной цепи, соединяющий Ca^{2+}-связывающие уча-

стки II и III кальцинейрина В сходен с выявленными посредством рентгеноструктурного анализа участками двух других белков, КМ и тропонина-С, имеющих четыре домена для связывания Ca^{2+} [27, 28]. При рассмотрении N- и С-окончаний доменов II и IV и пептидов, соединяющих Ca^{2+}-связывающие домены I с II и III с IV отмечены заметные различия между этими белками [16]. Особенностью кальцинейрина В является способность глицильного остатка на его N-конце взаимодействовать с миристиловым спиртом, что свидетельствует о гидрофобном характере белка [29]. Эта особенность кальцинейрина В сближает его с группой белков, имеющих отношение к клеточной трансформации, включая каталитическую СЕ с АМР-зависимой ПКазы, цитохром-В5-редуктазу и некоторые структурные белки РНК-ретровирусов, например, p15 *gag*, его предшественник p65 *gag*, p60 *src*, его субстрат p36 и p21 *ras* [3]. Миристиловый участок, очевидно, играет особую роль, способствуя ассоциации этих белков с мембранами [30]. Кальцинейрин обнаруживается как во фракциях частиц, так и в цитозоле, и миристиловая группа, по-видимому, принимает участие в связывании белка с субклеточными структурами. Интересно, что В-СЕ КМ-регулируемых ФПаз из других тканей, будучи миристилированными, локализуются почти полностью в цитозоле [20]. Между кальцинейрином В и КМ отсутствует функциональная перекрестная реактивность. Кальмодулин не способен ни заменить кальцинейрин В при реконструировании фермента из отдельных СЕ А и В, ни ингибировать процесс реконструкции [19]. В свою очередь, кальцинейрин В не в состоянии заменить КМ при активировании ФДЭ сАМР или кальцинейрина А и не ингибирует стимуляцию этих двух ферментов КМ [16].

О первичном строении кальцинейрина А сведения чрезвычайно скудны. В этой СЕ сосредоточены все 8—9 остатков триптофана и 10 цистеиновых остатков, обнаруживаемых в кальцинейрине [31].

Другие представители семейства ФПазы 2В. КМ-регулируемые ФПазы, выделенные из скелетных мышц, тромбоцитов, плаценты, сердца и икры морского ежа, также состоят из двух СЕ с M_r, близкими к M_r кальцинейринов А и В [1]. А-СЕ ФПазы 2В, выделенная из скелетных мышц, мигрировала при ПААГ ЭФ с ДДС в виде дублета (61/58 кД) [32]. Однако иммуноблоттинг мышечных экстрактов позволил обнаружить лишь форму с M_r 61 кД [22]. Из этого следует, что полоса с M_r 58 кД образуется в ходе очистки, по-видимому, в результате протеолиза. Причина низкой величины M_r (55 кД), выявляемой при выделении А-СЕ из поджелудочной железы, может быть сходной (результат протеолиза), а невозможность обнаружения В-СЕ может быть связана со слабой интенсивностью прокрашивания этого компонента при анализе малых количеств ФПазы 2В [33]. ФПазу 2В идентифицировали во всех тканях млекопитающих, используя в качестве критериев зависимость от Ca^{2+}-КМ, чувствительность к трифторперазину [5] или иммуноблоттинг с антителами к кальцинней-

рину [1, 34]. В то время, как В-СЕ легко обнаруживается иммуноблоттингом, А-СЕ едва детектируется, что свидетельствует о возможности существования изоформ А-СЕ, плохо вступающих в перекрестную реакцию с антителами к ферменту мозга [20]. Этим можно объяснить результаты более раннего сообщения о слабой детектируемости данного белка в периферических тканях [35]. Консервативная природа В-СЕ способствовала детектированию белков близких по строению к ФПазе 2В у некоторых низших эвкариотов [20].

Из библиотеки сДНК мышей выделен клон сДНК, кодирующий С-терминальную половину каталитического домена А-СЕ ФПазы 2В [36]. Остатки I-III этого клона показали 32%-ную идентичность (51% гомологии) относительно остатков 189—300 ФПазы 1α и 35%-ную идентичность (45% гомологии) с остатками 189—294 ФПазы 2А. Соответствующий КМ-связывающий домен расположен между аминокислотными остатками 176 и 200 в клоне ФПазы 2В.

Эволюционные изменения в строении ФПаз. Использование техники рекомбинантной ДНК позволило в последнее время не только расшифровать первичную структуру четырех основных типов ФПаз, но и прийти к заключению, что гены, кодирующие ФПазы 1, 2А и 2В, относятся к одному семейству генов [37].

Сопоставление аминокислотной последовательности ФПаз 1, 2А и 2В позволило заключить, что участок, соответствующий последовательности остатков аминокислот 59—130 в ФПазе 1α включает в себя каталитический центр (рис. 2).

Эволюционно консервативные белки обычно выполняют ключевые клеточные функции. Благодаря клонированию соответствующих сДНК установлено, что вышеуказанные ФПазы относятся к числу наиболее древних [38]. Лишь несколько других белков, включая гистоны 3 и 4, и КМ характеризуются большей степенью консервативности (табл. 2). Причина этой консервативности может заключаться не только в незаменимости их функций, но и в том, что они взаимодействуют со многими белковыми субстратами и регуляторными белками, принимая участие во многих клеточных функциях.

В сДНК из мозга человека идентифицированы 2 гена, кодирующие α- и β-изоформы ФПазы 2В [39]. Клонирование сДНК также позволило установить, что по меньшей мере 2 изоформы (58 и 59 кД) могут генерироваться альтернативным сплайсингом β-гена [40]. В результате обнаруживаются изоформы, которые отличаются включением из 18 аминокислот у N-конца и имеют разные С-концы. Наибольшие количества мРНК, кодирующих ФПазы 2В-α и -β обнаружены в мозгу млекопитающих.

С целью выявления новых тканеспецифичных форм ФПаз недавно из генной библиотеки мозга был выделен клон сДНК, кодирующий белок, сходный более всего с ФПазой 2В, почему он и был обозначен как ФПаза $2B_w$. Обнаружена 55%-ная идентичность этого фермента (между остатками 170 и 505, исключая включения и делеции) с первичной структурой ФПазы 2В [37]. Полагают, что основной изофор-

Таблица 2

Сравнение степени эволюционирования консервативных белков [37]

Белок	*Единицы эволюционного периода
Гистон H4	400
Кальмодулин	350
Гистон H3	330
ФПаза 2А-α	100
ФПаза 1-α	88
ФПаза 2В-β	66
Гистон H2A	60
Глутаматдегидрогеназа	55
Тубулин	40
ПКаза А	39
α-СЕ белка G_i	32
К+-канал	22

Примечание. * За единицу эволюционного периода принимается время в млн. лет, необходимое для 1% изменения в аминокислотной последовательности между двумя рядами поколений. Таким образом, это величина, обратная скорости эволюции белка.

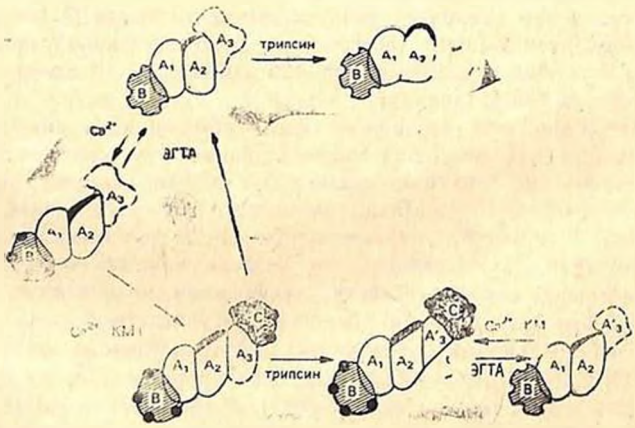


Рис. 2. Группа серин/треониновых фосфопротеинфосфатаз [37]: светлые участки обозначают каталитические домены, а числа в них—% идентичности с фосфопротеинфосфатазой I; каталитический домен фосфопротеинфосфатазы 2В содержит два малых включения из семи и шести остатков; степень идентичности между каталитическими доменами фосфопротеинфосфатаз 2А и 2В составляет 42%; сбоку указано количество аминокислотных остатков в каждом из белков; фосфопротеинфосфатаза2В-β (но не 2В-α) содержит необычный полипролиновый участок (Pro) у N-конца; кальмодулинсвязывающий домен локализован на дополнительном фрагменте цепи, прилегающем к С-концу. Там же имеется участок (I), участвующий в подавлении активности фермента в отсутствие Ca^{2+}-кальмодулина, а также участок (R), способный взаимодействовать с регуляторной субъединицей с M_r 19 кД

мой является ФПаза 2В, тогда как новая разновидность может быть ее минорным компонентом или отделяется от нее на одном из этапов очистки. Предстоит еще сравнить субстратную специфичность, а также нейрональную и тканевую локализацию этих двух форм ФПазы 2В.

Особенности строения кальцинейрина А. Как и многие другие КМ-регулируемые ферменты, кальцинейрин активируется при ограниченном протеолизе трипсином и химотрипсином [41]. Протеолиз специфично действовал на А-СЕ и приводил к отщеплению КМ-связывающего участка, более чувствительного к протеолитическому расщеплению, чем остальная часть молекулы. Протеолиз кальцинейрина предотвращался Ca^{2+} и КМ [42] и даже одним Ca^{2+} [43]. Эти ранние работы послужили основой создания общей модели, согласно которой КМ-связывающий домен кальцинейрина А (как и других КМ-регулируемых ферментов) должен оказывать ингибирующее влияние на каталитический центр. Функция КМ заключается в удалении этого домена, что приводит к активированию фермента [3]. При использовании более специфических протеиназ и высоких концентраций КМ имело место более избирательное протеолитическое расщепление, приводящее к образованию промежуточных продуктов с разным уровнем активности и различными регуляторными свойствами. Все это позволило лучше представить в настоящее время организацию функционального домена кальцинейрина и, помимо того, выделить КМ-связывающий участок [3]. В отсутствие КМ кальцинейрин А быстро превращался в полипептид с M_r 43 кД, который все еще был способен взаимодействовать с кальцинейрином В (не подвергающимся протеолизу), но утрачивал способность связываться и активироваться КМ. Активность этого деривата, измеренная в отсутствие Ca^{2+} и КМ, примерно совпадала с активностью нативного фермента в присутствии Ca^{2+} и КМ. Добавление Ca^{2+} без КМ стимулировало активность этих образцов в 3—4 раза, что значительно превышало активность нативного кальцинейрина в присутствии Ca^{2+}-КМ. Полагают, что такая стимуляция Ca^{2+} осуществляется путем связывания Ca^{2+} с кальцинейрином В. Ca^{2+} и КМ замедляют протеолитическое расщепление А-СЕ. При этом кальцинейрин В сохраняется интактным и продолжает оставаться связанным с гидролизованным кальцинейрином А. Первый интермедиат кальцинейрина А, образующийся при протеолизе, имеет M_r 57 кД и пока остается соединенным с КМ. Как и фрагмент с M_r 43 кД, форма с M_r 57 кД отличается высокой активностью в отсутствие Ca^{2+}-КМ и не стимулируется КМ. Однако в отличие от фрагмента с M_r 43 кД, эта форма кальцинейрина не активируется Ca^{2+} как в присутствии, так и в отсутствие КМ. Таким образом, удаление пептида с M_r 4 кД с конца молекулы повышает активность и устойчивость фермента к действию КМ, что свидетельствует об ингибиторном характере этого пептида. Следовательно, в нем и расположен ингибиторный домен, отличающийся от КМ-связывающего домена. Полагают, что КМ-связывающий домен, сохраненный в 57 кД-разновидности, но утраченный в 43 кД-деривате, предотвращает стимуляцию

Ca^{2+}, медиируемую кальцинейрином В и, тем самым, образует другой независимый ингибиторный домен [3]. Присоединение КМ к кальцинейрину усиливает чувствительность каталитического участка к протеолизу. Схематическое изображение способов активирования кальцинейрина КМ и ограниченным протеолизом представлено на рис. 3 [16]. Согласно этой модели, кальцинейрин А содержит, по меньшей мере, 4 функциональных домена.

1. КМ-связывающий участок, сохраняющий эту способность при выделении фермента. Этот чувствительный к протеиназам домен защищается при взаимодействии с КМ.

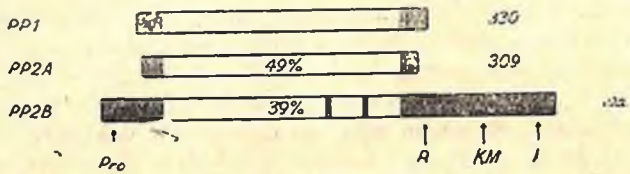


Рис. 3. Схематическое изображение активирования кальцинейрина Ca^{2+}, Ca^{2+}-кальмодулином и трипсином [16]: A_2, A_1 и A_3 обозначают каталитический, кальцинейрин В-связывающий и кальмодулинсвязывающий домены кальцинейрина А: В—кальцинейрин В: С—кальмодулин. Полукруги на субъединице представляют участок связывания Ca^{2+} в свободном состоянии, а темные кружки—участки, занятые лигандом. Каталитический участок кальцинейрина А указан черной полосой

2. Кальцинейрин В-связывающий домен, устойчивый к протеолизу, по-видимому, вследствие его защищенности кальцинейрином В.

3. Каталитический участок, чувствительность которого к протеолизу возрастает при взаимодействии фермента с КМ.

4. Ингибиторный домен, отличающийся от КМ-связывающего домена и особо чувствительный к протеолизу как в отсутствие, так и в присутствии КМ. Этот домен расположен некалеко от N- или С-концов белка.

В свою очередь, кальцинейрин В содержит четыре Ca^{2+}-связывающих участка. Как выяснилось в опытах с реконструкцией фермента из СЕ А и В, кальцинейрин В играет важную роль в стабилизации активной конформации КМ-регулируемой ФПазы [44]. Сочетание ингибиторного и стимуляторного доменов, скорее всего, является общей характерной чертой КМ-регулируемых ферментов.

Роль Ca^{2+} и кальмодулина в регуляции ФПазы 2В. ФПаза 2В из мозга связывает 1 моль КМ на моль фермента, проявляя весьма высокое сродство (K_d=0,1 нМ). КМ активирует фермент в 5—10 раз [1, 18]. Активирование это обратимо, не связано с диссоциацией А- и В-СЕ, но сопровождается конформационными изменениями [1]. Активирование происходит вследствие увеличения V при незначительном изменении величины K_m [18]. Процесс активирования включает связывание 2 ионов кальция с КМ, что, в свою очередь, создает возможность взаимодействия КМ с фосфатазой. Дополнительное связы-

вание ионов кальция приводит к активированию фермента. При длительной инкубации КМ способен также вызвать его дезактивирование. Такая потеря активности не восстанавливается после диссоциации КМ, однако кальцинейрин может реактивироваться добавлением Ca^{2+} в присутствии КМ. Стимулирование Ca^{2+} носит кооперативный характер, свидетельствуя о том, что для активирования требуется наличие более чем одного моля Ca^{2+}/моль фермента. Однако точное количество занимаемых Ca^{2+}-участков на В-СЕ или на КМ, необходимых для активирования или взаимодействия пока неизвестно [3]. Наличие Ca^{2+}-связывающих участков на двух компонентах очень затрудняет анализ стимулирующего действия Ca^{2+} на фермент.

Проявление активности ФПазы 2В из скелетных мышц полностью зависит от наличия Ca^{2+} как в присутствии, так и в отсутствие КМ, причем $A_{0,5}$ для этого катиона близко к 1 мкМ. В присутствии насыщающих концентраций КМ (0,03 мкМ) V возрастает примерно в 10 раз, не влияя на K_m к субстратам [13]. Как уже сообщалось выше, активирование ФПазы 2В осуществляется благодаря нейтрализации КМ ингибирующего эффекта 4 кД-домена А-СЕ, отличающегося от КМ-связывающего домена. Отщепление этого весьма чувствительного к протеолизу фрагмента приводит к потере способности Ca^{2+}-зависимого фермента стимулироваться КМ [1].

Ни один из других изученных Ca^{2+}-связывающих белков не способен заменить КМ или взаимодействовать с участком его связывания на кальцинейрине А. Так, тропонин С не связывает и не активирует кальцинейрин [3]. Ввиду высокого сродства к КМ кальцинейрин сам является сильным ингибитором КМ-стимулируемых реакций. Именно благодаря этому свойству он был впервые охарактеризован как ингибитор КМ-зависимой ФДЭ cAMP [45]. Позднее было обнаружено его ингибирующее воздействие на аденилатциклазу и киназу фосфорилазы [3].

Другие пути регуляции. Длительная инкубация ФПазы 2В с Ca^{2+}-КМ или субстратами дестабилизировала фермент, переводя его в форму, характеризующуюся очень низкой активностью даже в присутствии Ca^{2+}-КМ [13, 15, 46]. Фермент реактивировался переходными металлами, в частности Mn^{2+} [13, 15, 47] или Mg^{2+} в присутствии Ca^{2+} [3]. При умеренно щелочном pH кальцинейрин, аффинно очищенный на КМ-сефарозе, проявлял абсолютную зависимость от Mg^{2+} и восстанавливающих агентов для восстановления максимальной, Ca^{2+}-кальмодулинстимулируемой активности [3, 48]. Другие металлы также в известной степени активировали кальцинейрин [18]. Изолированная А-СЕ проявляла абсолютную зависимость от Mn^{2+} [23, 44]. Из этого можно заключить, что каталитическая СЕ имеет участок связывания для переходных металлов. В-СЕ не связывает Mn^{2+} [49]. В сырых экстрактах или в частично очищенном состоянии ФПаза 2В скелетных мышц [13, 15] и мозга [20] не нуждается в присутствии Mg^{2+} и не стимулируется Mn^{2+}. Можно предположить,

что экспонирование с Ca^{2+}-КМ вызывает высвобождение какого-то природного кофактора, вероятно иона металла, однако определенного экспериментального подтверждения эта гипотеза еще не нашла. Многие авторы указывают, что Ni^{2+} и Mn^{2+} стимулируют активность аффинно-очищенного кальцинейрина [18, 46, 47]. Эта Mn^{2+}-зависимая форма фермента слабо ингибируется трифторперазином. Имеются сообщения, что кальцинейрин содержит тесно связанные с ним металлы, идентифицированные как Fe и Zn [18], хотя неизвестно, к какой СЕ фермента это относится.

Поскольку в строении киназы фосфорилазы имеется ряд особенностей, сближающих ее с ФПазой 2В, представляло интерес выяснить, способна ли эта фосфатаза, как и вышеупомянутый фермент, активироваться универсальным механизмом фосфорилирования. Кальцинейрин, выделенный в условиях, не исключающих его частичного дефосфорилирования, содержал 0,2—0,6 моль щелочнолабильного фосфата на 1 моль фермента [3]. Сообщалось также, что А-СЕ может дефосфорилироваться стохиметрически *in vitro* ПКазой С [50]. Однако фосфорилирование не влияло на активность, измеренную в условиях насыщающих концентраций Ca^{2+} и КМ. Поэтому не наблюдалось существенных сдвигов ни в $A_{0,5}$, ни K_m или V.

ФПаза 2В может подвергаться и другим посттрансляционным модификациям. Миристилирование приводило к изменениям в активности и субклеточной локализации кальцинейрина В, однако эта модификация необратима, поэтому вряд ли может служить реальным регулятором фермента. Кальцинейрин А служит субстратом для карбоксиметилтрансфераз, способных метилировать до двух карбоксильных групп на 1 моль фермента. Хотя при этом и наступает потеря способности стимулироваться КМ [51], нельзя представить, что этот процесс является физиологически значимым механизмом регуляции ФПаз 2В. Попытки осуществить гликозилирование фермента потерпели неудачу [3]. Хотя ранее мы и привели примеры необратимого активирования кальцинейрина ограниченным протеолизом, невероятно, чтобы таким путем могла бы осуществляться регуляция фермента *in vivo*. Таким образом, единственным достоверно установленным механизмом регуляции активности кальцинейрина *in vivo* остается его взаимодействие с Ca^{2+} и КМ.

Тканевое распределение ФПазы 2В. Широкая распространенность КМ-зависимой ФПазы в тканях эвкариотов была обнаружена впервые Ingbritsen и соавт. [52], показавшими наличие высоких уровней Ca^{2+}-зависимой, трифторперазиночувствительной ФПазной активности в скелетных мышцах и мозгу, и несколько меньшую активность в сердце, печени и жировой ткани [19]. В отличие от этого, безуспешными оказались первые попытки идентифицировать мозговую форму фермента (кальцинейрин) в других тканях, включая скелетные мышцы, радиоиммунными методами, с использованием антител к кальцинейрину мозга быка [35]. Недавно, однако, использование Вестерн-блот-

тинга тканевых экстрактов с антителами к кальцинейрину из мозга быка дало возможность обнаружить наличие кальцинейринподобных белков в скелетных мышцах, сердце, печени, почках, селезенке, тимусе, гладких мышцах и легких быка [20], лимфоцитах свиней [53], плаценте [34] и сперме собак [50]. Использованный метод оказался пригодным лишь при выявлении В-СЕ. А-СЕ зачастую плохо идентифицировались, что позволило предположить о большей тканеспецифичности ее изоформ, плохо взаимодействующих с антителами на фермент мозга [20]. Консервативная природа кальцинейрина В позволила позднее выявить кальцинейриноподобные белки у низших эвкариотов, морского ежа и в икре лягушки [3].

Сравнение активности ФПазы 2В в разных тканях также сталкивается с определенными трудностями, связанными с быстрым гидролизом их тканевыми протеазами, переводящими фермент в Ca^{2+}-КМ-независимую форму, а затем и приводящими к его инактивации. Ничего не известно и о тканеспецифичных ингибиторах ФПазы 2В. Между тем, хотя в сырых экстрактах мозга и скелетных мышц выявляется примерно сходная активность этого фермента [3], вестерн-блоттинг свидетельствует примерно о 10—20-кратном превышении содержания этого белка в нервной ткани по сравнению со скелетной мышцей [20].

Кальцинейрин составляет около 1% от общего белка мозга и является одним из основных КМ- связывающих белков [20]. В периферических тканях содержание ферментного белка не превышает 0,03% от общей массы белка [19].

Субклеточное распределение ФПазы 2В. КМ-регулируемая ФПаза мозга, спермы, клеток простейших детектируется как в цитозоле, так и в субклеточных частицах [20, 54, 55]. Гранулярная форма, не солюбилизируется полностью неионными детергентами и может связываться не только с клеточными мембранами, но и с элементами цитоскелета [3]. В других тканях фермент оказался растворимым и полностью экстрагировался при высокой ионной силе в отсутствие детергентов [20]. Согласно данным иммуногистохимии, небольшие количества кальцинейрина связаны с постсинаптическими плотностями [56] и диффузно распределены в цитоплазме, преимущественно в постсинаптических локусах, плазматических мембранах и микротрубочках дендритов [57].

В целом господствует мнение, что КМ-зависимая ФПаза в ядре отсутствует [35, 58]. Что касается распределения кальцинейрина на клеточном уровне, он выявляется иммунохимически во всех регионах ЦНС, но распределен очень гетерогенно: наибольшее количество обнаружено в хвостатом теле и путамене [57]. Фермент специфически локализован в нейронах, хотя одни нейроны более богаты им, чем другие [59]. В палочках зрительного аппарата и радужной оболочке он локализован в фоторецепторах, а также биполярных и ганглиональных клетках [60]. Некоторые популяции клеток хвостатого ядра, некоторые пирамидальные клетки II—IV уровней неокортекса и пи-

рамидальные клетки субрегионов CA1—CA2 гиппокампа отличаются высоким содержанием кальцинейрина, тогда как клетки V уровня неокортекса, нейроны черной субстанции и бледного шара, а также клетки Пуркинье мозжечка, отличаются значительно более низкими концентрациями фермента. В клетках нервной ткани кальцинейрин распределен по всей цитоплазме (дендриты, аксоны, перикарион и аксональные окончания) [59].

Субстратная специфичность. В отличие от многих ФПаз, отличающихся широкой специфичностью в отношении к ФП, кальцинейрин проявляет высокую степень субстратной специфичности [3, 16, 18, 19]. К числу быстро дефосфорилирующихся субстратов кальцинейрина, известных к настоящему времени, относятся α-СЕ киназы фосфорилазы, I-1 ФПазы 1 и регуляторная СЕ cAMP-зависимой ПКазы типа II [16].

Как показано на табл. 3, большинство субстратов ФПазы 2B фосфорилируются cAMP или CMP. Другие субстраты, например, легкие цепи миозина, или субстратный белок cGMP-зависимой ПКазы (G-белок) дефосфорилируются гораздо слабее (0,1—0,5 мкмоль в

Таблица 3

Субстратная специфичность кальцинейрина [19]

Субстраты	$K_{киназа}$	V (пмоль в мин мг)	K_m (мкМ)
I—1	cAMP	2080	2,5
DARPP 32	cAMP	260	1,6
G-субстрат	cGMP	80	3,8
Б лок КГ	cAMP	320	3,0
α-СЕ киназы фосфорилазы	cAMP	1040	5,9
Регуляторная Е ПКазы II	cAMP	1000	5,0
cAMP-зависимая ФДЭ	cAMP		
Белки микротрубочек:			
MAP—2	cAMP	400—1700	21
Tau	или	630—2[illegible]	1,4—3,3
Основной б лок миелина	Ca^{2+}	392	8,0

мин/мг) [13, 31]. Кальцинейрин может дефосфорилировать также казеин, гистоны VS и IIa, а также модельные субстраты, как например, фосфотирозин и парапитрофенилфосфат [16]. Фосфотирозиновый остаток в белках считался плохим субстратом, однако в настоящее время появились сведения, что кальцинейрин способен дефосфорилировать некоторые ФП, фосфорилированные по тирозину [18].

В отличие от ФПаз 1, 2A и 2C, ФПаза 2B не дефосфорилирует в сколь-нибудь заметной мере ферменты, непосредственно участвующие в регуляции основных метаболических процессов, что говорит о ее сравнительно узкой специфичности *in vivo* [3]. Blumental и соавт. [61] обнаружили, что пептид, соответствующий 81—99 остаткам R-СЕ cAMP-зависимой ПКазы типа II, дефосфорилировался с K_m и V, характерными для интактного белка.

Хотя окончательные выводы о структурных параметрах субстрата, определяющих специфичность фермента пока не сформулированы, указывается, что важной структурной детерминантой субстратов КМ-

зависимых ФПаз может служить амфипатичная плоская β-конфигурация [16]. Каких-либо особенностей в аминокислотной последовательности в участке, где происходит гидролиз фосфорильного остатка серина установить не удалось. К числу обнаруженных потенциальных *in vivo* субстратов из нервной ткани относятся 63 кД-изофермент ФДЭ, DARPP, белок KF с M_r 18 кД, выделяемый из гранулярной фракции нервных клеток (функция неизвестна), и связанные с микротрубочками белки MAP-2 и Тау.

Физиологическая роль. Как уже было отмечено, в отличие от ФПаз с широким спектром действия, регулирующих ключевые ферменты углеводного и липидного обмена, ФПаза 2В характеризуется как фермент, дефосфорилирующий белки, регулирующие активность других ФПаз и ПКаз, например, ингибитор-1 и его изоформу DARPP, регуляторную СЕ ^AMP-зависимой ПКазы-II и α-СЕ киназы фосфо-

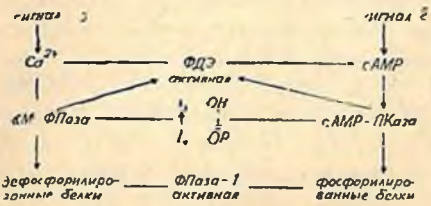


Рис. 4. Механизмы, по которым сигналы, поступающие через Ca^{2+}, способны ослаблять сигналы, поступающие через cAMP [2]. КМ-ФПаза—кальмодулинзависимая фосфопротеинфосфатаза 2В, I-1-OH и I-1-OP—дефосфорилированная и фосфорилированная формы ингибитора-I; cAMP-ПКаза—cAMP-зависимая протеинкиназа

рилазы [2]. В присутствии микромолярных концентраций Ca^{2+} ФПаза 2В эффективнее остальных фосфатаз гидролизует I-1 в скелетных мышцах [5]. Наступающее вследствие этого повышение активности ФПазы 1 приводит к подавлению активности фосфорилазы и, следовательно, снижает интенсивность гликогенолиза. В мозгу же DARPP-32 и G-белок, ингибирующие в фосфорилированном состоянии ФПазу 1, специфически локализованы соответственно в допаминоцептивных нейронах неостриатума и мозжечка, где наблюдаются особенно высокие уровни кальцинейрина [19]. Дефосфорилирование (и инактивирование) I-1 ФПазой 2В способствует повышению активности ФПазы 1, и если этот процесс действительно происходит *in vivo*, может оказаться, что Ca^{2+} этим путем участвует в регуляции ФПазы 1. Этот уникальный каскадный механизм, в котором одна ФПаза активирует другую (рис. 4), позволяет сигналам, поступающим через Ca^{2+}-систему, корректировать метаболические пути, находящиеся под контролем циклических нуклеотидов. Инактивируя I-1 и DARPP, кальцинейрин служит антагонистом cAMP-зависимой ПКазы, фосфорилирующей эти регуляторные белки [2]. Кроме того, дефос-

форилируя изоформы ФДЭ с M_r 60 и 63 кД, ФПаза 2В, способствует ослаблению внеклеточных сигналов, реализуемых через сАМР (рис. 3).

В настоящее время интенсивно исследуется роль ФПазы 2В в регуляции транспорта Ca^{2+} в нейронах. Дигидропиридинчувствительный Ca^{2+}-канал с M_r 160 кД фосфорилируется КМ-зависимой мультиПКазой и дефосфорилируется кальцинейрином [62]. Хотя обнаружено дефосфорилирование ряда белков сперматозоидов в присутствии КМ-зависимой ФПазы, вопрос об участии этого фермента в регуляции подвижности спермы остается пока еще открытым [3]. Имеются предварительные данные о том, что микроинъекции комплекса Ca^{2+}-КМ-кальцинейрин стимулируют экзоцитоз у Paramecium [55].

Особый интерес в последнее время вызывает тирозин-фосфотазная активность ФПазы 2В. К числу субстратов, дефосфорилирующихся по фосфотирозиновому остатку, относится урогастроновый рецептор эпидермального фактора роста [34] и фосфотирозинсодержащий фрагмент R-CE сАМР-зависимой ПКазы [63]. Однако эти опыты проведены *in vitro* с использованием очищенной на КМ-сефарозе Mn^{2+}-зависимой модифицированной ФПазы 2В.

Несмотря на объемлющие сведения о строении КМ-зависимой ФПазы и путях ее регуляции, физиологическая роль этого фермента пока еще мало изучена. Наиболее важные функции он должен, по-видимому, выполнять в мозгу, где концентрация его достигает 1%. Однако окончательных выводов нет в связи с отсутствием сведений об *in vivo* дефосфорилировании ряда субстратов кальцинейрина в ответ на сигналы, повышающие уровень внутриклеточного Ca^{2+}. Во многом неизвестна также физиологическая роль белков НС, дефосфорилирующихся этим ферментом или значение ковалентной модификации в регуляции их деятельности. Возможно, микроинъекция КМ-зависимой фосфатазы или ее антител в определенные клетки позволит проследить за физиологическим ответом и идентифицировать ФП, подвергающиеся при этом дефосфорилированию.

BRAIN CALCINEURIN AND A GROUP OF RELATED TYPE-2B PROTEIN PHOSPHATASES

PARSADANIAN H. K.

Institute of Biochemistry, Armenian Academy of Sciences, Yerevan

The newest literature data concerning the physico-chemical properties, structure and extra- and intracellular regulation of Ca^{2+}/calmodulin-dependendent protein phosphatase are considered. The special attention is paid to the neuronal form of the enzyme, calcineurin. The importance of the investigations devoted to the neurospecific substrates of calcineurin and the role of the enzyme in the regulation of brain function is emphasized.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Cohen P.* Ann. Rev. Biochem., v. 58, p. 453–508, 1989.
2. *Cohen P.* Proc. R. Soc. London, Ser. B, v. 234, p. 115–144, 1988.
3. *Klee C. B., Cohen P.*—In: Molecular Aspects of Cellular Regulation (ed. P. Cohen), p. 225–248. Elsevier, Amsterdam, New-York, Oxford, 1988.
4. *Cohen P.* Nature, v. 296, p. 613–620, 1982.
5. *Ingebritsen T. S., Cohen P.* Science, v. 221, p. 331–338, 1983.
6. *Merlevede W.*—In: Advances in Protein Phosphatases (ed. W. Merlevede, J. Di Salvo), v. 1, p. 1–18, Leuven University Press, Leuven, 1985.
7. *Bradford A. P., Yeaman S. J.*—In: Advances in Protein Phosphatases (eds. W. Merlevede, J. Di Salvo), v. 3, p. 73–106, Leuven University Press, Leuven, 1986.
8. *Foukes J. G.* Curr. Top. Microbiol. Immunol., v. 107, p. 163–180, 1983.
9. *Cohen P.* Eur. J. Biochem., v. 101, p. 439–448, 1985.
10. *Huang F. L., Glinsmann W. H.* Eur. J. Biochem., v. 70, p. 419–425, 1976.
11. *Foukes J. G., Cohen P.* Eur. J. Biochem., v. 97, p. 251–255, 1979.
12. *Hemmings H. C., Greengard P., Tung H. Y. L., Cohen P.* Nature, v. 310, p. 503–508, 1984.
13. *Stewart A. A., Ingebritsen T. S., Manalan A., Klee C. B., Cohen P.* FEBS Lett., v. 137, p. 80–84, 1982.
14. *Antoniw J. F., Cohen P.* Eur. J. Biochem., v. 68, p. 45–54, 1976.
15. *Stewart A. A., Ingebritsen T. S., Cohen P.* Eur. J. Biochem., v. 132, p. 289–295, 1983.
16. *Klee C. B., Manalan A. S., Krinks M. H.*— In: Calcium Regulation in Biological Systems (eds. S. Ebashi, M. Endo, K. Imahori, S. Kakiuchi, Y. Nishizuka), p. 29–39. Academic Press, Tokyo, 1984.
17. *Парсаданян Г. К., Тер-Татевосян Л. П., Бунятян Г. Х.* Докл. АН СССР, т. 257, с. 1258–1261, 1981.
18. *Martin B. L., Graves D. J.*—In: Advances in Protein Phosphatases (eds. W. Merlevede, J. Di Salvo), v. 4, p. 95–125, Leuven University Press, Leuven, 1987.
19. *Klee C. B., Krinks M. H., Manalan A. S., Draetta G. F., Newton D. L.*—In: Advances in Protein Phosphatases (eds. W. Merlevede, J. Di Salvo), v. 1, p. 135–146, 1985.
20. *Krinks M. H., Manalan A. S., Klee C. B.* Federat. Proc., v. 44, p. 707a, 1985.
21. *Sharma R. K., Desai R., Waisman D. M., Wang J. H.* J. Biol. Chem., v. 254, p. 4276–4280, 1979.
22. *Klee C. B., Crouch T. H., Krinks M. H.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 76, p. 6270–6273, 1979.
23. *Gupta R. C., Khandelwal R. L., Sulakhe P. V.* FEBS Lett., v. 190, p. 104–108, 1985.
24. *Aitken A., Klee C. B., Cohen P.* Eur. J. Biochem., v. 139, p. 663–671, 1984.
25. *Kretsinger R. H.* CRC, Crit. Rev. Biochem., v. 8, p. 119–174, 1980.
26. *Levitt M., Greer T.* J. Mol. Biol., v. 114, p. 181–193, 1977.
27. *Babu Y. S., Sack J. S., Greenhough T. J., Bugg C. E., Means A. R., Cook W. J.* Nature, v. 315, p. 37–40, 1985.
28. *Herzberg O., James M. N. A.* Nature, v. 313, p. 653–659, 1985.
29. *Aitken A., Cohen P., Santikarn S., Williams D. H., Calder A. G., Klee C. B.* FEBS Lett., v. 150, p. 314–318, 1982.
30. *Peliman D., Garber E. A., Gross F. R., Hanafusa H.* Nature, v. 314, p. 374–377, 1985.
31. *Klee C. B., Krinks M. H., Manalan A. S., Cohen P., Stewart A. A.* Methods, Enzymol. v. 102, p. 227–244, 1983.
32. *Stewart A. A., Ingebritsen T. S., Cohen P.* Eur. J. Biochem., v. 132, p. 289–295, 1983.

33. *Burnham D. B.* Biochem. J., v. 231, p. 335—341, 1985.
34. *Pallen C. J., Valentine K. A., Wang J. H., Hollenberg H. O.* Biochemistry, v. 24, p. 4727—4730, 1985.
35. *Wallace R. W., Tallant E. A., Cheung W. Y.* Biochemistry, v. 19, p. 1831—1837, 1980.
36. *Kincaid R., Nightingale M. S., Martin B. H.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 85, p. 8983—8987, 1985.
37. *Cohen P. T. W.* Genet. Human Nutr. (in press).
38. *Cohen P. T. W., Dombrádi V.*—In: Advances in Protein Phosphatases (eds. W. Merlevede, J. Di Salvo), v. 5, p. 447—463, Leuven University Press, Leuven, 1989.
39. *Kuno T., Takeda T., Harai M., Ito A., Mukai H., Tanaka C.* Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 165, p. 1352—1358, 1989.
40. *Gueurni D., Klee C. B.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 86, p. 9138—9187, 1989.
41. *Simonelli P. F., Li H. C.*—In: Advances in Protein Phosphatases (eds. W. Merlevede, J. Di Salvo), v. 1, p. 175—190, 1985.
42. *Manalan A. S., Klee C. B.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 80, p. 4291—4295, 1983.
43. *Tallant E. A., Cheung W. Y.* Biochemistry, v. 22, p. 973—979, 1983.
44. *Merat D. L., Hu Z. Y., Carter T. C., Cheung W. Y.* J. Biol. Chem., v. 260, p. 11053—11059, 1985.
45. *Klee C. B., Krinks M. H.* Biochemistry, v. 17, p. 120—126, 1978.
46. *Pallen C. J., Wang J. H.* J. Biol. Chem., v. 259, p. 6134—6141, 1984.
47. *Li H. C., Chan W. S.* Eur. J. Biochem., v. 144, p. 447—452, 1984.
48. *Tallant E. A., Cheung W. Y.* Arch. Biochem. Biophys., v. 232, p. 269—279, 1984.
49. *Pallen C. J., Wang J. H.* J. Biol. Chem., v. 261, p. 16115—16120, 1985.
50. *Tung H. Y. L.* Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 138, p. 783—788, 1986.
51. *Billingsley M. L., Kincaid R. L., Lovenberg W.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 82, p. 5612—5616, 1985.
52. *Ingebritsen T. S., Stewart A. A., Cohen P.* Eur. J. Biochem., v. 132, p. 297—307, 1983.
53. *Chantler P. D.* J. Cell. Biol., v. 101, p. 207—216, 1985.
54. *Tash J. S., Klee C. B., Means R. L., Tran A., Krinks M. H., Means A. R.* J. Cell. Biol. (in press).
55. *Momayezi M., Lumpert C. J., Kersken H., Gras U., Plattner H., Krinks M. N., Klee C. B.* J. Cell. Biol., v. 105, p. 181—189, 1987.
56. *Carlin R. K., Grab D. J., Siekevitz P.* J. Cell. Biol., v. 89, p. 449—455, 1981.
57. *Wood J. G., Wallace R. W., Whitaker J. N., Cheung W. Y.* J. Cell. Biol., v. 84, p. 66—76, 1980.
58. *Klumpp S., Steiner A. S., Schultz J. E.* Eur. J. Cell. Biol., v. 164, p. 164—770, 1983.
59. *Solimena M., Klee C. B., Krinks M. H., DeCamilli P.*—In: Abs. II Europen Congress on Cell Biology, Budapest, Hungary, 1986.
60. *Cooper N. F. G., McLaughlin B. J., Tallant E. A., Cheung W. Y.* J. Cell. Biol., v. 101, p. 1212—1218, 1986.
61. *Blumenthal D. K., Takio K., Hansen R. S., Krebs E. G.* J. Biol. Chem., v. 261, p. 814—8145, 1986.
62. *Hosey M. M., Borsotto M., Lazdunski M.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 83, p. 3733—3737, 1986.
63. *Chan C. P., Gallis B., Blumenthal D. K., Pallen C. J., Wang J. H., Krebs E. G.* J. Biol. Chem., v. 261, 9890—9895, 1986.

Поступила 20. XII. 1990

СОДЕРЖАНИЕ

Манухин Б. Н., Кичикулова Т. П., Московкин Г. Н. Влияние фосфолипазы A_2 на связывание м-холино- и β-адреноблокаторов синаптосомами мозга крыс 409

Розенгарт Е. В., Шестакова Н. Н. Конформационные аспекты взаимодействия аммониевых и сульфониевых субстратов с ацетилхолинэстеразой нервной ткани 417

Туршян Г. Н., Акопян Г. Е., Сафразян С. С., Априкян Г. В. Взаимосвязь активности γ-глутамилтрансферазы и транспортной системы возбуждающих нейромедиаторных аминокислот 427

Турянина Н. М., Пащенко А. Е., Ростока Л. М., Маргитич В. М., Федорович Т. М., Горзов И. П., Бобик Ю. Ю., Побережник М. В. Влияние трийодтиронина и йодированного масла на тиреоидную и аминокислотную обеспеченность головного мозга у морских свинок 432

Габриелян С. К., Сраппонян Р. М., Абелян Ж. Г., Саакян С. А. Саакян Ф. М., Галоян А. А. Определение содержания нейроспецифического белок-гормонального комплекса в организме крысы с экспериментальным инфарктом миокарда 438

Закарян Т. Р., Бархударян Н. А., Шувалова Л. А., Островская М. В., Шарова Н. П., Галоян А. А. Регуляция сокращения гладкой мускулатуры пептидными факторами гипоталамуса 444

Галоян А. А., Бобрускин И. Д. Гурвиц Б. Я. Абрамян Г. Э. Ca^{2+}-независимая регуляция активности кальмодулинзависимой фосфодиэстеразы из мозга быка С-модулинами 450

Таранова И. П., Пильщ Н. С., Воронина З. А., Неробкова Л. Н., Маркина Н. В. Влияние 2-этил-6-метил-оксипиридина на состояние перекисного окисления липидов головного мозга и его нейрофизиологические эффекты при нарушении сна 460

Аннаниесов Х. Н., Чогов Л. С., Коновалов Г. В., Майорова Л. П. Интенсивность метаболизма общих липидов, галактоцереброзидов и сульфоцереброзидов головного мозга при остром и хроническом ЛНМ коронавирусном энцефаломиелите у мышей 468

Краткие сообщения

Васильева И. Г., Чопик Н. Г., Котьев О. В., Васильев А. Н. Содержание полиаминов в головном мозгу кроликов в динамике экспериментальной легкой черепно-мозговой травмы 475

Мельник А. А., Балков Д. И., Волков Г. Л., Говсеева Н. Н., Гулая Н. М. Парадоксальный эффект N-пальмитоилэтаноламина на транспорт катионов через биологические мембраны 479

Захарян Р. А., Геворкян М. Г. Индукция Ca^{2+}-дсРНК синтеза интерферона в мозгу, повышение активности 2-5А-синтетазы, протеинкиназы p67K . 483

Обзоры

Лепехин Е. А., Долженко М. И., Березин В. А. Лектины мозга: характеристика, функции, рецепторы 488

Парсаданян Г. К. Кальцинейрин мозга и группа родственных фосфопротеин-фосфатаз типа 2В 502

CONTENTS

Manukhin B. N., Kichikulova T. P., Moskovkin G. N. The effect of phospholipase A_2 on m-cholino- and beta- adrenoblocker binding by rat brain synaptosomes 409

Rozengart E. V., Shestakova N. N. Conformational aspects of interaction between ammonium and sulfonium substrates and nerve tissue acetylcholine esterase 417

Turshian G. A., Hakopian G. E., Safrazian S. S., Aprikian G. V. Relationship between γ-glutamyltransferase activity and the transportation system of the exitatory amino acid neurotransmitters 427

Turyanitsa I. M., Pashchenko A. E., Rostoka L. M., Margitich V. M., Fedorotich T. M., Gorzov I. P., Bobik Y. Y., Poberejnik M. V. The effect of triiodothyronine and iodinated oil on the thyroid and amino acid providing of guinea-pig brain 432

Gabrielian S. K., Srapionian R. M., Abelian Zh. G., Sahakian S. A., Saakian F. M., Galoyan A. A. Determination of the content of neurospecific protein-hormonal complex in organism of rats with the experimental myocardial infarction 438

Zakharyan T. R., Barkhoudaryan H. A., Shustalova L. A., Ostrovskaya M. V., Sharova N. P., Galoyan A. A. Regulation of smooth muckle constriction by hypothalamic peptide factors 444

Galoyan A. A., Bobruskin I. D., Gurvits B. Ya., Abrahamyan G. E. Calcium-independent modulation of bovine brain calmodulin-sensitive phosphodiesterase activity by C-modulins 450

Taranova N. P., Nilova N. S., Voronina T. A., Nerobkova L. N., Markina N. V. The effect 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine on lipid peroxidation in brain and its neurophysiological effects under rem-sleep deprivation . 460

Annanepesov Kh. A., Chayeva L. S., Konovalov G. G., Mayorova L. P. The intensity of total lipid, galactocerebroside and sulfocerebroside metabolism in the brain of mice with JHM-coronavirus induced acute and chronic encephalomyelitis 468

Short communications

Vasil'eva I. G., Chopik N. G., Kop'ev O. V., Vasil'ev A. N. Polyamine content of the rabbit brain after mild experimental cerebral trauma . . . 475

Mel'nik A. A., Balkov D. I., Volkov G. L., Gorseeva N. N., Guiaya N. M. The effect of N-palmitoyal ethanolamine on transport of cations through biological membranes 479

Zakharyan R. A., Gevorgyan M. G. Induction of interferon and activation of 2—5A-synthetase and P67K kinase in the brain by Ca^{2+}-ds RNA 487

Reviews

Lepekhin E. A., Doljenko M. I., Berezin V. A. The brain lectins characteristic, functions, receptors 488

Parsadanian H. K. Brain calcineurin and a groud of related type—2B protein phosphatases 502

СОДЕРЖАНИЕ

журнала «Нейрохимия», том 9. 1990 год

Выпуск 1

Антоников И. М., Глебов Р. Н. Комплексное определение концентрации свободного кальция с помощью Са-чувствительного флуоресцентного зонда квин-2 в синаптосомах мозга крыс при различных воздействиях . 3

Худоерков Р. М. Авторадиографическое исследование синтеза белка в мозгу крыс под влиянием тетрапептида тафцина и L-ДОФА . 10

Глущенко Т. С., Демин Н. Н., Кленикова В. А., Таранова Н. П. Влияние лишения парадоксальной фазы сна на содержание суммарных белков и их метаболизм в ядрах нейронов и перинейрональных глиоцитов ряда отделов головного мозга крыс 18

Таранова Н. П., Кленикова В. А., Вайдо А. И., Ширяева Н. В., Кулагин Д. А., Лопатина Н. Г. Влияние нарушений сна на активность АТРаз нейронов и глиоцитов гиппокампа у крыс, селектированных по порогу возбудимости нервной системы 24

Постоенко В. А., Пархоменко Ю. М., Донченко Г. В. Изучение аминокислотного состава и небелковых компонентов тиаминсвязывающего белка синаптосом мозга крыс 33

Орлова Е. И. Активность синаптической мембраносвязанной АХЭ в норме и в условиях ранней бинокулярной депривации кролика 40

Лемешко В. В., Стреляный С. М. Мембранная регуляция дыхания митохондрий и гидролиза АТР в гомогенатах мозга крыс разного возраста . 47

Молочкина Е. М., Боровок Н. В., Бурлакова Е. Б. Модификация липидной компоненты наружных митохондриальных мембран головного мозга мышей и кинетических свойств мембраносвязанной МАО при изменении активности серотонинергической системы введением антиоксиданта . 57

Гуляева Н. В., Ермакова И. В., Курбатова М. Б., Лосева Е. В., Лущекина Е. А., Обидин А. Б., Хоничева Н. М. Свободнорадикальное окисление липидов мозга при повреждении миндалины и трансплантации в поврежденный участок эмбриональной мозговой ткани 68

Замятнин А. А. Специализированный банк данных по природным регуляторным олигопептидам EROP—Moscow 75

Краткие сообщения

Прихожан А. В., Ковалев Г. И., Раевский К. С. Модулирование фенамином и β-фенилэтиламином высвобождения [^{3}H]Д-аспарагиновой кислоты из синаптосомы коры мозга крыс 84

Рахимов Р. Н., Калаус Н. Э., Рахимова Н. Н., Долго-Сабуров В. Б., Крылов С. С. Латерализация распределения и захвата аминокислот в головном мозгу крыс 87

Макляков Ю. С., Страдомский Б. В., Бардахчьян Э. А. Уридиновые рецепторы мозга: лигандный и ультраструктурный аспекты 91

Прохненский А. И., Сорочинский Б. В. Модификация этанолом сборки микротрубочек мозга 96

Дишкелов А., Митев Ю., Пачев В. Жирнокислотный состав фосфолипидов в некоторых структурах мозга крыс с врожденным дефицитом вазопрессина 101

Айанян А Е. Выделение фосфолипазы A_2 из головного мозга быка . 105

Демчук М. Л., Левченко Л. И., Промыслов М. Ш. Процессы перекисного окисления липидов при черепно-мозговой травме . . . 108

Кузьминская У. А., Бадаева Л. Н., Дробинская О. В., Засенко И. И. Протеолиз и его ингибирование в нервной ткани и крови при экспериментальной демиелинизации химической этиологии 111

Обзоры

Березин В. А. Молекулярные основы взаимодействий между нервной и иммунной системами 114
Корнеев А. Я. Радиолигандный анализ и функциональная гетерогенность 5-HT_1-рецепторов 125

Рецензии

Парсаданян Г. К. Успехи в области фосфопротеинфосфатаз (под ред. В. Мерлеведе, Дж. Ди Сальво) 141

Хроника

Рылов А. Л. Международный симпозиум «Молекулярные основы действия биологически активных веществ на поведение» 144

Выпуск 2

Таранова Н. П., Маликов У. М. Влияние лишения парадоксальной фазы сна на специфическое связывание [^{3}H]морфина и [^{3}H]налоксона с синаптическими мембранами головного мозга крыс 161
Меликсетян М. Б., Корнеев А. Я., Середенин С. Б. Свойства мест специфического связывания этилового эфира β-карболин-3-карболовой кислоты отличных от бензодиазепиновых рецепторов в мозгу крысы . . . 167
Кириаков Г. В., Рожанец В. В., Русаков Д. Ю., Колодкина Н. Г., Камнов-Полевой А. Б., Майский А. И., Лежава Г. Г. Рецепторные системы головного мозга крыс различной типологической принадлежности при стрессе, добровольном потреблении этанола и субхроническом применении мебикара и бефола 174
Перуш П. А. Фармакологическая коррекция нейрохимических изменений в структурах головного мозга крыс при экспериментальном неврозе . 182
Бархударян Н. А., Хорват Л., Галоян А. А., Овади Ю. Аллостерическая регуляция кальмодулина коронаросуживающими нейропептидами гипоталамуса 188
Абрамян Г. Э., Бобрускин И. Д., Гурвиц Б. Я., Галоян А. А. Влияние антагониста кальмодулина W-7 на регуляцию активности кальмодулинчувствительной ФДЭ из мозга быка С-модулином I 196
Левитина М. В., Васильев А. А. Изучение содержания и состава цереброзидов и сульфоцереброзидов в опухолях головного мозга человека . . . 202
Саакян С. А., Греки Г., Саакян Ф. М., Срапионян Р. М., Йорк Р., Галоян А. А., Маттиес А. Влияние гипоталамических белок-гормональных комплексов на фукозилирование гликопротеинов гиппокампа 209
Назарян К. Б., Карапетян Н. Г., Казарян Б. А. Различия в стабильности αα и γγ изоферментов енолазы мозга при инкубации с нейтральными солями 215
Амбарцумян В. Г., Вартанян А. Г., Оганесян В. С. Особенности регуляции активности мембраносвязанной фосфатазависимой глутаминазы синаптосом и митохондрий коры головного мозга 223
Гайдар Л. И., Литвинова Л. В., Втюрина И. Ю., Соловьев Ю. Н., Березин В. А., Василов Р. Г. Получение моноклональных антител к глиальному фибриллярному кислому белку и их использование для характеристики полипептидного состава глиоспецифического белка в онтогенезе мозга человека 230
Чехонин В. П., Лиджиева Р. Ц., Коротеева Е. А., Рябухин И. А., Лебедев А. С., Буркина А. Ю., Беляева Н. Ю. Иммунохимическое изучение механизмов аутоиммунной агрессии антител к нейроспецифическим белкам у крыс с экспериментальным прорывом ГЭБ 239
Опарина Т. И., Блюдзин Ю. А., Путилина Ф. Е. Влияние гипердоз витамина А на метаболизм неэстерифицированных жирных кислот нервной ткани . 245

Краткие сообщения

Менджерицкий А. М., Ускова Н. И., Чораян И. О., Михалева И. Н. Хронобиологический эффект дельта-сон индуцирующего пептида и система ГАМК в мозгу крыс 251
Войтенко Н. Н. Регуляция активности моноаминоксидаз мозга предрасположенных к каталепсии крыс на уровне транскрипции 257
Галоян А. А., Карапетян Р. О., Попова Т. В. Влияние нейрогормона «С» на синтез и захват [^{3}H]норадреналина надпочечниками крыс . . . 261
Погосян А. Ю., Овсепян Л. М., Овеян Г. А., Паносян А. Г., Карагезян К. Г., Пеноян А. З. Метаболизм жирных кислот в головном мозгу при экспериментальном отеке 265

Обзоры

Галоян А. А. Ca^{2+}-кальмодулин и сопряженные системы регуляции . . 271

Выпуск 3

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 [^{3}H]дофамина $ДА_2$-рецепторами синаптических мембран различных зон мозга крыс после условной реакции пассивного избегания 301
Кнарян 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
Скобелева 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., Гурвиц 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

Выпуск 4

Манухин Б. Н., Кичикулова Т. П., Московкин Г. Н. Влияние фосфолипазы A_2 на связывание м-холино- и β-адреноблокаторов синаптосомами мозга крыс 409
Розенгарт Е. В., Шестакова Н. Н. Конформационные аспекты взаимодействия аммониевых и сульфониевых субстратов с ацетилхолинэстеразой нервной ткани 417
Туршян Г. А., Акопян Г. Е., Сафразян С. С., Априкян Г. В. Взаимосвязь активности γ-глутамилтрансферазы и транспортной системы возбуждающих нейромедиаторных аминокислот 427
Турянница И. М., Пащенко А. Е., Ростока Л. М., Маргитич В. М., Федорович Т. М., Горзов И. П., Бобик Ю. Ю., Побережник М. В. Влияние трийодтиронина и водорастворимого масла на тиреоидную и аминокислотную обеспеченность головного мозга у морских свинок 432
Габриелян С. К., Сраппонян Р. М., Абелян Ж. Г., Саакян С. А. Саакян Ф. М., Галоян А. А. Определение содержания нейроспецифического белок-гормонального комплекса в организме крысы с экспериментальным инфарктом миокарда 438
Закарян Т. Р., Бархударян Н. А., Шувалова Л. А., Островская М. В., Шарова Н. П., Галоян А. А. Регуляция сокращения гладкой мускулатуры пептидными факторами гипоталамуса 444
Галоян А. А., Бобрускин И. Д. Гурвиц Б. Я. Абрамян Г. Э. Ca^{2+}-независимая регуляция активности кальмодулинзависимой фосфодиэстеразы из мозга быка С-модулинами 450
Таранова Н. П., Нилова Н. С., Воронина Т. А., Неробкова Л. Н., Маркина Н. В. Влияние 2-этил-6-метил-оксипиридина на состояние перекисного окисления липидов головного мозга и его нейрофизиологические эффекты при нарушении сна 460
Аннанепесов Х. Н., Чаева Л. С., Коновалов Г. В., Майорова Л. П. Интенсивность метаболизма общих липидов, галактоцереброзидов и сульфоцереброзидов головного мозга при остром и хроническом ЛНМ коронавирусном энцефаломиелите у мышей 468

Краткие сообщения

Васильева И. Г., Чопик Н. Г., Копьев О. В., Васильев А. Н. Содержание полиаминов в головном мозгу кроликов в динамике экспериментальной легкой черепно-мозговой травмы 475
Мельник А. А., Балков Д. И., Волков Г. Л., Говсеева Н. Н., Гулая Н. М. Парадоксальный эффект N-пальмитоилэтаноламина на транспорт катионов через биологические мембраны 479
Захарян Р. А., Геворкян М. Г. Индукция Ca^{2+}-дсРНК синтеза интерферона в мозгу, повышение активности 2-5А-синтетазы, протеинкиназы p67K . 483

Обзоры

Лепехин Е. А., Долженко М. И., Березин В. А. Лектины мозга: характеристика, функции, рецепторы 488
Парсаданян Г. К. Кальцинейрин мозга и группа родственных фосфопротеинфосфатаз типа 2В 502

Указатель авторов, опубликованных в томе 9, 1990 г.

Абелян Ж. Г. 438 (4)
Абрамян Г. Э. 196 (2), 450 (4)
Абрамян С. С. 316 (3)
Августинович Д. Ф. 293 (3)
Айвазян А. Е. 105 (1)
Акопян А. Г. 354 (3)
Акопян Г. Е. 427 (4)
Амбарцумян В. Г. 223 (2)
Аннанепесов Х. Н. 468 (4)
Антоников И. М. 3 (1)
Априкян Г. В. 309 (3), 427 (4)
Арутюнян А. В. 373 (3)

Бадаева Л. Н. 111 (1)
Балков Д. И. 479 (4)
Бардахчьян Э. А. 91 (1)
Бархударян Н. А. 188 (2), 444 (4)
Беляева Н. Ю. 239 (2)
Березин В. А. 114 (1), 230 (2), 488 (4)
Блюдзин Ю. А. 245 (2)
Бобик Ю. Ю. 432 (4)
Бобрускин И. Д. 196 (2), 450 (4)
Боровок Н. В. 57 (1)
Буркина А. Ю. 239 (2)
Бурлакова Е. Б. 57 (1)
Бухман В. Л. 339 (3)

Вайдо А. И. 24 (1)
Вартанян А. Г. 223 (2)
Василов Р. Г. 230 (2)
Васильев А. А. 202 (2)
Васильев А. Н. 475 (4)
Васильева И. Г. 475 (4)
Войтенко Н. Н. 257 (2)
Волков Г. Л. 479 (4)
Воронина Т. А. 460 (4)
Втюрина Н. Ю. 230 (2)

Габриелян С. К. 438 (4)
Гайдар Л. И. 230 (2)
Галкина О. В. 301 (3)
Галоян А. А. 188 (2), 196 (2), 209 (2), 261 (2), 271 (2), 316 (3), 369 (3), 444 (4), 450 (4)
Гарибджанян Б. Т. 354 (3)
Гарибян Д. В. 354 (3)
Геворкян М. Г. 483(4)
Глебов Р. Н. 3 (1), 345 (3)
Глущенко Т. С. 18 (1)
Говсеева Н. Н. 479 (4)
Грекш Г. 209 (2)
Гулая Н. М. 479 (4)
Гуляева Н. В. 68 (1)
Гурвиц Б. Я. 196 (2), 369 (3), 450 (4)

Даниелян И. С. 354 (3)
Демчук М. Л. 108 (1)
Демин Н. Н. 18 (1)
Джагацпанян И. А. 354 (3)
Дишкелов А. 101 (1)
Долго-Сабуров В. Б. 87 (1)
Долженко М. И. 488 (4)
Донченко Г. В. 33 (1)
Дробинская О. В. 111 (1)

Егорян Р. У. 326 (3)
Ермакова И. В. 68 (1)

Закарян Т. Р. 444 (4)
Замятнин А. А. 75 (1)
Засенко И. И. 111 (1)
Захарян Р. А. 339 (3), 483 (4)

Ильюченок Р. Ю. 301 (3)
Йорк Р. 209 (2)

Казарян Б. А. 215 (2), 326 (3), 332 (3)
Калаус Н. Э. 87 (1)
Кампов-Полевой А. Б. 174 (2)
Карагезян К. Г. 265 (2), 358 (3)
Карапетян Н. Г. 215 (2)
Карапетян Р. О. 261 (2)
Кириаков Г. В. 174 (2)
Киселев С. Л. 339 (3)
Кичикулова Т. П. 409 (4)
Кленикова В. А. 18 (1), 24 (1)
Кнарян В. А. 309 (3)
Ковалев Г. И. 84 (1)
Колодкина Н. Г. 174 (2)
Коновалов Г. В. 468 (4)
Копьев О. В. 475 (4)
Корнеев А. Я. 125 (1), 167 (2)
Коротеева Е. А. 239 (2)
Костанян А. А. 332 (3)
Крылов С. С. 87 (1)
Кузьминская У. А. 111 (1)
Кулагин Д. А. 24 (1)
Курбатова М. Б. 68 (1)

Лебедев А. С. 239 (2)
Левитина М. В 202 (2), 350 (3)
Левченко Л. И. 108 (1)
Лежава Г. Г. 174 (2)
Лемешко В. В. 47 (1)
Лепехин Е. А. 488 (4)

Лиджиева Р. И. 239 (2)
Литвинова Л. В. 230 (2)
Лопатина Н. Г. 24 (1)
Лосева Е. В. 68 (1)
Лущекина Е. А. 68 (1)

Майорова Л. П. 468 (4)
Майский А. И. 174 (2)
Макляков Ю. С. 91 (1)
Маликов У. М. 161 (2)
Манухин Б. Н. 409 (4)
Маргитич В. М. 432 (4)
Маркина Л. Н. 460 (4)
Мартиросян М. А. 358 (3)
Маслова Г. Б. 293 (3)
Маттисс А. 209 (2)
Меликсетян М. Б. 167 (2)
Меликян Г. Г. 354 (3)
Мельник А. А. 479 (4)
Мельник В. И. 345 (3)
Менджерицкий А. М. 251 (2)
Месропян Н. Г. 316 (3)
Митев Ю. 101 (1)
Михайлов С. А. 339 (3)
Михалева И. И. 251 (2)
Молочкина Е. М. 57 (1)
Московкин Г. Н. 409 (4)

Назарян К. Б. 215 (2), 325 (3), 332 (3)
Нилова Н. С. 460 (4)
Неробкова Л. Н. 460 (4)
Неруш П. А. 182 (2)

Обидин А. Б. 68 (1)
Овади Ю. 188 (2)
Овсян Г. А. 265 (2)
Овсепян Л. М. 265 (2)
Оганесян В. С. 223 (2)
Опарина Г. Н. 245 (2)
Орлова Е. И. 40 (1)
Островская М. В. 444 (4)

Паносян А. Г. 265 (2)
Парсаданян Г. К. 141 (1), 502 (4)
Пархоменко Ю. М. 33 (1)
Пачев В. 101 (1)
Пащенко А. Е. 432 (4)
Пепоян А. З. 265 (2)
Побережник М. В. 432 (4)
Погосян А. Ю. 265 (2)
Подгорная Е. К. 301 (3)
Попова Т. В. 261 (2)
Попова Н. К. 293 (3)
Порхневский А. И. 96 (1)

Постоенко В. А. 33 (1)
Прихожан А. В. 84 (1)
Промыслов М. Н. 108 (1)
Путилина Д. Е. 245 (2)

Раевский К. С. 84 (1)
Рахимов Р. Н. 87 (1)
Рахимова Н. Н. 87 (1)
Рожанец В. В. 174 (2)
Розенгарт Е. В. 409 (4)
Ростока Л. М. 432 (4)
Русаков Д. Ю. 174 (2)
Рылов А. Л. 144 (1)
Рябухин И. А. 239 (2)

Саакян С. А. 209 (2), 438 (4)
Саакян Ф. М. 209 (2), 438 (4)
Саитмуратова О. Х. 390 (3)
Саркисян Л. В. 358 (3)
Сафразян С. С. 427 (4)
Середенин С. Б. 167 (2)
Скобелева Н. А. 339 (3)
Соловьев Ю. Н. 230 (2)
Срапионян Р. М. 209 (2), 316 (3), 438 (4)
Страдомский Б. В. 91 (1)
Стреляный С. М. 47 (1)
Сорочинский Б. В. 96 (1)

Таранова Н. П. 18 (1), 24 (1), 161 (2), 460 (4)
Туманова С. Ю. 361 (3)
Туршян Г. А. 427 (4)
Турянина И. М. 432 (4)

Ускова Н. И. 251 (2)

Федорович Т. М. 432 (4)

Ханбабян М. В. 358 (3)
Хоничева Н. М. 68 (1)
Хорват Л. 188 (2)
Худоерков Р. М. 10 (1)

Чехонин В. П. 239 (2)
Чилаг А. 316 (3)
Чопик Н. Г. 475 (4)
Чораян И. О. 251 (2)

Шарова Н. П. 444 (4)
Ширяева Н. В. 24 (1)
Шестакова Н. Н. (3)
Шувалова Л. А. 444 (4)
Шукалова Т. Ф. 345 (3)

CUMULATED AUTHOR INDEX, volume 9, 1990

Abelyan J. G. 438 (4)
Abramyan G. E. 196 (2), 450 (4)
Abramyan S. S. 316 (3)
Akopyan A. G. 354 (3)
Akopyan G. E. 427 (4)
Ambartsumyan V. G. 223 (2)
Annanepesov Kh. A. 468 (4)
Antonikov I. M. 3 (1)
Aprikyan G. V. (3), 427 (4)
Arutyunyan A. V. 373 (3)
Avgustinovich D. F. 293 (3)
Ayanian A. Y. 105 (1)

Badaeva L. N. 111 (1)
Balkov D. I. 479 (4)
Bardakhchan E. A. 91 (1)
Barkhudaryan N. A. 188 (2), 444 (4)
Belyaeva N. Yu. 239 (2)
Beresin V. A. 114 (1), 230 (2), 488 (4)
Blyudzin Yu. A. 245 (2)
Bobik Y. Y. 432 (4)
Bobruskin I. D. 196 (2), 450 (4)
Borovok N. V 57 (1)
Bukhman V. L. 339 (3)
Burlakova Ye. B. 57 (1)
Burkina A. Yu. 239 (2)

Chanbabian M. V. 358 (3)
Chekhonin V. P. 239 (2)
Chopik N. G. 475 (4)
Chorayan I. O. 251 (2)
Chilag A. (3)

Danielyan I. S. 354 (3)
Demchuk M. L. 108 (1)
Dishkelov A. 101 (1)
Doemin N. N. 18 (1)
Dolgo-Saburov V. A. 87 (1)
Doljenko M. I. 488 (4)
Donchenko O. V. 33 (1)
Drobinskaya O. V. 111 (1)
Dzhagatspanyan I. A. 324 (3)

Egoryan R. U. 326 (3)
Ermakova I. V. 68 (1)

Gabrielyan S. K. 438 (4)
Galoyan A. A. 182 (2), 196 (2), 209 (2), 261 (2), 271 (2), 316 (3), 369 (3), 438 (4), 444 (4), 450 (4)
Galdar L. I. 230 (2)
Galkina O. V. 301 (3)
Garibdzhanyan B. T. 354 (3)
Garibyan D. V. 354 (3)
Gevorgyan M. G. 483 (4)
Glebov R. N. 3 (1), 345 (3)
Glushchenko T. S. 18 (1)
Greksh G. 209 (2)
Govseeva N. N. 479 (4)
Gulyaeva N. V. 68 (1)
Gulaya N. M. 479 (4)
Gurvits B. Ya. 196 (2), 369 (3), 450 (4)

Horvath L. 188 (2)

Ilyuchenok R. Yu. 301 (3)

Jork R. 209 (2)

Kampov-Polevoi A. B. 174 (2)
Kalaus N. E. 87 (1)
Karagezyan K. G. 265 (2), 368 (3)
Karapetyan N. G. 215 (2)
Karapetyan R. O. 26 (2)
Kazaryan B. A. 215 (2), 326 (3), 352 (3)
Khonicheva N. M. 68 (1)
Khudoerkov R. M. 10 (1)
Kichikulova T. P. 409 (4)
Kiriakov G. V. 174 (2)
Kiselev S. L. 339 (3)
Klenikova V. A. 18 (1), 21 (1)
Knaryan V. A. 309 (3)
Kolodkina N. G. 174 (2)
Konovalov G. V. 468 (4)
Korsev O. V. 475 (4)
Koroteeva E. A. 239 (2)
Korneyev A. Ya. 121 (1), 167 (2)
Kostanyan A. A. 332 (3)
Kovalev G. I. 84 (1)
Krylov S. S. 87 (1)
Kulagin D. A. 21 (1)
Kurbatova M. B. 68 (1)
Kuzminskaya U. A. 111 (1)

Lebedeva A. C. 239 (2)
Lemeshko V. V. 47 (1)
Lepechin E. A. 488 (4)
Levitina M. V. 202 (2), 359 (3)
Levchenko L. I. 108 (1)

Lezhava G. G. 174 (2)
Lidzhieva R. Ts. 239 (2)
Litvinova L. V. 230 (2)
Lopatina N. G. 24 (1)
Loseva E. V. 68 (1)
Lushchekina E. A. 68 (1)

Maisky A. I. 174 (2)
Majorova L. P. 468 (4)
Maklyakov U. S. 91 (1)
Malikov U. S. 161 (2)
Manukhin B. N. 409 (4)
Margitish V. M. 432 (4)
Markina N. V. 460 (4)
Martirosian M. A. 358 (3)
Maslova G. B. 293 (3)
Matthies H. 209 (2)
Meliksetyan M. B. 167 (2)
Melikyan G. G. 354 (3)
Melnik A. A. 479 (4)
Melnik V. I. 345 (3)
Mendzeritskii A. M. 251 (2)
Mesropyan N. G. 316 (3)
Mikhaleva I. I. 251 (2)
Mikhaylov S. A. 339 (3)
Mitev Y. 101 (1)
Molochkina Ye. M. 57 (1)
Moskovkin G. N. 409 (3)

Nazaryan K. B. 215 (2), 326 (3), 332 (3)
Nerobkova L. N. 460 (4)
Nerush P. A. 182 (2)
Nilova N. S. 460 (3)

Obidin A. B. 68 (7)
Oganesyan V. S. 223 (2)
Oparina T. I. 245 (2)
Orlova E. I. 40 (1)
Ostrovskaja M. V. 444 (4)
Ovadi J. 188 (2)
Oveyan G. A. 265 (2)
Ovsepyan L. M. 265 (2)

Panosyan A. G. 265 (2)
Parkhomenko Yu. M. 33 (1)
Parsadanian G. K. 141 (1), 502 (4)
Patchev V. 101 (1)
Paschenko A. E. 432 (4)
Pepoyan A. Z. 265 (2)
Phedorovich T. M. 432 (1)
Poberejnik M. V. 432 (4)
Pogosyan A. Yu. 265 (2)
Podgornaya E. K. 301 (3)
Popova N. K. 293 (3)
Popova T. V. 261 (2)
Postoenko V. A. 33 (1)
Prikhozan A. V. 84 (1)
Prokhnevsky A. I. 96 (1)
Promyslov M. Sh. 108 (1)
Putilina F. E. 245 (2)

Rakhimova N. N. 87 (1)
Rakhimova R. N. 87 (1)
Rayevsky K. S. 84 (1)
Rostoka A. M. 432 (4)
Rozengart E. V. (3), 409 (4)
Rozhanets V. V. 174 (2)
Rusakov D. Yu. 174 (2)
Ryabukhin I. A. 239 (2)
Rylov A. I. 114 (1)

Sahakian F. M. 209 (2), 438 (4)
Sahakian S. A. 209 (2), 438 (4)
Saitmuratova O. Kh. 390 (3)
Saphrazyan S. S. 427 (4)
Sarkisian L. V. 358 (3)
Seredenin S. B. 167 (2)
Sharova N. P. 444 (4)
Shestakova N. N. 417 (4)
Shiryaeva N. V. 24 (1)
Shukalova T. F. 345 (3)
Shuvalova L. A. 444 (4)
Skobeleva N. A. 339 (3)
Solovyev Yu. N. 230 (2)
Sorochinsky B. V. 96 (1)
Srapionian R. M. 209 (2), 316 (3), 438 (4)
Stradomsky B. V. 91 (1)
Strelyany S. M. 46 (1)

Taranova N. P. 18 (1), 24 (1), 161 (2), 460 (4)
Tumanova S. Yu. 361 (3)
Turshian E. A. 427 (4)
Turjanitza U. M. 432 (4)

Uskova N. I. 251 (2)

Vajdo A. I. 24 (1)
Vasil'ev A. N. 475 (4)
Vasil'ev A. A. 202 (2)
Vasil'eva I. G. 475 (4)
Vasilov R. G. 230 (2)
Vartanyan A. G. 223 (2)
Voitenko N. N. 257 (2)
Volkov G. L. 479 (4)
Voronina T. A. 460 (4)
Vtyurina I. Yu. 230 (2)

Zakharyan R. A. 339 (3), 483 (3)
Zakaryan T. R. 444 (4)
Zamyatin A. A. 75 (1)
Zasenko I. I. 111 (1)